

In vitro Untersuchungen zur akuten Schlaganfallversorgung. Stellt
Tenecteplase eine Alternative zur rt-PA Standardtherapie dar?

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Frühwald, Tobias Michael Rudolf
aus Würzburg

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Huttner

Gutachter: Prof. Dr. B. Rosengarten

Tag der Disputation: 05.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Historische Konzeptualisierung und Definition des Krankheitsbildes „Schlaganfall“	1
Epidemiologie des Schlaganfalls	1
Einteilung von Formen des Schlaganfalls	2
Infarktformen	2
Klassifikationen der Infarktätiologie	5
Risikofaktoren für Hirninfarkte	8
Pathophysiologische Mechanismen im minder-perfundierten Areal	10
Hämostase	11
Primäre Hämostase	12
Sekundäre Hämostase	12
Entstehung des Fibrinnetzes	13
Fibrinolyse	14
Sekundärprophylaxe des Hirninfarktes	14
Akuttherapie des Hirninfarktes: Intravenöse Thrombolyse	15
Recombinant tissue Plasminogen Activator (Alteplase, rt-PA, Actilyse®)	18
Tenecteplase (TNK, Metalyse®): Entwicklung und Applikation	19
Tenecteplase: mit rt-PA vergleichende Studien	20
Tenecteplase: Aktuelle Anwendung und Herausforderungen:	22
Andere Thrombolytika	23
Akuttherapie des Hirninfarktes: Mechanische Thrombektomie	23
Sonothrombolyse: Mechanistische Grundlagen	24
Sonothrombolyse: Klinische Evidenz	26
Struktur von <i>in vivo</i> entstandenen Thromben	28
Herstellung von <i>in vitro</i> Thromben für Thrombolyseexperimente	29
Methoden zur Evaluation experimenteller Thrombolyse	32
Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	33
Hypothesen	33
Materialien und Methoden	35
Chemikalien	35
Lösungen & Puffer	35
Geräte und Laborbedarf	36

Elektronenmikroskopie	36
Sonstige Geräte	37
Verbrauchsmaterialien	37
Software	37
Herstellung artifizierlicher Thromben	37
Das statische Modell	39
Dosisfindungsexperimente	40
Auswertung der relativen Gewichtsabnahme	42
Therapeutischer Ultraschall	43
Auswertung der TEM-Schnitte	44
Berechnungen und Statistik	47
Erstellung von Tabellen und Abbildungen	47
Ergebnisse	48
<hr/>	
Dosisfindungsexperimente	48
Dosisfindung für rt-PA	48
Dosisfindung für Tenecteplase	49
Zusammenfassung der Ergebnisse der Dosisfindung	50
Ergebnisse der relativen Gewichtsabnahme	50
Wirksamkeit der Therapiegruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe	51
Wirksamkeit von Tenecteplase verglichen mit rt-PA	51
Wirksamkeit von Ultraschall	51
Zusammenfassende Ergebnisse der relativen Gewichtsabnahme	52
Ergebnisse der TEM-Analyse	53
Diskussion	55
<hr/>	
Vorteile der <i>in vitro</i> Experimente	55
Dosisfindungsexperimente belegen die Funktionalität des eingesetzten	
Versuchsaufbaus	55
Experimente belegen größere Effektivität von TNK auf den relativen	
Gewichtsverlust, STL ohne signifikanten Effekt.	56
Die TEM-Analyse zeigt nur teilweise signifikante Ergebnisse	56
TNK ist in beiden Untersuchungsmodalitäten effektiver als rt-PA	57
Einordnung der Ergebnisse in die klinische Literatur: TNK vs rt-PA	57
Einordnung der Ergebnisse in die klinische Literatur: Sonothrombolyse	58
Zusammenfassung der Erkenntnisse der Experimente	59

Limitationen des Versuchsaufbaus und der Thrombusgenerierung	59
Limitationen der <i>in vitro</i> Thrombolyse	61
Limitationen der <i>in vitro</i> Sonothrombolyse	62
Limitation der Vergleichbarkeit bezüglich Blutungskomplikationen	63
Limitationen der TEM-Analyse	63
Optimierung der TEM-Analyse	64
Implikationen für zukünftige Experimente und den klinischen Einsatz von TNK	65
Zusammenfassung _____	67
Conclusion _____	68
Abkürzungsverzeichnis _____	69
Abbildungsverzeichnis _____	71
Tabellenverzeichnis _____	72
Literaturverzeichnis _____	72
Publikationsverzeichnis _____	92

Das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechteridentitäten.

Einleitung

Historische Konzeptualisierung und Definition des Krankheitsbildes „Schlaganfall“

Die Bedeutung des Schlaganfalls für den Menschen spiegelt sich bereits in der Vielzahl der verwendeten Namen wider, die die Menschheit diesem Krankheitsbild gegeben hat. So ist der schon in der hippokratischen Schule der Medizin verwendete Begriff des „Apoplex“ ein weit verbreiteter Terminus. Trotz seiner vermeintlichen Prägnanz ist der Begriff des Apoplex unter Neurologen, aufgrund seiner Ungenauigkeit, nicht gerne gesehen und sogar Hippokrates hatte mit dem Überbegriff des akuten Gehirnleidens (oder: „Acute Brain Suffering“), bereits eine weit bessere Annäherung an unsere heutige Krankheitslehre geprägt (Tsoucalas et al., 2019)

Während der sogenannte Schlaganfall und der dazugehörige englische Terminus „Stroke“ ebenfalls weiterhin Überbegriffe für verschiedene Krankheitsentitäten sind, lässt sich aus diesen bereits eine viel genauere Annäherung an die im Begriff zusammengefassten Krankheitsbilder ableiten. So wird die Definition von „Stroke“ in Adams and Vectors *Principles of Neurology* als „relatively sudden occurrence of a focal neurological deficit“ beschrieben (Ropper A.H., 2019). Analog hierzu könnte man den Schlaganfall als „akut einsetzendes fokales neurologisches Defizit“ definieren. Eine zerebrovaskuläre Genese wird hierbei vorausgesetzt, weitere Erkrankungen, welche ebenfalls akute fokale, neurologische Defizite verursachen können, z.B. epileptische Anfälle, sind nicht inbegriffen.

Epidemiologie des Schlaganfalls

Die Prävalenz der Patienten mit stattgehabtem Schlaganfall wird in den USA auf ca. 2,7% geschätzt. Diese Prävalenz ist hierbei mit dem Alter assoziiert und liegt in der Kohorte der 60-79-Jährigen bereits bei etwa 6% und bei über 80-Jährigen bei etwa 12%. Frauen sind insgesamt häufiger betroffen als Männer (Virani et al., 2021). Gerade im Rahmen des in Industrienationen verbreiteten demographischen Wandels ist die im Alter zunehmende Inzidenz bedeutsam, da die zunehmende „Alterung“ der Gesellschaft eine weitere Zunahme der Prävalenz des Schlaganfalls bedeuten wird.

Relevant ist die hohe Prävalenz von Schlaganfällen nicht nur durch die mit ihnen assoziierte Mortalität (ca.12%), sondern insbesondere wegen der durch sie verursachten

Morbidität infolge persistierender neurologischer Defizite. Etwa 50% der Betroffenen erleiden bleibende Schäden (Nasr et al., 2013). Die Mortalität unterscheidet sich im globalen Vergleich zwischen geographischen Regionen teilweise deutlich. In den USA, welches von Seiten der Mortalitätsraten in die Gruppe der Nationen mit den besten Ergebnissen eingeteilt werden kann, zählen Schlaganfälle, trotz der bisher erreichten Verbesserung der therapeutischen Optionen, zu den fünf häufigsten Todesursachen (etwa 5% aller Todesfälle) (Virani et al., 2021).

Einteilung von Formen des Schlaganfalls

Der Oberbegriff „Schlaganfall“ oder „Stroke“ beinhaltet zwei verschiedene, scharf abgrenzbare Unterformen, mit ebenso divergenten Behandlungsstrategien.

1. Der hämorrhagische Infarkt oder die Hirnblutung
2. Der ischämische Infarkt oder Hirninfarkt

Eine ischämische Genese ist mit einem Anteil von ca. 87%, gegenüber 13% hämorrhagischer Schlaganfälle, deutlich häufiger (Virani et al., 2021). Der hämorrhagische Schlaganfall lässt sich weiter klassifizieren in intrakranielle Blutungen (ICB oder ICH) und Subarachnoidalblutungen (SAB oder SAH). Da diese Arbeit sich auf Entstehung und Therapie ischämischer Infarkte fokussiert, wird im Folgenden der Begriff Hirninfarkt als Oberbegriff verwendet.

Infarktformen

Die Ätiologie eines Hirninfarktes kann entscheidend für die indizierte Behandlung sein, und ist auch für die Entwicklung zukünftiger Behandlungsstrategien relevant. Eine grobe Einteilung ischämischer Ereignisse ist die Gruppierung in thrombotische und embolische Infarkte.

Die „Virchow Trias“, welche nach dem großen Pathologen benannt ist, aber nicht von ihm selbst formuliert wurde (Larena-Avellaneda, 2018) ist fast 100 Jahre nach Erstpublikation weiterhin eine prägnante und präzise Darstellung der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung von Thrombosen. Sie bezieht sich primär auf venöse Thrombosen, kann aber ohne weiteres auf das arterielle System übertragen werden.

In der „Virchow Trias“ sind drei maßgebliche prothrombotische Faktoren beschrieben:

1. Veränderungen der Gefäßwand (z.B. Endothelschädigung)
2. Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes
3. Veränderungen der Zusammensetzung des Blutes

Diese drei Faktoren führen alleine, oder in Kombination, zu einer pathologischen Aktivierung der Hämostase und somit zu der Entstehung von thrombotischen Veränderungen. In der Folge kann entweder lokal ein thrombotischer Infarkt, oder in einem distalen Gefäß ein embolischer Infarkt verursacht werden. Ausgangspunkt des akuten ischämischen Ereignisses ist die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque in einem arteriellen Gefäß. Das freigesetzte Fremdmaterial führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, und insbesondere zur Thrombozytenaggregation, es bildet sich ein Plättchen-reicher Thrombus (Wolberg et al., 2012). Dieser kann eine lokale Stenose oder in einem distalen Gefäß einen embolischen Infarkt verursachen. Stenotische Gefäße führen zu Veränderungen der lokalen Flussbedingungen. Der resultierende turbulente Fluss – und die damit veränderte Scherspannung auf die Gefäßwand – fördert den zunehmenden pathologischen Umbau des Endothels. Es folgt nicht nur eine Zunahme des Volumens der Plaque und ihrer stenosierenden Wirkung, sondern auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Plaque Ruptur (Cunningham & Gotlieb, 2005).

Durch das entstehende Perfusionsdefizit steigt zudem die Wahrscheinlichkeit hämodynamischer Infarkte, wobei diese Mechanismen vermutlich synergistisch die Infarktwahrscheinlichkeit steigern (Momjian-Mayor & Baron, 2005). Weitere Ursachen für embolische Infarkte sind die kardiale Entstehung von Thromben, zum Beispiel im Rahmen von Vorhofflimmern oder im Rahmen von Blutgerinnungsstörungen.

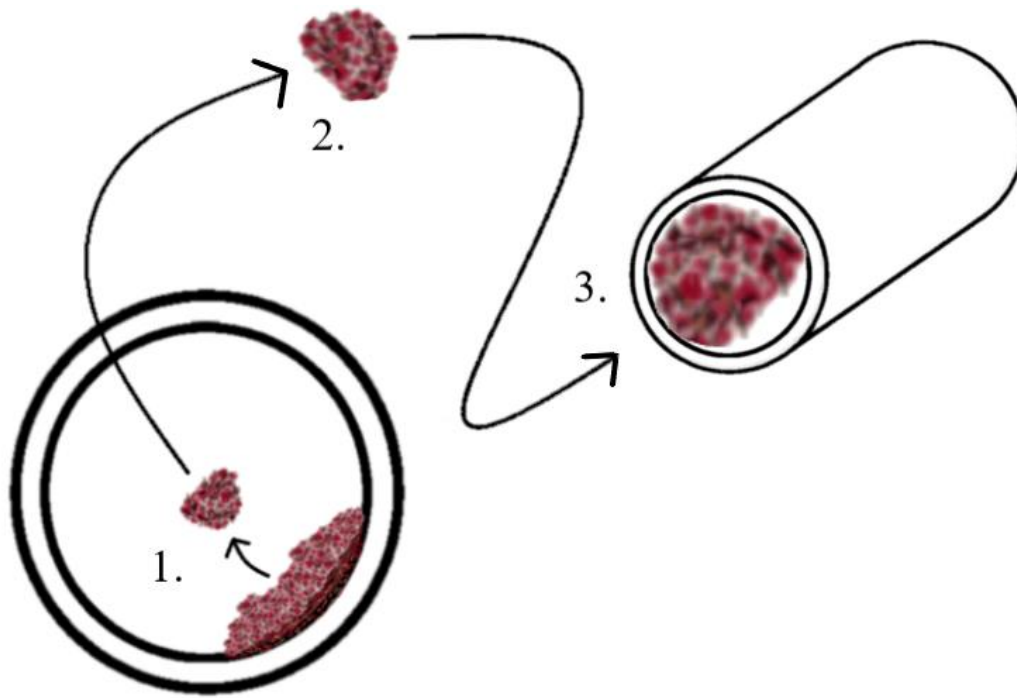


Abbildung 1: Plaque Ruptur und arterio-arterielle Embolie: 1.Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque 2. Embolus eines Thrombus, welcher sich nach Plaque Ruptur gebildet hat 3. Embolischer Verschluss eines Gefäßes

Klassifikationen der Infarktätiologie

Da unterschiedliche Ätiologien deutliche Unterschiede in der Behandlung erfordern, existieren verschiedene Klassifikationen, welche eine möglichst genaue, aber auch im klinischen Alltag praktikable Einteilung ermöglichen sollen. In Deutschland wird überwiegend die sogenannte TOAST- Klassifikation (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) genutzt. Diese unterteilt die Ätiologie von Infarkten in 5 Subgruppen (Adams et al., 1993).

1. Makroangiopathie: Infarkte, welchen eine symptomatische Stenose eines Gefäßes oder ein Verschluss eines größeren hirnversorgenden Gefäßes zugrunde liegen. Die Stenose füllt hierbei mehr als 50% des Gefäß Lumens aus. Meist ist der makroangiopathische Infarkt Folge von arteriosklerotischen Veränderungen des Gefäßes. Infarkte mit einer Größe von mehr als 1,5 cm können oft einer makroangiopathischen Genese zugeordnet werden. Es sollte allerdings ein kardioembolischer Fokus ausgeschlossen werden.

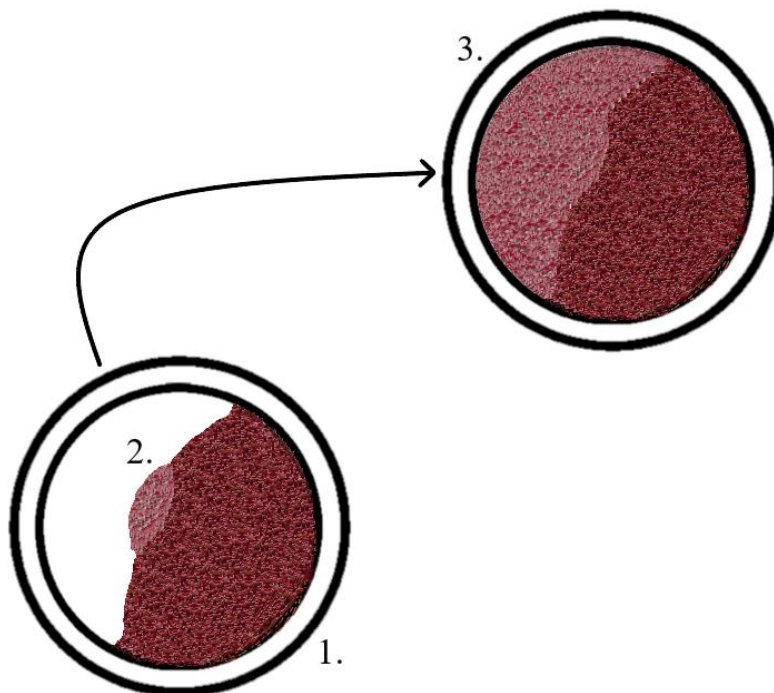


Abbildung 2: Makroangiopathischer Infarkt: 1. Hämodynamisch relevante Stenose eines großkalibrigen Gefäßes 2. Anlagerung frischen Thrombus Materials nach Plaque Ruptur 3. Thrombotischer Verschluss des Gefäßes

2. Kardial embolisch: Infarkte bei denen eine kardial-embolische Quelle nachgewiesen werden kann (z.B. Vorhofflimmern, Endokarditis)

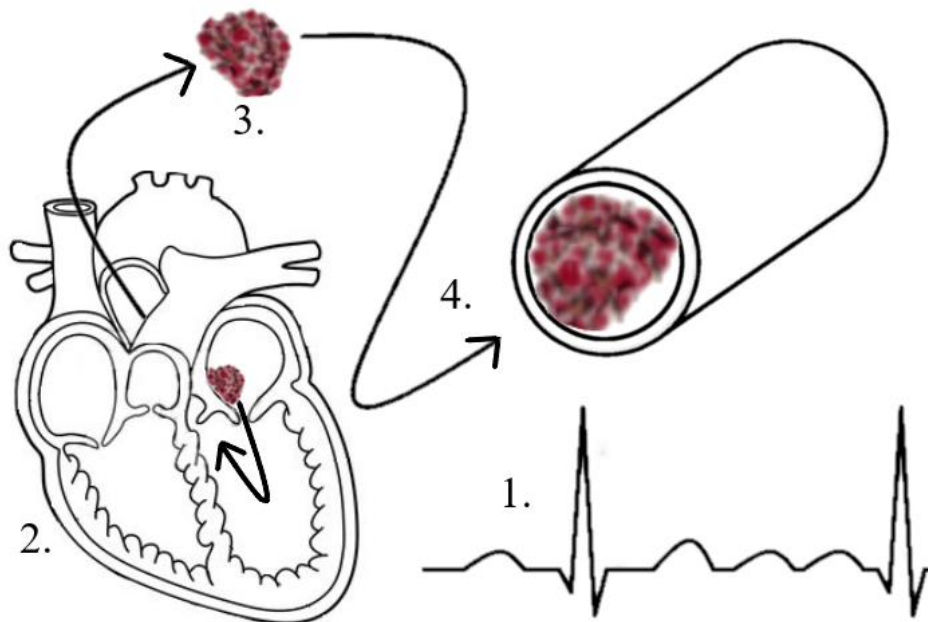


Abbildung 3: Kardial embolischer Infarkt: 1. Vorhofflimmern (die häufigste Ursache einer kardialen Embolie) 2. Es bildet sich ein intrakardialer Thrombus, zum Beispiel im Vorhof 3. Embolisierung des Thrombus 4. Embolisch verschlossenes Gefäß

3. Mikroangiopathie: Kleine Infarkte <1,5 cm, oft auch als lakunäre Infarkte bezeichnet. Risikofaktoren wie z.B. Diabetes mellitus Typ II, welche kleinkalibrige Gefäßverschlüsse verursachen, sind in der Regel Ursache mikroangiopathischer Hirninfarkte. Kleinste mikroangiopathische Schäden am Gehirn kumulieren oft über längere Zeit, ohne dass sich Symptome bemerkbar machen, und sind mittels Schnittbildgebung auch bei asymptomatischen, zumeist älteren Patienten häufig darzustellen.

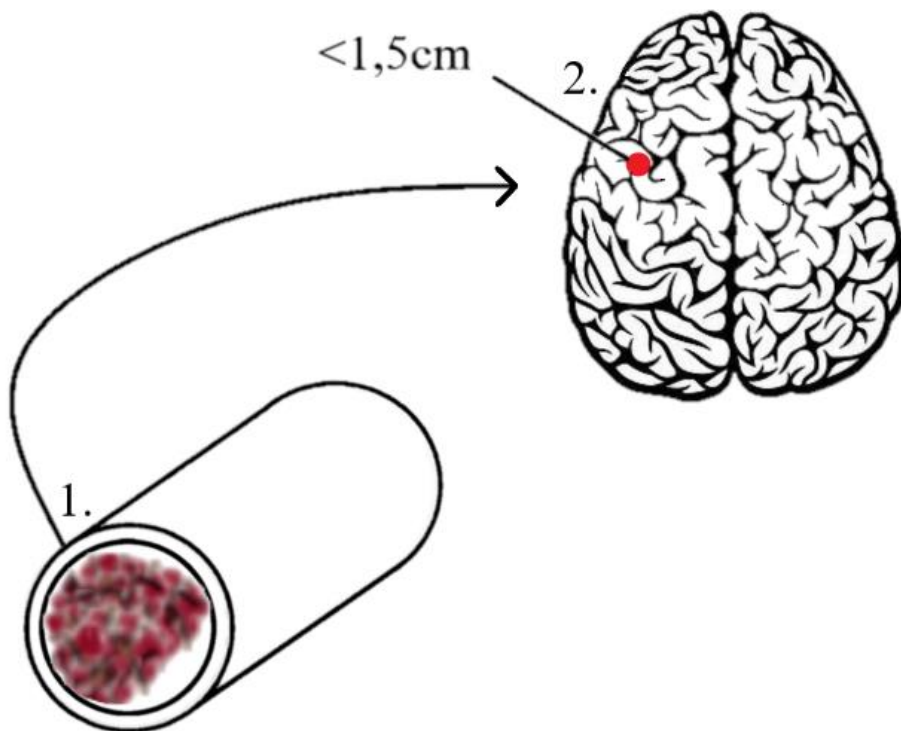


Abbildung 4: Mikroangiopathischer Infarkt 1. Verschluss eines kleinen hirnersorgenden Gefäßes in Folge von Arteriosklerose 2. Der entstehende Infarkt ist kleiner als 1,5cm

4. Andere Ätiologie: Infarkte seltener Ätiologie wie Vaskulitiden, Dissektionen von Gefäßen oder Blutgerinnungserkrankungen.

5. Kryptogene Ätiologie: Wenn die Ätiologie des Infarktes nicht gefunden werden kann oder konkurrierende gleich wahrscheinliche Ursachen bestehen (z.B. nachgewiesenes Vorhofflimmern bei nachweisbarer Gefäßstenose >50% und nicht eindeutigen Infarktmuster).

Alternativ bietet die ASCOD-Klassifikation (A – atherosclerosis/large vessel disease, S – small vessel disease, C – cardiac source, O – other cause, D – dissection) die Möglichkeit, Hirninfarkte nach der Wahrscheinlichkeit der Ursache zu klassifizieren, ohne dass der Behandler sich auf eine bestimmte Ätiologie festlegen muss (Amarenco et al., 2013). Beide Klassifikationen nutzen ähnliche ätiologische Einteilungen und werden von der entsprechenden deutschen Leitlinie empfohlen (Ringleb et al. 2021). Ca.

25% aller Hirninfarkte werden als embolische Infarkte unklarer Genese klassifiziert (Embolic Stroke of Unknown Source, kurz: ESUS). Trotz ihres praktischen Nutzens, sind diese Klassifizierungen nicht unkritisch zu sehen. Insbesondere die TOAST-Klassifikation fordert eine eindeutige Festlegung der Infarktätiologie, auch wenn dies nicht immer möglich ist. Sie kann daher, zum Beispiel wenn sie für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt wird, eine Störvariable sein.

Risikofaktoren für Hirninfarkte

Die wichtigsten Risikofaktoren eines Hirninfarktes sind, aufbauend auf den beschriebenen Klassifikationen der Infarktätiologie:

1. Ursachen für arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen
2. Ursachen für Herzrhythmusstörungen
3. Blutgerinnungsveränderungen, welche die Entstehung von embolischen Thromben fördern

Die wichtigsten Risikofaktoren sind im Folgenden aufgelistet:

Arterielle Hypertonie

Eine über längere Zeit bestehende arterielle Hypertonie verursacht sowohl Gefäßwandveränderungen als auch kardiale Umbauprozesse (z.B. linksventrikuläre Hypertrophie). Als Folge nimmt das Risiko sowohl kardialer als auch angiopathischer Ereignisse zu. Es besteht eine nachgewiesene Korrelation zwischen erhöhten Blutdrücken und einer vermehrten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse, welches den Hirninfarkt beinhaltet (Rabkin et al., 1978). 2016 war global ein erhöhter systolischer Blutdruck in allen untersuchten Ländern auf Platz eins der wichtigsten Risikofaktoren eines Hirninfarktes (Feigin et al., 2016).

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus führt sowohl zu mikro- als auch zu makroangiopathischen Gefäßveränderungen und fördert als Folge die Entstehung von Arteriosklerose. Die epidemiologische Krankheitslast wird durch die hohe Prävalenz erhöht. Beispielsweise leidet ca. 7% der deutschen Bevölkerung an Diabetes mellitus Typ II, hierbei nimmt die Prävalenz im Alter stark zu. Es besteht z.B. in der Alterskohorte der über 80-Jährigen eine Prävalenz von >25%.

Hyperlipidämie

Die Evidenz für den Stellenwert der Hyperlipidämie als Risikofaktor ist geringer, als für die weiteren bereits erwähnten Risikofaktoren. Bezüglich der Hyperlipidämie als Risikofaktor existieren divergente Studien, die Senkung erhöhter Lipidspiegel scheint dennoch positive Effekte zu haben. Die SPARCL Studie zeigte eine absolute Risikoreduktion von 2,2% nach 5 Jahren, nach Behandlung mit einer Dosis von 80 mg Atorvastatin, im Vergleich zu der Placebogruppe (Amarenco et al., 2006). Ein Lipidsenker (in der Regel Atorvastatin oder Simvastatin) ist daher Teil der empfohlenen sekundärprophylaktischen Medikation nach erlittenem Hirninfarkt.

Herzrhythmusstörungen

Jegliche Herzrhythmusstörungen können das Entstehen kardialer Embolien begünstigen. Vorhofflimmern ist, insbesondere aufgrund der hohen Prävalenz, bei Weitem die häufigste Ursache kardial embolischer Infarkte. Das Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken und als Folge einen Hirninfarkt zu erleiden, nimmt mit dem Alter deutlich zu (1,5% in der Alterskohorte zwischen 50 und 59 Jahren, 23,5% in der Alterskohorte ab 80 Jahren). Insgesamt sind ca. 14,5% aller Schlaganfälle mit Vorhofflimmern assoziiert (Wolf et al., 1991). Andere Quellen schätzen die Rate kardioembolischer Schlaganfälle auf etwa 20% ein (Ferro, 2003).

Vorhofflimmern hat oft keine subjektive Begleitsymptomatik und wird vermutlich, auch bei bereits festgestellten Hirninfarkten, deutlich unterdiagnostiziert. In langfristig durchgeführten Studien wurde bei 11 bis 23% der Patienten mit kryptogenem Hirninfarkt ein Vorhofflimmern detektiert (Flint et al., 2012) (Tayal et al., 2008).

Ernährung, Bewegung, Rauchen

Gemessen an den DALYs (Disability Adjusted Life Years) sind ungesunde Ernährung und hieraus resultierende metabolische Faktoren auf jeweils Platz zwei, drei, vier und sechs der relevantesten Risikofaktoren (in der genannten Reihenfolge: niedrige Zufuhr an Obst, hoher Body Mass Index (BMI), hohe Salzzufuhr, niedrige Zufuhr an Gemüse). Rauchen geht geschätzt mit einer Verdoppelung bis Vervierfachung des Infarktrisikos einher, es besteht eine Korrelation zwischen der Menge des Tabakkonsums und des bestehenden Risikos (Shah & Cole, 2010). Insgesamt sind etwa 75% der mit Hirninfarkten assoziierten Morbidität (in Form von DALYs) Folge von verhaltensabhängigen Faktoren (Feigin et al., 2016): Diabetes führt zu einer

Verdoppelung des Hirninfarkttrisikos (Meschia et al., 2014), Vorhofflimmern annähernd zu einer Verfünffachung (Wolf et al., 1991). Hierbei erhöhen die meisten Risikofaktoren, nicht nur unabhängig voneinander, die Infarktwahrscheinlichkeit, sondern sind oft als Komorbiditäten vorhanden oder sogar kausal zusammenhängend. So führt Rauchen beispielsweise sowohl zu Arteriosklerose als auch zu arterieller Hypertonie und wirkt sowohl mit der Hypertonie als auch anderen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus und Dyslipidämien als multiplikativer Risikofaktor (Centers for Disease Control and Prevention (US): How Tobacco Smoke Causes Disease: A Report of the Surgeon General). Zusammenfassend sind die Hauptrisikofaktoren für Hirninfarkte hochprävalente, in „westlichen“ Kulturkreisen annähernd zivilisationsinhärente Erkrankungen. Um die Gesundheit und Lebensqualität der Gesamtbevölkerung zu wahren nimmt die Notwendigkeit einer optimalen Behandlung des Hirninfarktes daher weiter zu.

Pathophysiologische Mechanismen im minder-perfundierten Areal

Hirngewebe ist sehr sensibel, bei vollständigem Verlust der Perfusion geht es innerhalb weniger Minuten zugrunde (Astrup et al., 1981). In der Regel sind in der Folge zwar individuelle Gefäße Hauptversorger eines bestimmten Areals, es bestehen allerdings meist Kollateralen aus anderen Versorgungsgebieten, welche überlappend eine Region perfundieren. Infolge eines akuten Gefäßverschlusses wird das Gewebe im sogenannten Infarktkern, welcher sehr wenig Durchblutung erfährt, rasch unwiederbringlich zerstört. Die sogenannte *Penumbra*, welche im Vergleich besser perfundiert ist, enthält Gewebe, welches noch das Potential zu einer Restitution hat. Das in der Penumbra enthaltene Gewebe geht nach einer gewissen Zeit ohne Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes aber ebenfalls zugrunde. Die kritische Grenze scheint bei etwa 10-12 ml/ 100 g/min zu liegen (Morawetz et al., 1978). Die untere Perfusionsgrenze bezüglich des Beginns der Bildung einer Penumbra ist aber nicht eindeutig festzulegen, da verschiedene Arten von Neuronen mit unterschiedlicher Sensibilität auf hypoxische Bedingungen reagieren. Symptome (z.B. eine reversible Hemiparese) können bereits etwa ab Flussraten von 23 ml/ 100mg/min auftreten (Hossmann, 1994). Oft wird auch eine relative Perfusion unter 20% des präischämischen Blutflusses als Infarktkern definiert (z.B.: Anrather & Iadecola, 2016). Im postischämischen Areal, vor allem bei kompletter Okklusion des Gefäßes und damit absoluter Hypoxie, kommt es rasch zu

einer inflammatorischen Reaktion, im Sinne einer postischämischen Kaskade inklusive Aktivierung des Komplementsystems, Blutplättchen und Endothelzellen. Neutrophile Granulozyten wandern nach Stunden in das betroffene Gewebe ein (Iadecola et al., 2020). Wichtiger Meilenstein für die inflammatorische Reaktion ist beispielsweise die Degradierung der Blut-Hirn-Schranke, welche in zwei Schritten nach wenigen Stunden und nach etwa 24-48 Stunden vonstattengeht (Iadecola et al., 2020). Somit beginnt die inflammatorische Antwort zwar unmittelbar und entwickelt nach Stunden bis wenigen Tagen Dynamik (Dirnagl et al., 1999), die vollständige immunologische Antwort erstreckt sich allerdings über Wochen (Anrather & Iadecola, 2016).

Generell gilt: je rascher das verschlossene Gefäß rekanalisiert werden kann, desto mehr Penumbra-Gewebe kann gerettet werden. Eine gute Kollateralisierung führt zu einer größeren Penumbra und somit zu einer besseren Prognose, das Ausmaß der Kollateralisierung ist intraindividuell unterschiedlich. Es gibt Hinweise, dass es bei arteriosklerotischen Stenosen, welche über einen großen Zeitraum entstehen, zu einer zunehmenden Kollateralisierung durch neu aussprossende Gefäße kommt, welche eine verbesserte Blutzufuhr des chronisch unterversorgten Areals ermöglichen (Liebeskind, 2003). Das Ausmaß der Penumbra kann mittels computertomographischer Perfusionsbildgebung (CTP) oder Magnetresonanztomographie (MRT) eingeschätzt werden, um bei Grenzfällen eine Entscheidung zur Akuttherapie zu treffen. Je mehr Penumbra vorhanden ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven Therapieeffektes (siehe z.B.: Campbell et al., 2018; Furlan et al., 1996; Ma et al., 2019; Parsons et al., 2012). In der Akuttherapie des Hirninfarktes ist daher eine möglichst schnelle und möglichst vollständige Rekanalisation des Gefäßes anzustreben.

Hämostase

Die allgemein gelehrt Modelle der Gerinnungskaskade stellen eine deutliche Vereinfachung der komplexen Interaktionen zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen dar. Es ist wichtig sich zu verdeutlichen, dass die physiologische Hämostase, ebenso wie Fibrinolyse, dynamische Prozesse sind, welche zu jedem Zeitpunkt stattfinden, und als solche nicht exakt in verschiedene Phasen oder Schritte eingeteilt werden können. Dennoch dienen die bekannten Modelle dem wichtigen Zweck, die maßgeblichen Akteure und Interaktionen übersichtlich darzustellen. Im Folgenden werden die – für diese Arbeit – relevantesten Aspekte der Hämostaseologie dargestellt.

Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase als einleitender Schritt einer Gerinnungsreaktion, führt zur Bildung des sogenannten "weißen Thrombus", welcher hauptsächlich aus Thrombozyten besteht. Der weiße Thrombus soll das verletzte Gefäß rasch verschließen, bevor im Weiteren eine längerfristige Stabilisierung stattfindet. Unterstützend zu der Entstehung dieses Thrombus erfolgt eine lokale Vasokonstriktion (Gale, 2011). Auslösende Reize für die Thrombozytenaggregation sind eine Vielzahl von Faktoren, beispielsweise freiliegende Bindegewebsfasern, sowie weitere subendotheliale Proteine (z.B. Kollagen). Diese liegen physiologischer Weise nicht im Gefäß frei, sondern repräsentieren eine Verletzung der Gefäßwand. Weitere führende Aktivatoren sind Thrombin, ADP und Thromboxan A₂ (Tomaiuolo et al., 2017). Außerdem spielt der Von-Willebrand-Faktor eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Adhäsion der Thrombozyten (Lancellotti et al., 2019). Vernetzt werden die Thrombozyten initial durch Fibrinogen, welches dem "weißen Thrombus" seinen Namen verleiht. Der aus diesen Komponenten resultierende Thrombus wird im Rahmen der sekundären Hämostase zu einer robusteren Endform umgebaut.

Sekundäre Hämostase

Im Rahmen der sekundären Hämostase entsteht der rote Abscheidungsthrombus. Dieser ist deutlich stabiler als der weiße Thrombus. Die sekundäre Hämostase, welche vereinfachend in ein extrinsisches, sowie in ein intrinsisches System eingeteilt werden kann, wird initiiert durch die Exposition von gefäßfremdem Material (Gale, 2011). Im Rahmen der Endothelläsion führt die Ausschüttung von Tissue-Faktor, aus freiliegender glatter Muskulatur, sowie Fibroblasten, zu der Bildung des Gewebsthromboplastin-komplexes. Dieser aktiviert Faktor VII, welcher letztendlich Faktor X aktiviert. Das intrinsische System wird aktiviert durch negativ geladene Oberflächen (z.B. freiliegendes Kollagen im Rahmen der Gefäßverletzung). In der Folge wird initial Faktor XII, anschließend Kaskadenartig die Faktoren XI, IX, VIII aktiviert. Zuletzt wird in der gemeinsamen Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem System erneut Faktor X aktiviert.

Faktor Xa bildet gemeinsam mit Faktor V, sowie Ca²⁺ und Phospholipiden auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten den Prothrombin aktivierenden Komplex

(Prothrombinase) (Mann et al., 2003), sodass Prothrombin (Faktor IIa) zu Thrombin (Faktor II) aktiviert wird. Thrombin ist entscheidend für die Stabilisierung des Thrombus sowie für die weitere Rekrutierung zusätzlicher Thrombozyten. Vermittelt durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR1, PAR3, PAR4) kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Di Cera, 2008).

Entstehung des Fibrinnetzes

Die endgültige Stabilisierung des Thrombus wird durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin manifestiert. Fibrinogen ist, auf Grund seiner Rolle als „Brücke“, zwischen den Thrombozyten bereits am Thrombus gebunden. Die Umwandlung von einzelnen Komponenten des Fibrinogens zu einem Netzwerk aus Fibrin, erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird Fibrinogen zu monomeren Fibrinfasern gespalten. Enzym dieser Reaktion, mediiert mittels Aktivierung von Faktor XIII, ist Thrombin. Thrombin forciert außerdem seine eigene Aktivierung: Es aktiviert die Faktoren V, VIII und XI, sodass ein aktivierender „Feedback-Loop“ auf die Gerinnungskaskade entsteht, welches wiederum die Thrombin Generierung selbst verstärkt (Crawley et al., 2007).

Im zweiten Schritt aggregieren die so entstandenen einzelnen Fibrinfasern spontan zu Oligomeren, welche durch weitere Verknüpfungen ein dreidimensionales Netzwerk bilden (Weisel & Litvinov, 2017). Das entstehende Fibrinnetz wird durch den Einbau weiterer zellulärer Bestandteile in Form von Leukozyten sowie den, dem „roten Thrombus“ namensgebenden Erythrozyten „abgedichtet“. Je größer die Menge beteiligter Erythrozyten, desto größer sind die Poren im Fibrinnetz. Da das Fibrinnetzwerk maßgeblich für die Stabilität des Thrombus ist, führt eine geringere Dichte der Fibrinfasern vermutlich zu einer niedrigeren Stabilität des Thrombus (Carr & Hardin, 1987). Nach Bildung des Thrombus findet über mehrere Stunden die sogenannte Retraktion statt, welche weiter zur Stabilität beiträgt: Serum wird aus den Erythrozyten ausgeschieden, anschließend werden sie dicht aneinander gestaffelt gebunden (Cines et al., 2014). Die Dichte des Fibrinnetzes und der Durchmesser der einzelnen Fasern ist außerdem ein wichtiger Faktor für die Resistenz des Thrombus gegenüber der Fibrinolyse. Ein Fibrinnetz bestehend aus dünnen Fasern, welche dichter angeordnet sind, ist stabiler als ein Netzwerk dickerer, aber lockerer angeordneter Fasern (Collet et al., 2000). Thrombin und Fibrinogen scheinen auch an diesem Aspekt der Stabilität des entstehenden Thrombus beteiligt zu sein: Es wurde nachgewiesen, dass in Anwesenheit

zunehmender Konzentrationen beider Substrate, die Dichte der resultierenden Fibrinnetze steigt und dünnere Fasern entstehen (Ryan et al., 1999).

Fibrinolyse

Die Aktivierung der Fibrinolyse ist essenziell für die korrekte Therapie und Prophylaxe von Hirninfarkten. Angetrieben wird die Fibrinolyse durch die Serinprotease Plasmin. Das Zymogen Plasminogen wird hauptsächlich durch t-PA aktiviert. T-PA steht für „tissue Plasminogen Aktivator“ oder zu Deutsch: „gewebespezifischer Plasminogenaktivator“. Der weitere physiologisch gebildete Plasminogen Aktivator ist die im Harntrakt nachzuweisende Urokinase (u-PA). Die Produktion von t-PA erfolgt hauptsächlich in Endothelzellen, insbesondere in denen kleinerer Gefäße. Die Bildung von t-PA wird hauptsächlich lokal stimuliert, zum Beispiel durch Thrombinaktivität, aber auch physikalisch durch Scherspannung (Miszta et al., 2021). Vor allem lokal vorhandenes Fibrin wirkt als exponentieller Verstärker der Wirksamkeit von t-PA auf Plasminogen (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005): In Anwesenheit dieser drei Substrate wird die fibrinolytische Aktivität um das 100-1000-fache gesteigert. Eine überschießende systemische Fibrinogenese wird hierdurch vermieden.

Der Plasminogenaktivator Inhibitor-1 (PAI-1) ist der prominenteste Gegenspieler dieser Mechanismen: er ist der wichtigste physiologische Inhibitor für die Aktivierung von t-PA und wird sezerniert aus Endothelzellen und Thrombozyten, aber wird auch hepatisch sowie im Fettgewebe gebildet (Vaughan, 2005). Plasmin ist im zweiten Schritt der Fibrinolyse verantwortlich für die Spaltung von Fibrin. Es inaktiviert neben diesem „Hauptmechanismus“ vermutlich auch Faktor V und Faktor VIIIa (Chapin & Hajjar, 2015) und hemmt so zusätzlich die Koagulationskaskade. Der Einbau von Erythrozyten in den Thrombus steigert die Resistenz gegenüber der Fibrinolyse, vermutlich da diese die Menge freiliegenden Fibrins verringern und damit die Angriffsfläche für t-PA und Plasminogen reduzieren. Im experimentellen Vergleich zwischen physiologischen und Erythrozyten freien Thromben, sank die Menge aktivierten Plasmins um bis zu 45% (Wohner et al., 2011).

Sekundärprophylaxe des Hirninfarktes

Blutgerinnungsmodulierende Therapeutika sind zentral für die medikamentöse Therapie und Prophylaxe des Hirninfarktes. Präventiv werden Thrombozytenaggregationshemmer (TAG) wie Aspirin (ASS), Clopidogrel und Prasugrel eingesetzt. Sie sollen vor allem die

thrombotische bzw. arteriosklerotische Form des Hirninfarktes verhindern. TAG können als Mono und Kombinationstherapie eingesetzt werden (zum Beispiel zur Prophylaxe von Stentthrombosen).

Inhibitoren der sekundären Hämostase, eingesetzt als Prophylaxe vor allem gegen kardial embolische Infarkte, sind Vitamin K Antagonisten (Warfarin oder Phenprocoumon), sowie direkte orale Antikoagulanzen (DOAKs). Diese Gruppe besteht aus Faktor Xa Hemmern (Apixaban, Rivaroxaban und Edoxaban) und dem Thrombininhibitor Dabigatran. Je nach Risikoprofil können TAG mit DOAKs oder Vitamin K-Antagonisten kombiniert werden, wobei eine individuelle Risiko-Nutzen Abwägung erfolgen sollte.

Heparine werden im Kontext des Hirninfarktes in der Regel nur vorübergehend vor Etablierung einer oralen Therapie eingesetzt, da sie im Falle einer Blutungskomplikation eine verhältnismäßig schnelle Normalisierung der Blutgerinnung erlauben. Sie wirken vor allem mittels Hemmung der Gerinnungsfaktoren IIa und Xa.

Akuttherapie des Hirninfarktes: Intravenöse Thrombolyse

Eine akute arterielle Thrombose oder Embolie führt rasch zum Gewebeuntergang. Besonders im Fall von Hirninfarkten ist, auf Grund der besonderen Vulnerabilität von Hirngewebe und dem Ausmaß der potentiellen Folgeschäden, eine rasch eingeleitete und u.U. aggressive Behandlung indiziert. Der Goldstandard für die medikamentöse Behandlung eines akuten ischämischen Infarktes ist die intravenöse (i.v.) Thrombolyse. In der Regel wird hierzu als Fibrinolytikum rt-PA (Actilyse®) eingesetzt, eine mögliche Alternative ist Tenecteplase (Metalyse®, TNK). Vor Applikation einer i.v.-Thrombolyse muss die Indikation auf Grund der Möglichkeit von Blutungskomplikationen sorgfältig geprüft werden.

Die wichtigsten Faktoren, die in die Stellung der Indikation einfließen sind:

1. Die Ausprägung der Symptomatik
2. Die Zeit seit Beginn der Symptomatik
3. Mögliche Kontraindikationen

1. Ausprägung der Symptomatik:

Zur Beurteilung der Relevanz der gezeigten Symptomatik wird als Hilfsmittel meist die National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) verwendet, welche eine validierte prädiktive Beurteilung der Schwere des Infarktes ermöglicht (Muir et al., 1996, Weimar et al., 2004).

Allgemein gilt das Erreichen eines NIHSS Scores von 4 oder mehr, als ausreichende Schwere der Symptomatik, für die Indikationsstellung zur Thrombolyse. Bei Bestehen eines deutlich behindernden Defizits und einem NIHSS unter 4 kann allerdings ebenfalls eine Lysetherapie indiziert sein (Powers et al., 2019). Beispielsweise wird eine isolierte hochgradige Beinparese mit einem NIHSS von 3 beziffert, stellt aber in der Regel dennoch eine Indikation für eine i.v.- Thrombolyse dar. Außerdem hat der NIHSS bei bestimmten Infarktlokalisationen Schwächen: Infarkte im hinteren Stromgebiet, also im Hirnstamm oder zerebellär, können oft mit Schwindel, Übelkeit und Erbrechen einhergehen. Diese Symptome werden nicht im NIHSS erfasst, können aber einzige Symptome eines potentiell lebensbedrohlichen raumfordernden Infarktes sein.

Eine systemische Thrombolyse bei zu erwartendem geringgradigem Defizit wird aktuell nicht empfohlen. Zwar wurden in einigen Studien leicht positive Auswirkungen bezüglich der klinischen Outcomes beschrieben wurden (Emberson et al., 2014), andere Studien wurden bei fehlender Wirksamkeit abgebrochen (Khatri et al., 2018). Es konnte daher bisher nicht ausreichend belegt werden, ob bei nur geringgradigen Symptomen die Risiken der Behandlung durch die möglichen Outcome Verbesserungen aufgewogen werden. Ergänzend zu dem NIHSS wird meist der modified Rankin Score (mRS) erhoben. Der mRS dient der Einschätzung der Schwere der Gesamtsymptomatik und ist in insgesamt sechs Stufen, von 0 (keine Symptomatik), bis 6 (Patient verstorben), eingeteilt. Der mRS gilt als zuverlässiger Parameter für eine auf die Gesamtbehinderung bezogene Einschätzung der Therapieeffektivität (Banks & Marotta, 2007) und wird daher häufig als langfristiger Verlaufparameter eingesetzt.

2. Die Zeit seit Beginn der Symptomatik

Orientierend gilt ein Zeitfenster von 4,5 Stunden nach Symptombeginn (Hacke et al., 2008), in welchem die Indikation für die Durchführung einer i.v.-Thrombolyse gestellt werden kann. Allerdings sorgen verbesserte diagnostische Mittel, zum Beispiel die zunehmenden Möglichkeiten zur differenzierten Akutbildgebung mittels multimodaler

CT (CT nativ, CT-Angiographie und CT-Perfusion) oder MRT (Ma et al., 2019) für eine exaktere Darstellung von vitalem, bereits untergegangenem und bedrohtem Gewebe. Daher kann zum Teil auch bei unklarem Zeitfenster, aber ausgeprägtem „Mismatch“ zwischen bedrohtem und untergegangenem Gewebe, eine i.v.-Thrombolyse erfolgen. Für eine flächendeckende zusätzliche Erweiterung des Zeitfensters für die i.v.-Thrombolyse besteht aber aktuell keine ausreichende Studienlage.

3. Mögliche Kontraindikationen:

Die wichtigste Nebenwirkung der systemischen Thrombolyse ist das Risiko von Blutungskomplikationen. Diese können selbstverständlich systemisch auftreten, ein besonderes Augenmerk ist auf intrazerebrale Blutungen zu richten, da infarziertes Hirngewebe besonders vulnerabel für Einblutungen ist und intrazerebrale Blutungen rasch lebensbedrohlich werden können. Es gibt aber ebenfalls Hinweise darauf, dass auch die Vulnerabilität von vitalem Hirngewebe durch t-PA zunimmt, und dass t-PA weitere zerebrale Wirkungen hat, wie zum Beispiel eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Medcalf, 2017). Daher gelten eine Reihe von Kontraindikationen und Empfehlungen für die Lysetherapie, welche das Risiko von Blutungskomplikationen minimieren sollen. Einige wichtige Beispiele sind eine kürzlich durchgeführte Operation, ein Tumorleiden oder eine Blutungsneigung, sei diese im Rahmen einer Vorerkrankung oder iatrogen z.B. durch die Therapie mit Blutgerinnungshemmern. Das Alter des Patienten ist nicht mehr als signifikante Kontraindikation für eine Lysetherapie anzusehen, die aktuelle Leitlinie empfiehlt eine altersunabhängige Behandlung innerhalb eines 4,5 Std. Zeitfensters (Ringleb et al. 2021).

Zusammenfassend ist die Indikationsstellung einer i.v.-Thrombolyse eine komplexe Abwägung multipler Faktoren, in welcher das zu erwartende funktionelle Defizit ohne therapeutisches Eingreifen, dem Risiko einer Blutungskomplikation gegenübersteht. Die Indikationsstellung erfolgt individuell und sollte mit dem Patienten, oder falls dies nicht möglich ist, mit den Angehörigen des Patienten, diskutiert werden. Die Entscheidungsfindung kann im klinischen Alltag eine Herausforderung darstellen da diese, um die maximal mögliche Menge bedrohten Gewebes zu retten („Time is Brain“), sowohl gründlich als auch so schnell wie möglich erfolgen muss.

Im Rahmen der beschriebenen Richtlinien können nur wenige - zum Teil wird von nur ca. 3,5% gesprochen (Nasr et al., 2013) - der Patienten, welche einen Hirninfarkt erleiden,

mit i.v.-Thrombolyse behandelt werden. Eine Verbesserung sowohl der Effektivität als auch des Zugangs zu der Thrombolyse sind daher von großer Bedeutung. Angesichts einer alternden und zunehmend mit Vorerkrankungen belasteten Bevölkerung ist außerdem eine Verbesserung der Nebenwirkungsrate der systemischen Thrombolyse von großer Wichtigkeit, um so viele Patienten wie möglich behandeln zu können.

Recombinant tissue Plasminogen Activator (Alteplase, rt-PA, Actilyse®)

Der Goldstandard für die systemische Thrombolyse von akuten Hirninfarkten ist aktuell der sogenannte rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator, kurz rt-PA (recombinant tissue Plasminogen Activator) (Powers et al., 2019).

rt-PA ist eine synthetisch hergestellte Version des physiologisch aus Endothelzellen freigesetzt werdenden t-PA und wirkt analog zu diesem. Es hat eine Halbwertszeit von 4-9 Minuten (Bell, 2002) und wird beim Hirninfarkt mit einer Dosierung von 0,9 mg/kg Körpergewicht verabreicht (maximal 90 mg). Zehn Prozent der gesamten Dosis werden als Bolus gegeben und der Rest über eine Dauerinfusion im Laufe der folgenden Stunde. Bei der Einführung revolutionierte rt-PA die Therapie des akuten Hirninfarktes und zeigte eine deutliche Verbesserung des Outcomes nach drei Monaten. Die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten wieder komplett symptomfrei wurden, oder nur minimale Defizite aufwiesen, war ca. 30% höher als in der Placebogruppe (National Institute of Neurological Disorders, 1995) Die Art der Anwendung wurde, bis auf die bereits erwähnte Erweiterung des Therapiezeitfensters, seither nicht grundlegend verändert. In einer Studie war eine alternative Dosierung von 0,6 mg/kg Körpergewicht nicht der Standarddosierung unterlegen (Anderson et al., 2016). Aufgrund des homogenen Patientenstamms (63% asiatische Teilnehmer) hat sich bisher weiterhin die Dosierung von 0,9 mg/kg Körpergewicht durchgesetzt, der Einsatz alternativer Dosierungen wird nicht empfohlen.

In vivo Studien bezüglich der rt-PA Konzentration nach i.v.-Lysetherapie sind nur spärlich vorhanden. Tanswell et al. gingen von einer Konzentration von ca. 3 µg/ml aus, sie bezogen sich jedoch auf Patienten, die aufgrund eines Myokardinfarktes behandelt worden waren (Tanswell et al., 1992). Es wurde daher eine deutlich höhere Dosierung (100 mg insgesamt, davon 15 mg als Bolus, dann 50 mg mittels Dauerinfusion binnen 30 Minuten, danach 35 mg über Perfusor binnen 1 Std.), als die beim Hirninfarkt üblichen 0,9 mg/kg verwendet. Diese überschreitet die maximal mögliche rt-PA Dosierung bei

einem >100 kg schweren Patienten um 10 mg. Außerdem wurden nur vier Patienten untersucht. Berechnet man die vermutete Konzentration nach Infusion von 0,9 mg/kg Körpergewicht im Blut mittels der Nadler Formel (vermutetes Blutvolumen eines Durchschnittspatienten (Nadler et al., 1962), ist bei einem Patientengewicht von 70 kg und einem Blutvolumen von 5000 ml eine Konzentration von ca. 12,6 µg/ml zu erwarten. Diese Berechnung beinhaltet allerdings selbstverständlich keine pharmakodynamischen Prozesse.

Tenecteplase (TNK, Metalyse®): Entwicklung und Applikation

Tenecteplase (kurz: TNK) ist ein Fibrinolytikum, welches für die Therapie des akuten Myokardinfarktes eingeführt und zugelassen wurde. Insbesondere präklinisch und bei fehlender zeitnaher (<120 min) Möglichkeit einer perkutanen Koronarintervention ist TNK für eine systemische Lysetherapie wertvoll (Bivard et al., 2022). Aufgrund seines pharmakologischen Ursprungs und der damit einhergehenden pharmakologischen Eigenschaften ist es aber als Therapeutikum im Rahmen aller anderen Indikationen einer i.v.-Thrombolyse, wie zum Beispiel der Lungenembolie (Kline et al., 2014), (Zhang et al., 2022), oder eben des Hirninfarktes, interessant.

TNK wurde im Vergleich zu rt-PA auf molekularer Ebene an drei Stellen modifiziert. Es hat aufgrund dieser Modifikationen eine ca. 14-15-fach erhöhte Bindungsspezifität zu Fibrin und eine ca. 80-fach erhöhte Resistenz gegenüber PAI-1. Der Verbrauch von Fibrinogen, Plasminogen und α 2-Antiplasmin ist aufgrund der beschriebenen Eigenschaften niedriger, sodass der systemische fibrinolytische Effekt von TNK sinkt. Außerdem weist TNK im Vergleich zu rt-PA eine deutlich längere Halbwertszeit von ca. 22 Minuten auf (Logallo et al., 2014), (Tanswell et al., 2002). Die längere Halbwertszeit von TNK ermöglicht die vollständige Verabreichung als Bolus-Infusion, dies könnte möglicherweise Komplikationen bei der Applikation reduzieren. Insgesamt sollen diese Verbesserungen im Vergleich zu rt-PA eine verbesserte Effektivität der Thrombolyse und eine niedrigere Rate an Blutungskomplikationen bewirken.

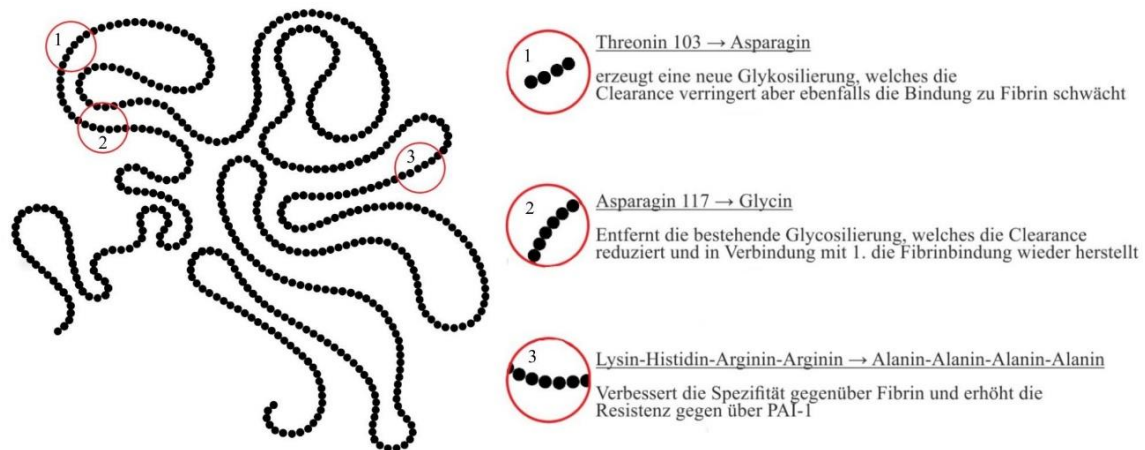


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Moleküls Tenecteplase. Herausgehoben (rote Kreise) die drei im Vergleich zu rt-PA modifizieren Loci und die dadurch verursachte Modifikation der pharmakologischen Wechselwirkungen. Struktur des Moleküls angelehnt an Tanswell et al. (Tanswell et al., 2002)

Tenecteplase: mit rt-PA vergleichende Studien

In präklinischen Studien hatten sich bezüglich der gewünschten Vorteile gute Ergebnisse gezeigt (z.B.: (Thomas et al., 1994). Klinische Studien konnten diese bisher nur zum Teil bestätigen. Placebo-verglichene Kontrollgruppen wurden aus ethischen Gründen nicht durchgeführt. In allen relevanten klinischen Studien wurde TNK in unterschiedlichen Dosierungen gegen rt-PA (0,9 mg/kg) als Vergleichsgruppe untersucht. Eine frühe klinische Studie verglich Dosierungen von 0,1 mg/kg KG und 0,25 mg/kg KG mit rt-PA. Beide Gruppen zeigten eine Verbesserung des kurzfristigen Outcomes, allerdings zeigte nur die höhere Dosierung nach 90 Tagen in relevantem Ausmaß bessere Ergebnisse (Parsons et al., 2012). Man fand für keine Dosismenge ein vermehrtes Auftreten von Blutungskomplikationen. Die Studie beinhaltete allerdings eine geringe Fallzahl (n=25 pro Gruppe). Außerdem wurden Patienten mittels CT-Perfusion ausgewählt, welches die Sicherheit weiter erhöht. Die ATTEST Studie benutzte 0,25 mg/kg TNK und konnte 24-48 Stunden nach Applikation der Therapie keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu rt-PA bezüglich geretteten Penumbra-Gewebes nachweisen. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl schwerer Nebenwirkungen zeigte sich ebenfalls nicht. ATTEST rekrutierte insgesamt eine Fallzahl von n=104 (Huang et al., 2015). Eine Phase IIb/III Studie (Haley et al., 2010) wurde aufgrund geringer Fallzahlen vorzeitig beendet.

Es hatten sich in der 0,4 mg/kg Gruppe bereits nach 73 Patienten erhöhte Raten an Hirnblutungen gezeigt, außerdem war die 0,4 mg/kg Gruppe den niedrigeren Dosierungen unterlegen (n für 0,4 mg/kg = 19). Zwischen den übrigen Gruppen (0,1 mg/kg und 0,25 mg/kg) und der rt-PA Gruppe hatten sich nach drei Monaten keine deutlichen Unterschiede im Outcome gezeigt. Allerdings hatte auch diese Studie eine geringe Stichprobengröße (Die Studie wurde nach Einschluss von 112 Patienten terminiert). Aus infrastrukturellen Gründen wurde in einigen Zentren in Neuseeland die Routine-i.v.-Thrombolyse vollständig auf TNK umgestellt. Eine Observationsstudie zeigte vergleichbare Ergebnisse bezüglich der gesamt Outcomes im Vergleich zu rt-PA (Zhong et al., 2021).

Die bisher größte klinische Studie (n=1107), die TNK und rt-PA verglich, ist die NOR-TEST (Norwegian Tenecteplase Stroke Trial) Studie, welche TNK 0,4 mg/kg als Dosierung einsetzte (Logallo et al., 2017). In dieser Studie wurde nur die native CT als bildgebendes Auswahlkriterium eingesetzt, ansonsten gab es bei bestehender Indikation für eine Thrombolyse deutlich weniger Ausschlusskriterien als bei den bisher erwähnten Studien. Beispielsweise wurden auch Patienten über 80 Jahre und mit wenig schwerer Symptomatik in die Studie einbezogen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Erreichens eines sehr guten Outcomes (definiert als mRS ≤ 1 drei Monate nach Behandlung). Ebenfalls zeigten sich keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Blutungskomplikationen. Insgesamt traten in beiden Gruppen deutlich weniger Hirnblutungen auf als in anderen klinischen Studien. Nachteilig bezüglich NOR-TEST ist das formulierte Primärziel eines deutlich verbesserten „excellent outcome“ (es wurde ausschließlich mRS zur Abschätzung der Verbesserung eingesetzt). Dies spiegelt wenig zuverlässig die tatsächliche Effektivität einer Therapie wider, vor allem aufgrund der hohen Anzahl gering betroffener Patienten (der mediane NIHSS zu Beginn war 4), welche auch vor der Behandlung bereits einen niedrigen mRS aufwiesen. Zudem waren ein großer Anteil transitorischer ischämischer Attacken (TIA) und „stroke mimics“ in die Studie eingeschlossen. Insgesamt wurde bei 190 der untersuchten Patienten letztendlich eine andere Diagnose als Hirninfarkt oder TIA gestellt.

Die EXTEND-IA TNK Studie lieferte erstmalige Hinweise, dass die Wahl von Tenecteplase als Thrombolytikum vor der Thrombektomie zu besseren Ergebnissen führt (Campbell et al., 2018). Die TNK-Gruppe wies bessere Reperfusionraten und ein besseres Outcome nach 90 Tagen auf als die rt-PA Vergleichsgruppe. Die Anzahl

symptomatischer intrakranieller Blutungen unterschied sich nicht signifikant. Die Anzahl der Patienten, welche erneut „independent function“ erreichten (mRS 0-2 oder auf dem gleichen Niveau wie zuvor), war in der TNK-Gruppe größer, die Differenz war aber nicht signifikant. Auch diese Studie hatte nur eine relativ geringe Probandenzahl (n=202). In einer Metaanalyse vier klinischer Studien, inclusive EXTEND-IA (n^{gesamt}=433) zeigten sich sowohl die Rekanalisationsraten als auch das klinische Outcome verbessert. Die Studien wiesen zudem nur eine geringe Heterogenität der Ergebnisse auf (Katsanos et al., 2021). Es wird vermutet, dass TNK auf Grund der Art seiner Administration als Bolusinfusion eine schnellere und effektivere mechanische Rekanalisation begünstigt. Eine Studie, welche spezifisch die interventionelle Behandlung von Basilarisverschlüssen untersuchte, wies nach der Behandlung mit TNK eine deutlich verbesserte Rekanalisationsrate (26% gegenüber 9% für rt-PA) nach (Alemseged et al., 2021). Schwächen dieser Studie waren ein kleines Patientenkollektiv von insgesamt 110 Patienten; von diesen wurden zudem nur 19 mit TNK behandelt, die „thrombolysis to arterial puncture time“ war außerdem in der TNK-Gruppe deutlich niedriger als in der rt-PA-Gruppe.

Tenecteplase: Aktuelle Anwendung und Herausforderungen:

Aktuell kann TNK als Alternative zu rt-PA alleine und gemeinsam mit der Thrombektomie verwendet werden (jeweils Klasse IIb Evidenz) (Powers et al., 2019). Die vorhandenen klinischen Studien zu Tenecteplase verwendeten, wie bereits erwähnt, verschiedene Dosierungen im Bereich von 0,1 mg/kg KG bis 0,4 mg/kg KG. Die äquivalente Konzentration von Tenecteplase im menschlichen Körper bei diesen Dosierungen, berechnet mit der Nadler Formel (Nadler et al., 1962), beträgt zwischen 1,4 µg /ml (0,1 mg/kg KG) und 5,6 µg /ml (0,4 mg/kg KG). Systematische Messungen der tatsächlichen Serumkonzentration von TNK nach *in vivo* Lysetherapie sind dem Autor nicht bekannt. Eine deutliche Überlegenheit von 0,4 mg/kg, oder eine signifikante Unterlegenheit von 0,25 mg/kg gegenüber 0,4 mg/kg wurde bisher insgesamt nicht nachgewiesen (Dong et al., 2022). Zuletzt (Mai 2022) wurde allerdings die NORTEST 2 Studie aufgrund erhöhter Inzidenzen von Blutungen in der TNK-Gruppe (0,4 mg/kg) vorzeitig abgebrochen (Kvistad et al., 2022). Es ist eine Nachfolgestudie mit einer niedrigeren Dosierung geplant.

Die TASTE-a (Bivard et al., 2022) Studie wird erstmals den Einsatz von TNK im Einsatz in „mobilen Stroke Units“ untersuchen. Dies sind spezielle Rettungswagen, welche

ausgestattet sind mit der Möglichkeit einer CT-Bildgebung. Es wird erwartet, dass eine simplere Applikation von TNK im präklinischen Setting einen Benefit darstellen könnte, zum Beispiel, da nach der Bolusgabe kein gesonderter intravenöser Zugang für die Lysetherapie vonnöten ist. Zudem wird aktuell untersucht, ob eine Erweiterung des Zeitfensters für die Behandlung mit TNK zu einem verbesserten Outcome führt. Beispiele sind die TIMELESS (U.S. National Library of Medicine, TIMELESS) und TEMPO (U.S. National Library of Medicine, TEMPO-2) Studien.

Zusammenfassend besteht bezüglich der Effektivität und Sicherheit von TNK im Vergleich zu rt-PA noch weiterer Studienbedarf. Fast alle bisherigen Studien ergaben, dass TNK in der Wirksamkeit nicht unterlegen ist. Der Nachweis einer umfassenden Überlegenheit konnte bisher aber nicht erbracht werden. Viele klinische Studien sind von Seiten der Stichprobengröße defizitär. Außerdem wird die vergleichende Analyse der vorhandenen Studien durch die sehr unterschiedliche Herangehensweise bezüglich der definierten Endpunkte der jeweiligen Studie - sowie der Einschlusskriterien - erschwert.

Andere Thrombolytika

Versuche weitere alternative Thrombolytika wie z.B. Desmoteplase und Streptokinase einzusetzen, waren bisher nicht erfolgreich. Es konnten in klinischen Studien keine signifikanten Vorteile gegenüber rt-PA festgestellt werden, teilweise zeigten sich erhöhte Mortalitätsraten (von Kummer et al., 2016), (Donnan et al., 1996). Daher kommt diesen alternativen Thrombolytika klinisch aktuell keine Relevanz zu.

Akuttherapie des Hirninfarktes: Mechanische Thrombektomie

Die mechanische Thrombektomie bietet die Möglichkeit, schwere Hirninfarkte effektiv zu behandeln (Smith et al., 2005). Die Thrombektomie kann, falls für eine Thrombolyse Kontraindikationen bestehen (z.B. therapeutische Antikoagulation), auch ohne systemische Thrombolyse eingesetzt werden. Zusätzlich kann sie in einem längeren Zeitfenster im Vergleich zu rt-PA verwendet werden. Allerdings gelten für die Thrombektomie ebenfalls strenge Auswahlkriterien. Sie erfordert einen proximalen Gefäßverschluss, um technisch überhaupt möglich zu sein. Die DAWN (Nogueira et al., 2018) und DEFUSE (Albers et al., 2018) Studien konnten nachweisen, dass auch Patienten mit einem erweiterten Zeitfenster, bis zu 24 Std. nachdem der Patient zuletzt symptomfrei gesehen worden war, erfolgreich behandelt werden können. In diesen

Studien wurden Patienten allerdings nur bei entsprechend schwer ausgeprägter Symptomatik und verhältnismäßig geringem Infarktkern eingeschlossen.

Diese Patienten können nur mit den entsprechenden Ressourcen zur bildgebenden Diagnostik (CTP, MRT) aus dem gesamten Patientenkollektiv gefiltert werden, welche aber nicht in allen Kliniken vorhanden sind. Zudem ist in vielen kleineren Kliniken entsprechend geschultes Personal nicht vorhanden. Mittels Thrombektomie werden in der Regel Verschlüsse der Arteria carotis interna (ACI) oder der proximalen Arteria cerebri media (ACM) behandelt (Albers et al., 2018; Nogueira et al., 2018). Studien bezüglich der Effektivität von weiter distal gelegenen Verschlüssen, bzw. der mechanischen Thrombektomie im hinteren Stromgebiet, scheinen allerdings insgesamt auf positive Outcome-Ergebnisse hinzuweisen (Memon et al., 2021). Verschlüsse der A. basilaris sind hier, angesichts der sehr schlechten Prognose ohne Behandlung, besonders hervorzuheben (Meinel et al., 2019).

Dennoch kommt die Thrombektomie nur einer geringen Anzahl an Patienten zugute. In vielen Fällen kann eine Lysetherapie bereits in einem peripheren Krankenhaus erfolgen, bevor eine Weiterverlegung zur Thrombektomie erfolgt. Im Idealfall wird die Thrombektomie direkt im Anschluss zur oder gleichzeitig mit der systemischen Thrombolyse durchgeführt. Sie ist daher als Ergänzung und nicht als Ersatz für die i.v.-Thrombolyse anzusehen.

Sonothrombolyse: Mechanistische Grundlagen

Ultraschall führt mittels reversibler Lockerung des Fibrinnetzes zu einer größeren Suszeptibilität für weitere Abbauprozesse, in der Literatur wird eine Vielzahl von ursächlichen Mechanismen diskutiert. In erster Linie relevant sind Kavitationseffekte, welche den Effekt des Ultraschalls auf kleinste flüssige oder gasförmige Vesikel („Microbubbles“) im Gewebe beschreiben. Diese sind in zwei hauptsächliche Mechanismen einzuteilen:

1. Stabile Kavitation („stable cavitation“) beschreibt eine regelmäßige, oszillierende Größenveränderung der Vesikel als Reaktion auf den durch Ultraschall ausgelösten akustischen Druck, welcher Flusseffekte im betroffenen Gewebe erzeugt (z.B. „Micro Streaming“) (Miller et al., 1996).

2. „Inertial cavitation“, welches als „Trägheitskavitation“ übersetzt werden kann, beschreibt eine durch die ultraschallbedingte Größenzunahme ausgelöste Instabilität der Bubble; letztere implodiert und setzt hierbei Energie frei (Miller et al., 1996).

Stabile Kavitation ist die effektivere Form der Kavitation. Ursächlich scheint, dass sie über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann und zu keinem „Verbrauch“ der anwesenden Bubbles führt (Datta et al., 2006). Zudem ist zu vermuten, dass „inertial cavitation“ *in vivo* zu Endothelschäden führen kann und daher zu vermehrten Nebenwirkungen führt. Kavitationsphänomene korrelieren antiproportional mit der applizierten Frequenz, sodass eine höhere Ultraschallfrequenz eine geringere Wirksamkeit der Sonothrombolyse bedeutet (Miller et al., 1996)

In der Literatur finden sich zudem Hinweise, dass Ultraschall Erythrozyten aus dem Thrombus entfernt und ihn damit auflockert (Auboire et al., 2017). Ein weiterer Effekt, welcher rein mechanistisch die Thrombolyse unterstützen könnte, ist eine lokale Erhöhung der Temperatur, dieser Mechanismus spielt allerdings offenbar eine untergeordnete Rolle. Zudem besteht die Gefahr einer Gewebeverletzung bei übermäßiger Erhitzung, sodass der therapeutische Nutzen dieses Effektes begrenzt ist (Sakharov et al., 2000).

Behandelt man thrombotisches Material mit Ultraschall, kommt es zu einer reversiblen Disaggregation der Fibrinfasern, sodass ein tieferes Eindringen des Fibrinolytikums in den Thrombus möglich wird (Francis et al., 1995). Zusätzlich vergrößert sich die Oberfläche des Thrombus, an die das eingesetzte Thrombolytikum binden kann (Meairs et al., 2012). Die Lockerung des Fibrinnetzes ist bei alleiniger Behandlung mit Ultraschall nur von kurzer Dauer, bevor das Fibrinnetz wieder den Ausgangszustand erreicht, in Kombination mit medikamentöser Thrombolyse wird das Fibrinnetz aber irreversibel gelockert (Masomi-Bornwasser et al., 2017). Petit et al. stellten mittels *in vitro* Untersuchungen ergänzend fest, dass Sonothrombolyse ohne medikamentöse Thrombolyse eine Kompression der Fibrinfasern und das Ausschwemmen von Erythrozyten aus dem Thrombus bewirkte. Eine Degradation des Fibrinnetzes konnten sie aber ebenfalls nur in Kombination medikamentöser Thrombolyse nachweisen (Petit et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung der Sonothrombolyse ist die zusätzliche Applikation von künstlichen Echosignalverstärkern (oder „Microbubbles“). Dies sind

synthetisch hergestellte Bläschen, welche aus Lipiden, Albumin oder Galactose bestehen können. Ihre Größe variiert im Bereich von 0,5 bis 5 μm (Meairs et al., 2012). Echosignalverstärker wirken als zusätzlich verfügbares Medium für Kavitationseffekte, können somit Menge und Intensität lokaler Kavitationseffekte erhöhen und sollen damit die Wirksamkeit der Sonothrombolyse maximieren (Lu et al., 2016; Meairs et al., 2012). Klinische Studien, welche die Sicherheit und Effizienz von Echosignalverstärkern demonstrieren sollen, existieren allerdings nur in kleinerem Ausmaß (Molina et al., 2009).

Zusammenfassend führt Ultraschall, mittels verschiedener Mechanismen, zu einer Lockerung des Fibrinnetzes. Diese ist reversibel, kann aber mittels medikamentöser Thrombolyse als „Einfallstor“ genutzt werden um eine irreversible Degradation des Fibrinnetzes zu bewirken. Das Reduzieren der eingesetzten Frequenzspektren kann die Effektivität von STL vergrößern. Es resultiert allerdings ein höherer Anteil an „inertial cavitation“ und die erhöhte Gefahr einer Verletzung des beschallten Gefäßes. Bei zu niedrigen Frequenzen sind *in vivo* in der Folge vermehrt Blutungskomplikationen zu erwarten.

Sonothrombolyse: Klinische Evidenz

Trotz der höheren Effektivität von niedrigeren Frequenzen *in vitro*, spielt low frequency STL in der klinischen Praxis aktuell keine Rolle mehr. Dies ist bedingt durch eine erhöhte Rate von Nebenwirkungen in klinischen Studien. So musste z.B. die TRUMBI Studie (Daffertshofer et al., 2005), welche mit einer Frequenz von 300 kHz arbeitete, aufgrund einer großen Menge aufgetretener intrazerebraler Blutungen abgebrochen werden. Für die STL wird daher in der Regel nur noch „diagnostischer“ Ultraschall eingesetzt (Blanco & Abdo-Cuza, 2018). Um eine ausreichende Beschallung des Thrombus zu ermöglichen, muss zudem der zu behandelnde Gefäßabschnitt ausreichend sonographisch darstellbar sein, sodass peripherere Gefäßverschlüsse herausfordernd zu behandeln sind.

Klinische Studien zum Thema Sonothrombolyse zeigen bisher allenfalls leichtgradige Verbesserungen des Outcomes. Die CLOTBUST Studie (Alexandrov et al., 2004) konnte eine signifikante Zunahme der Gefäßrekanalisationen, aber in nicht signifikantem Ausmaß klinische Verbesserungen nachweisen. Eggers et al. (Eggers et

al., 2008) konnten kurzfristige Verbesserungen in der Ultraschallgruppe darstellen. In der langfristigen Analyse (nach 90 Tagen) zeigte sich allerdings keine signifikante Verbesserung des Outcomes. Beide Studien schlossen nur eine geringe Anzahl an Patienten ein (CLOTBUST n=126, Eggers et al. n=42), außerdem wurden in beiden Studien nur Patienten mit akuten Mediaverschlüssen untersucht, welche überwiegend klinisch schwer betroffen waren (medianer NIHSS 18, mRS 5 bei Eggers et al. und NIHSS >10 bei 83% der in CLOTBUST eingeschlossenen Patienten). In einer Subgruppenanalyse von CLOTBUST zeigte sich eine Verbesserung der Rekanalisationsrate, sowie des klinischen Outcomes im Sinne einer „functional independence“, also einer Unabhängigkeit von Pflegemaßnahmen (mRS 0-1). Die Patienten in dieser Subgruppe waren allerdings alle schwer betroffen (NIHSS >10 Punkte) und wiesen proximale Verschlüsse eines großen hirnversorgenden Gefäßes auf (Barlind et al., 2014).

Andere Studien wiesen Schwächen im Design auf: In einer Metaanalyse von 10 Phase II-Studien, in welchen Patienten mit sichtbaren intrakraniellen Verschlüssen mit Sonothrombolyse behandelt wurden (n=345), zeigte sich eine Verdoppelung der Rekanalisationsraten und Verbesserung des klinischen Outcomes (mRS \leq 2). Die in dieser Metaanalyse gepoolten Studien hatten allerdings einzeln gesehen kleine Stichprobengrößen und waren nicht doppelblind randomisiert. Zudem gab es oft keine Nachsorge bezüglich des längerfristigen klinischen Outcomes der Patienten (Saqqur et al., 2014).

Die aktuell größte klinische Studie zur Sonothrombolyse „CLOTBUST-ER“ (Alexandrov et al., 2019) war eine doppelblinde, randomisierte Phase-III-Studie mit einer Vergleichsweise hohen Probandenzahl (n=676). Der primäre klinische Endpunkt (Verbesserung des mRS nach 90 Tagen) konnte nicht erreicht werden. Auch von Seiten der weiteren klinischen Endpunkte, z.B. Verbesserungen des mRS nach 7 Tagen und des NIHSS nach 7 und 90 Tagen, war keine signifikante Differenz zwischen den Versuchsgruppen nachzuweisen. Ein Nachteil der CLOTBUST-ER Studie war, dass die Darstellung eines proximalen Gefäßverschlusses mittels CT-Angiographie für den Studieneinschluss nicht notwendig war. Stattdessen wurde die Schwere der klinischen Symptomatik als Parameter für den Einschluss in die Studie eingesetzt. Somit ist nicht sicher, dass bei allen Patienten wirklich thrombotisches Material beschallt wurde. Zusätzlich wurde von den Kollegen eine fest am Kopf montierte Schallsonde eingesetzt,

bei welcher der Untersucher nach dem Anbringen keinen weiteren Einfluss auf die Ausrichtung der Beschallung hatte und damit keine gegebenenfalls erforderliche Nachjustierung ausüben konnte. Bezüglich der Sicherheit der Studie waren mit den eingesetzten diagnostischen Ultraschalleinstellungen (2 MHz, spatial peak temporal average intensity 207 mW/cm², average power 32 mW), keine erhöhten Blutungsraten zu beobachten.

In einer Metaanalyse von sieben randomisierten kontrollierten Studien wurde eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit der Gefäßrekanalisation beobachtet, klinisch war aber keine signifikante Besserung der Outcomes festzustellen (Tsivgoulis et al., 2021). Insgesamt sind weitere Studien der STL notwendig, als Nachfolge von CLOTBUST-ER wurde beispielsweise die TRUST Studie (NCT03519737) konzipiert. Es soll der Effekt der Sonothrombolyse bei Patienten mit großkalibrigen Gefäßverschlüssen untersucht werden, welche in eine größere Klinik sekundärverlegt werden müssen, um ihnen eine mechanische Thrombektomie zu ermöglichen.

Zusammenfassend kann die Sonothrombolyse, sowohl in Kombination mit der mechanischen Thrombektomie als auch der systemischen Thrombolyse, erfolgreich angewandt werden. Signifikante Kontraindikation gibt es nicht, die Anwendung ist aber je nach Lokalisation des Gefäßverschlusses nicht immer umsetzbar. Um einen verlässlichen Einsatz zu ermöglichen ist ein erfahrener Anwender notwendig. Die alleinige Behandlung eines Hirninfarktes mit Sonothrombolyse hat bislang keinen klinischen Stellenwert.

Struktur von *in vivo* entstandenen Thromben

Informationen über die Stabilität und Struktur von *ex vivo* Thromben geben für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien wichtige Hinweise. Eine höhere Stabilität von Thromben korreliert, wie zu erwarten, mit einem schlechten klinischen Outcome (Bembek et al., 2017). Thromben, welche aus Blut von Patienten mit Hirninfarkt generiert wurden, sind durchschnittlich dichter und stabiler (Stanford et al., 2015), zudem wurden bei Patienten mit kryptogenem Hirninfarkt stabilere Fibrinnetzwerke nachgewiesen (Undas et al., 2009). Hierbei zeigten Analysen *ex vivo* sehr unterschiedliche Zusammensetzungen der extrahierten Thromben. Die Annahme, dass „rote“, Erythrozytenreiche Thromben kardioembolischer, und fibrinreichere Thromben

arteriosklerotischer Genese sind, ist offenbar zu kurz gegriffen. Eine kürzlich publizierte Metaanalyse postulierte, dass kardial-embolische Thromben generell mehr Fibrin und thrombozytenreiche Anteile haben (Jolugbo & Ariens, 2021). Allerdings konnte in manchen Studien die histologische Analyse keinerlei Korrelation zwischen Zusammensetzung und Ätiologie von *ex vivo* Thromben gewährleisten (Marder et al., 2006). Als mögliche entscheidende Störvariable einer erfolgreichen Korrelation zwischen der Beschaffenheit des Thrombus und seiner Ätiologie wird die mangelnde Genauigkeit der TOAST Klassifikation genannt (Brinjikji et al., 2017). Die „wahre“ Infarktätiologie wurde infolgedessen womöglich nicht immer korrekt benannt, welches die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt.

Ein weiterer Faktor, welcher mutmaßlich die Zusammensetzung von Thromben modulieren kann, ist in den lokalen Flussbedingungen zu sehen (De Meyer et al., 2017). Insgesamt sind fibrinreichere Thromben steifer und elastischer, sodass sie eine schlechtere Prognose für eine Rekanalisation des Gefäßes mittels Thrombektomie aufweisen (Jolugbo & Ariens, 2021). Dies gilt mutmaßlich auch für die i.v.-Thrombolyse. Passend zu diesen Erkenntnissen korreliert ein höherer Anteil Erythrozyten im Thrombus mit einem verbesserten Ansprechen auf die i.v.-Thrombolyse (Choi et al., 2018). Die Anwesenheit einer größeren Menge von Erythrozyten führt zu vergrößerten Poren im Fibrinnetz (Carr & Hardin, 1987). Es ist zu vermuten, dass durch die Poren eine größere Fläche, an der Thrombolytika wirken können, zur Verfügung steht.

Die Architektur der Thromben bei akuten ischämischen Hirninfarkten und die sich daraus ableitende klinische Signifikanz, ist Gegenstand fortlaufender wissenschaftlicher Diskussion.

Herstellung von *in vitro* Thromben für Thrombolyseexperimente

Die Herstellung von *in vitro* Thromben gewährleistet gegenüber dem Einsatz von *ex vivo* Thromben einige entscheidende Vorteile. Ein fester Algorithmus der Herstellung ermöglicht ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, da gewährleistet ist, dass alle Thromben eine sehr ähnliche Struktur aufweisen. Zudem sind Versuche mit deutlich größeren Fallzahlen möglich, da die Experimente unabhängig von der klinischen Verfügbarkeit von entsprechenden Thromben erfolgen können. Es sollten hierbei

Thromben entstehen, welche sich so ähnlich wie möglich zu einem klinisch relevanten - d.h. einem potentiell Hirninfarkt auslösenden Thrombus - verhalten. Ein *ex vivo* Thrombus ist in der Lage physiologischen Flussbedingungen, teilweise einhergehend mit hohen Blutdrücken, standzuhalten, ansonsten würde das verschlossene Gefäß sich spontan rekanalisieren. Um eine entsprechende Robustheit zu gewährleisten, sollte ein *in vitro* Thrombus histologisch und elektronenmikroskopisch *ex vivo* Thromben strukturell möglichst ähnlich sein. In vielen experimentellen Arbeiten wird geronnenes Vollblut verwendet (siehe z.B.: Holland et al., 2008), die entstehenden Thromben weisen im Vergleich allerdings keine adäquate Stabilität auf, es kommt teilweise zu einer kompletten Auflösung des Thrombus unter physiologischen Flussbedingungen. Ein Vergleich verschiedener Lysestrategien ist somit nicht möglich. Zudem sind Vollblutthromben auch histologisch nicht ähnlich zu *in vivo* Thromben. Als Grundlage, für die in dieser Arbeit verwendeten Thromben, diente ein bereits zuvor etabliertes Gerinnungsprotokoll (Roessler et al., 2014). Grundlegend für dieses war die Annahme, dass Thrombozyten entscheidend zur Stabilität eines Thrombus beitragen. Daher wurde im Vergleich zu geronnenem Vollblut besonderes Augenmerk auf die Plasmafraktion der Thromben gerichtet. Durch Zentrifugieren von humanem Vollblut lässt sich Plättchen-reiches Plasma (PRP) herstellen, welches die Produktion stabiler Thromben gewährleistet.

Ein mit 100% PRP hergestellter Thrombus ist allerdings so stabil, dass er für experimentelle Zwecke ungeeignet ist (Roessler et al., 2011). Durch Variieren der Menge des verwendeten Anteils PRP und Plättchen-freiem Plasma (PFP) wurde eine Zusammensetzung gefunden, die den gewünschten Parametern entspricht (siehe Abbildung Nr. 6).

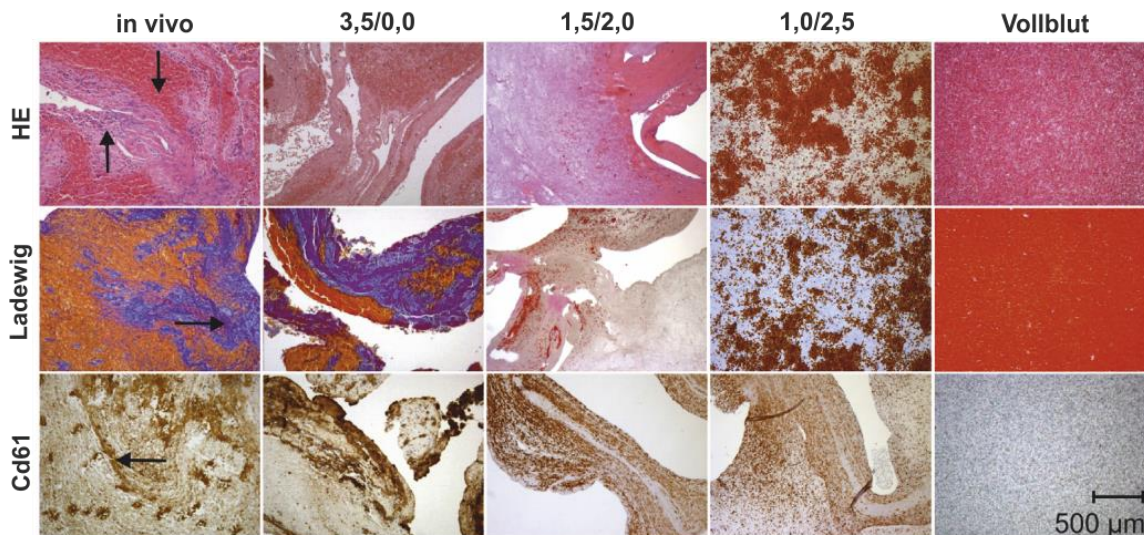


Abbildung 6: Histologischer Vergleich verschiedener Thrombus-Zusammensetzungen 100x optische Vergrößerung, HE-Färbung, Ladewig Färbung, CD61 Immunfärbung. Von links nach rechts: 1. *in vivo* Thrombus aus der A. cerebri media nach insuffizienter systemischer Thrombolyse mit rt-PA. 2.,3.,4., *in vitro* Thromben mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Plättchen-reichem und Plättchen-freiem Plasma (PRP/PFP), 5. Spontan geronnenes Vollblut. →: Fibrinnetz, ↑: Fibrinnetz mit anhaftenden Proteinen, ←CD61 markierte Plättchen, ↓: Erythrozyten Sediment (nach: (Roessler et al., 2014))

Letztendlich wurden Thromben mit einem PRP/PFP Verhältnis von 1,5/2,0 ml ausgewählt, diese waren histologisch am ähnlichsten zu den untersuchten *in vivo* Thromben, außerdem war ihre Suszeptibilität gegenüber der Lysetherapie optimal für experimentelle Lyseversuche, da sie unter Thrombolyse zwar an Volumen und struktureller Integrität verloren, aber nicht vollständig lysiert wurden.

Einige Arbeitsgruppen publizierten bereits *in vitro* Experimente mit rt-PA und TNK. So führten Holland et al. Versuche mit Thromben aus geronnenem Schweineblut durch (Holland et al., 2008). Ihr Vorgehen diente als Inspiration für die in dieser Arbeit durchgeführten Dosisfindungsexperimente. Holland et al. verwendeten allerdings Schweineblut, in welchem die Plasmakonzentrationen von Plasminogen deutlich geringer sind. Daher wurden für die Zwecke dieses experimentellen Aufbaus, für rt-PA und Tenecteplase eigene Dosisfindungsexperimente vorgenommen.

In vitro Versuche mit Tenecteplase wurden bereits in ähnlicher Konzipierung von Papadopoulos et al. durchgeführt. Es bestanden einige entscheidende Unterschiede, die die Validität der von ihnen durchgeführten Experimente einschränken. So führten

Papadopoulos et al. Experimente mit Thromben aus geronnenem Schweinevollblut durch (Papadopoulos & Damianou, 2016). Vollblutthromben sind wie bereits erwähnt für Thrombolyseexperimente nicht ausreichend stabil. Die spontane Lyserate der von Papadopoulos et al. verwendeten Thromben lag infolgedessen nach 30 Minuten bei etwa 30%. Dies führt zu nur eingeschränkt interpretierbaren Ergebnissen. Zudem waren die von Papadopoulos et al. verwendeten Ultraschalleinstellungen nicht vergleichbar mit den klinisch eingesetzten: Die von Papadopoulos genutzte akustische Schalleistung überschritt (20 W) die für diagnostische Zwecke maximal zugelassene Schalleistung ($0,72 \text{ W/m}^2$), sodass der verwendete Ultraschallaufbau deutlich mehr Energie überträgt als in der klinischen Realität üblich. Zudem arbeiteten Papadopoulos et al. mit einer sehr kleinen Stichprobenmenge von lediglich $n=5$.

Methoden zur Evaluation experimenteller Thrombolyse

Für die Evaluation von *in vitro* Thrombolyseexperimenten, ist die Lyse Effektivität in Form des relativen Gewichtsverlustes der Thromben die naheliegendste Methode. Zusätzlicher Vorteil dieser ist, dass sie wenig Zeitaufwand erfordert und hierbei relativ genau ist; so können hohe Stichprobengrößen erfasst werden.

Als weitere Achse der Auswertung werden häufig bildgebende Methoden eingesetzt, z.B. die Anfertigung histologischer Schnitte. Viele Publikationen nutzen Rasterelektronenmikroskopische Darstellungen, um eine Veränderung der Dichte des Fibrinnetzes nach der Thrombolyse abzubilden (Cines et al., 2014; Stanford et al., 2015). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie zwar anschauliche Abbildungen erzeugt, aber aufgrund des dreidimensionalen Charakters der Rasterelektronenmikroskopie ohne größere Umstände nicht objektiv zu quantifizieren ist. Folglich können möglicherweise kleine, aber signifikante Änderungen übersehen werden. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder werden als Analysetool der Dichte des Fibrinnetzes bisher nicht in relevantem Ausmaß eingesetzt. Dem Autor sind keine mit der Vorgehensweise dieser Arbeit vergleichbaren TEM-Untersuchungen (Stand 12/22) bekannt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Transmissionselektronenmikroskop wurde ursprünglich in den Dreißigerjahren des 20. Jahrhunderts entworfen, war jedoch erst ab 1955 frei verfügbar; Funktion ist die Analyse dünner Anschnitte (60-90 nm) des gewählten Gewebes. Es kann Auflösungen um das 1000-fache eines konventionellen Lichtmikroskopes erreichen (Burghardt & Droleskey, 2006). Die hohen Auflösungen werden mit Hilfe der Beschleunigung von Elektronen durch hohe Spannungen und damit Erzeugung von sehr niedrigen effektiven Wellenlängen generiert; dies muss in einem Vakuum durchgeführt werden (Burghardt & Droleskey, 2006). TEM eignet sich daher zur Analyse kleinster Strukturen, wie zum Beispiel Zellorganellen. Die Anfertigung der Schnitte kann über chemische Fixierung oder Einfrieren des zu analysierenden Gewebes erfolgen. Initial muss eine Dehydrierung durchgeführt werden, da hydrierte Proben zu weich für die Anfertigung adäquater Schnitte sind, außerdem würde in der Probe gelöstes Wasser im Vakuum evaporieren und die Probe beschädigen (Hurbain & Sachse, 2011). Nachfolgend wird, je nach Methode der Präparation, das Gefrieren der Probe bei Temperaturen bis -80°C oder bereits die chemische Fixierung mit einem Puffer (oft werden Aldehyd Puffer verwendet) durchgeführt (Hurbain & Sachse, 2011). Anschließend erfolgt die Fixierung in einem Epoxidharz und danach die Anfertigung der Schnitte (Suelter, 1993); mittels Kryopräparation kann die Fixierung in Harz vermieden werden (Hurbain & Sachse, 2011). Multiple dünne Schnitte ermöglichen im Rahmen der Analyse des Fibrinnetzes einen Überblick über die Dichte des Fibrinnetzes. Da die Schnitte des Gewebes extrem dünn sind, stellt sich das Fibrinnetzwerk zweidimensional dar, welches für eine objektivierbare Auswertung deutliche Vorteile hat.

Motivation und Hypothesen

Trotz der Verfügbarkeit klinischer und präklinischer Daten fehlen weiterhin entscheidende Wissensbausteine für ein ausreichendes Verständnis der akuten Hirninfarkttherapie. Der Einfluss von STL auf die medikamentöse Thrombolyse, und ob sich Unterschiede bezüglich ihrer Effektivität in Kombination mit TNK oder rt-PA zeigen, ist beispielsweise bisher nicht ausreichend systematisch untersucht worden. Im Zuge der stetigen Weiterentwicklung der Schlaganfall Akuttherapie, zum Beispiel Verbesserungen der mechanischen Thrombektomie, ist solches Wissen unerlässlich.

Motivation der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchung und Aufarbeitung der Wirkung der oben genannten Therapien und ihre Beziehung zu einander mittels des bereits etablierten *in vitro* Modells. Zusätzliche Zielsetzung war die Etablierung der TEM gestützten Dichtemessung des Fibrinnetzes als valide Analysemethode.

Ziel meiner Experimente war die Überprüfung folgender Hypothesen:

1. rt-PA und Tenecteplase sind innerhalb des vorliegenden experimentellen Aufbaus im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wirksam;
2. Tenecteplase ist innerhalb des experimentellen Aufbaus besser wirksam als rt-PA;
3. Die zusätzliche Applikation von Ultraschall führt zu einer verbesserten Wirksamkeit der applizierten medikamentösen Thrombolyse;
4. Die Analyse der Thromben mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigt vergleichbare Ergebnisse zu der relativen Gewichtsabnahme und stellt somit eine valide Analysemethode zur Untersuchung der Wirksamkeit der applizierten Therapie dar.

Hierzu wurden, wie einleitend erwähnt, *in vitro* produzierte Thromben in fünf individuellen Gruppen untersucht.

Die Effizienz der Thrombolyse wurde mittels relativer Gewichtsabnahme als Surrogat Parameter bestimmt. Außerdem wurde als ergänzende Analysemethode ein Protokoll für die TEM gestützte, semiquantitative Analyse der Fibrindichte entwickelt und umgesetzt.

Materialien und Methoden

Chemikalien

HEPES	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	VWR International, Pennsylvania, USA
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Merck Darmstadt Deutschland
Ringer Lösung	Berlin Chemie Menarini, Berlin, Deutschland
Tenecteplase	Metalyse®, 1mg=1000 IE, 5mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Alteplase (rt-PA)	Actilyse®, 10mg = 5,8mio IE, 1mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein

Lösungen & Puffer

CaCl ₂ - Dihydrat-Lösung	0,1 M
Saccharose Lösung	20% in Aqua bidest.
HEPES Puffer, PH 7,4	1 M in aqua bidest.

Fixierlösung 1,5 % Formaldehyd in 0.15 M HEPES

Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen und Puffer wurde, falls nicht anders angegeben, Aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet.

Geräte und Laborbedarf

Zentrifugen	Benchtop centrifuge, Allegra 64R, Beckmann-Coulter, Krefeld EBA 8S, Hettich, Tuttlingen
<u>Statisches Modell</u>	Eigenbau AG Sonothrombolyse
Gerüst	Polyoxymethylene (POM)
Schallabsorbierenden Schaum	SH002, aixFOAM, Eschweiler, Deutschland
Einhängethermostat	Julabo ED v.2 class 1; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Wärmebecken	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Dosisfindungs- und Thrombolyseexperimente

Analysewaage	Mettler Ab104-S Analytical Balance, Mettler-Toledo, Columbus
Ultraschallgerät	Sonos, 2500, Hewlett-Packard, Andover, MA, USA
Ultraschallkopf	21202A, Hewlett-Packard

Elektronenmikroskopie

Agar 100-Harz	Agar scientific Ltd. UK
Ultramikrotom	Reichert Ultracut E, Leica
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss EM 902
slow-scan 2K CCD Kamera	TRS, Tröndle, Moorenweis
Rasterelektronenmikroskop	Philips/FEI XL30 Deutschland GmbH

Sonstige Geräte

Pipetten, 1000 µl, 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Heizrührer IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Citrat Röhren (Vacutainer)	BD, Becton Dickinson, New Jersey, USA
Plastikröhren	13 ml, REF 55.468.001, Sarstedt
Eppendorf Pipetten	SafeSeal Gefäß 1,5 ml, REF 72.706, Sarstedt
Pipettenspitzen, 1000 µl, 100 µl	Megro, Wesel, Deutschland

Software

Image J	Open-Source Software; Version Java V.1.8.0_77
IBM SPSS statistics	Version 21.0.0.0, IBM, Armonk, New York, U.S.A.
Photoshop	Adobe Photoshop CS6 Extended
Corel Draw Graphics Suite Version X7 (2014)	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., Redmond, Washington USA
Microsoft Paint	Microsoft Corp., Redmond, Washington USA

Herstellung artifizieller Thromben

Das für die Herstellung der *in vitro* Thromben verwendete Blut wurde mit Unterstützung des Instituts für Transfusionsmedizin des UKGM Gießen von freiwilligen Spendern gewonnen. Spender, deren Blut verwendet wurde, hatten die Blutgruppen 0 oder A+. Alle Spender gaben ihr Einverständnis, eine entsprechende Genehmigung des ethischen Komitees liegt vor (Aktenzeichen 05/00). Das Spenderblut wurde entsprechend der Standards der Klinik für Transfusionsmedizin auf infektiöse Krankheiten getestet (siehe

Verfahrensanweisung: „Untersuchung und Freigabe von Blutprodukten“, Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM Gießen, Version 003/03.2022). Gependetes Blut wurde in Citrat Röhrchen aufgezogen und anschließend mit zwei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert. Plättchen-reiches Plasma wurde mit einer langsameren Geschwindigkeit erzeugt: Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 180 g über eine Dauer von 10 Minuten zentrifugiert. Die Gewinnung von Plättchen-freiem Plasma erfolgte mit einer höheren Geschwindigkeit von 2570 g - ebenfalls über eine Dauer von 10 Minuten. Das entstehende Plasma wurde jeweils mit dem Plasma von mehreren anderen Spendern gepoolt, um interindividuelle Unterschiede auszugleichen. So wurde pro Thrombus immer das Blut von mindestens vier verschiedenen Spendern verwendet. Aus dem verbliebenen Blut wurde PFP hergestellt, gepoolt und für die weiteren Experimente verwendet.

Letztendlich wurden Thromben mit folgenden Komponenten produziert:

- 2,0 ml PFP
- 1,5 ml PRP
- 0,5 ml „boundary layer“ (die Erythrozyten reiche Grenzfläche zwischen PRP und Erythrozyten Sediment) für den Erythrozyten Anteil eines Thrombus
- 0,64 ml einer 0.1 molaren CaCl_2 Lösung (zur Re-Initiierung des Gerinnungsprozesses)

Das entstehende Gemisch wurde anschließend eine Stunde lang, bei einer Temperatur von 37°C , in einem Wärmebecken inkubiert. Danach wurden die Thromben über Nacht - erneut bei 37°C - in Ringer Lösung aufbewahrt. So wurde die vollständige Retraktion und Stabilisation des Thrombus gewährleistet und gleichzeitig eine Autolyse verhindert. Da die entstehenden Thromben Variationen in ihrem Gewicht aufwiesen, wurden, um vergleichbare Lyseraten zu erzielen, alle Thromben über einem Gewicht von 400 mg auf ein geringeres Gewicht beschnitten, sodass sich alle verwendeten Thromben in einem Gewichtsbereich von $300\text{ mg} \pm 100\text{ mg}$ bewegten. Leichtere Thromben wurde verworfen. Das Gewicht der Thromben wurde für alle Experimente auf die vierte Nachkommastelle in Gramm gemessen und protokolliert.

Das statische Modell

Im Rahmen der Thrombolyseexperimente wurden die Thromben in ein statisches Modell eingesetzt (Siehe Abbildung Nr. 7). Dieses wurde für Thrombolyseexperimente, mit den verwendeten Thromben, maßangefertigt und soll eine möglichst effektive und reproduzierbare Thrombolyse gewährleisten: es wurde bereits in vorherigen Studien verwendet (Roessler et al., 2016; Roessler et al., 2015). Das Modell besteht aus Plastik (Polyoxymethylene, POM) und hat fünf Steckplätze für die verwendeten Mikroreaktionsbehälter, welche in einem schallabsorbierenden Schaum eingebettet sind. Dieser verhindert im Rahmen der Verwendung von Ultraschall eine Reflektion und somit einen möglichen, verstärkenden Effekt der Sonothrombolyse auf einzelne Thromben. Die seitlichen Steckplätze sind jeweils mit Plastikbarrieren von den anderen abgegrenzt. So können die dort platzierten Thromben mit Ultraschall behandelt werden, ohne dass andere Proben durch Schallreflexionen verfälscht werden. Das gesamte Modell wird in eine Wasserwanne eingetaucht und das darin enthaltene Wasser vor Durchführung der Experimente über mehrere Tage entgast und regelmäßig ausgetauscht, um Verunreinigungen zu verhindern.

Während der Experimente wurde das Wasser durch ein Einhängethermostat wärme kontrolliert und bei einer Temperatur von 37°C gehalten. Eine Pumpe sorgte für eine gleichmäßige Temperaturverteilung und verhinderte Wärmeakkumulationen an einzelnen Stellen. Im Rahmen der Experimente wurden die Thromben zusammen mit vorher gepooltem und gepuffertem Plasma (HEPES Puffer, 1M) sowie, gegebenenfalls dem für das jeweilige Experiment verwendeten Wirkstoff, in Eppendorf Pipetten gefüllt. Hierbei wurde zuerst der Thrombus mit einer Pinzette vorsichtig in der Eppendorf Pipette platziert und anschließend die jeweilige Kombination Plasma und Wirkstoff hinzugegeben.

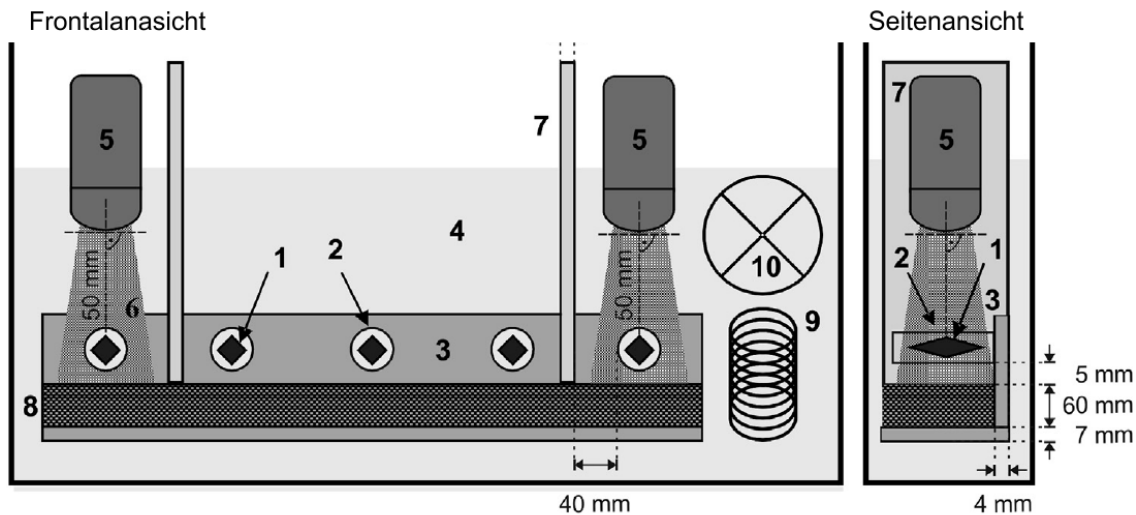


Abbildung 7: Statisches Modell, schematische Darstellung: Thromben (Nr. 1) können in Eppendorf Pipetten (Nr. 2) in einen der fünf vorhandenen Steckplätze (Nr. 3.) gesteckt werden. Entgastes Wasser (Nr. 4), Ultraschall Kopf (Nr. 5), Ultraschall (Nr. 6), Barrieren aus POM zur Abschirmung des Ultraschalls (Nr. 7), Ultraschallabsorbierender Schaum (Nr. 8), Einhängethermostat (Nr. 9) mit Pumpe (Nr. 10). (Aus: (Roessler et al., 2015))

Bei Versuchen mit medikamentöser Thrombolyse wurde der jeweilige Wirkstoff zuerst in der gewünschten Konzentration mit Plasma gemischt und schließlich die Pipette vollständig aufgefüllt. So wurde sichergestellt, dass die Wirkstoffkonzentration auch bei unterschiedlichen Volumina der Thromben im Behälter immer konstant war. Bei der Befüllung wurde darauf geachtet, dass soweit möglich keine Luftbläschen in dem Behälter vorhanden waren und der Thrombus vollständig von Flüssigkeit umgeben war. Der Behälter mit dem Thrombus wurde, bei ca. 30°C, schräg im Modell platziert. Unvermeidbare minimale Mengen an Luft sammelten sich so unter dem Deckel des Gefäßes und konnten keinen Einfluss auf den Ultraschall oder die Thrombolyse nehmen.

Dosisfindungsexperimente

Da Experimente im statischen Modell mit einer fixen Menge Plasma (ca. 2 ml) vorgenommen werden, musste die zu dieser Menge Plasma passende Menge an Wirkstoff experimentell bestimmt werden. Als Vorlage hierfür dienten die Experimente von Holland et al.: Die Lyserate wurde in ansteigender Wirkstoffdosierung geprüft bis ein Plateau der Thrombolyserate erreicht war. Der daraus entstehende Wert kann als Dosis-

Sättigungswert des Thrombolytikums innerhalb des experimentellen Aufbaus verstanden werden und wurde in den nachfolgenden Experimenten als Dosierungsmenge verwendet. Die Lyserate wurde nach Ablauf von jeweils einer bzw. zwei Stunden nach Beginn der Lyse gemessen. Die bei rt-PA verwendeten Konzentrationen lagen in regelmäßigen Stufen zwischen 0 bis 100 µg/ml (äquivalent zu etwa 0-7,2 mg/kg KG). Um eine möglichst kontinuierliche Applikation zu simulieren, wurde, im Falle dieser, und aller weiteren Experimente mit rt-PA, pro Stunde vier Mal eine Erneuerung des Plasmas und des darin enthaltenen Wirkstoffes vorgenommen. Hierfür wurde der Thrombus manuell in eine neue Eppendorf Pipette überführt (s. Schema). Die Lösungen in den neuen Behältern wurden jeweils drei Minuten im Voraus vorbereitet, die tatsächliche Überführung des Thrombus dauerte aber nur wenige Sekunden, sodass in der rt-PA Gruppe keine relevant veränderte Dauer der Thrombolyse im Vergleich zu den anderen Experimenten bestand. Dosisfindungsexperimente wurden mit n=10 für jede Dosierung durchgeführt, n^{gesamt} bei den Dosisfindungsexperimenten war 90.

rt-PA Lyse

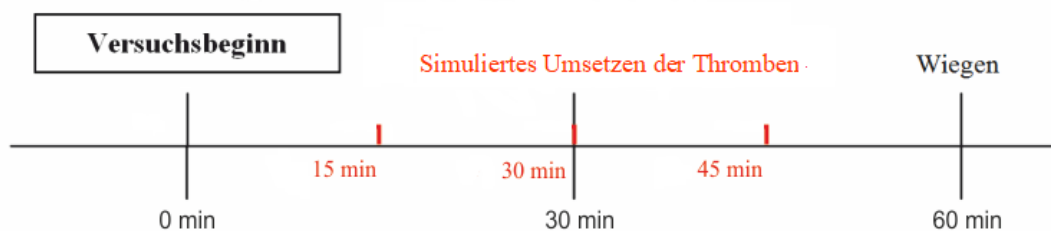


Abbildung 8: Schema der Thrombolyseexperimente mit rt-PA. Alle 15 Minuten wurde der Thrombus in eine neue Eppendorf Pipette, mit frisch appliziertem Wirkstoff, überführt

Für die Dosisfindungsexperimente mit Tenecteplase wurden Konzentrationen zwischen 0 und 40 µg/ml (äquivalent zu 0 bis 2,9 mg/kg Körpergewicht bei einem 70 kg schweren Menschen) verwendet. Im Rahmen dieser Experimente war, aufgrund der längeren Halbwertszeit und der Form der klinischen Applikation von Tenecteplase, welche als einmalige Bolusgabe erfolgte, keine Wirkstofferneuerung durchgeführt worden (s.

Schema). n^{gesamt} bei der Tenecteplase Dosisfindung war 70, mit jeweils $n=10$ pro Dosierung.

Tenecteplase-Lyse

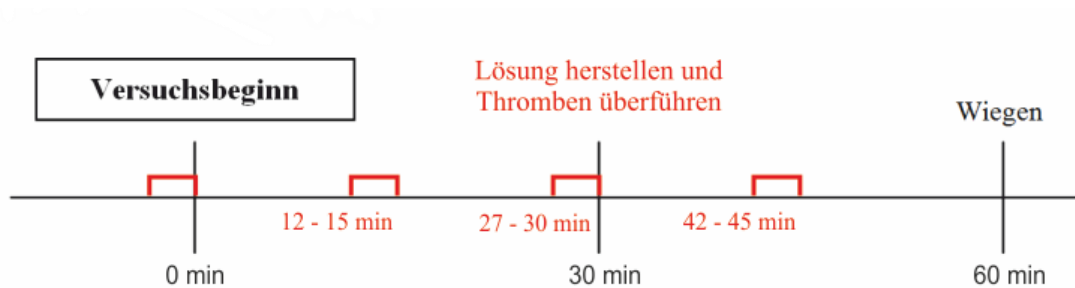


Abbildung 9: Schema der Thrombolyseexperimente mit Tenecteplase. Auf Grund der langen Halbwertszeit von Tenecteplase wurde im experimentellen Aufbau, ebenso wie in der klinischen Anwendung, lediglich einmalig Tenecteplase appliziert.

2.12 Auswertung der relativen Gewichtsabnahme

Für die Messungen der relativen Gewichtsabnahme wurde eine Einteilung in fünf Gruppen vorgenommen. Gruppe A wurde als Kontrollgruppe designiert. In Gruppe A wurden die untersuchten Thromben lediglich mit gepuffertem Plasma behandelt, es wurde kein Wirkstoff appliziert.

Die Gruppen B und C wurden mit rt-PA behandelt, hierbei erfolgte bei Thromben der Gruppe C zusätzlich eine Behandlung mittels Sonothrombolyse. Die Dosierung von rt-PA lag bei $50 \mu\text{g/ml}$. Die Gruppen D und E wurden mit Tenecteplase behandelt, für Gruppe E wurde zusätzlich STL eingesetzt. Die eingesetzte Dosierung von Tenecteplase war $30 \mu\text{g/ml}$.

Die Stichprobengröße pro Gruppe betrug 60 ($n^{\text{gesamt}}=300$). Die Experimente dauerten jeweils eine Stunde. Da in den Gruppen B und C rt-PA insgesamt 4-mal pro Thrombus appliziert wurde, und hierzu die Thromben manuell in neue Behälter umgesetzt wurden, musste in den anderen Gruppen ein möglicher Abnutzungseffekt, verursacht durch die Manipulation beim Umsetzen, ausgeglichen werden. Deswegen wurden in den Gruppen A, D und E bei allen Thromben ein Umsetzen "simuliert": Die Thromben wurden wie in den zwei rt-PA Gruppen manuell aus ihrem Behälter entnommen und anschließend ohne

weitere Behandlung wieder im selben Behälter platziert. Einziger Unterschied blieb damit die lediglich in den rt-PA Gruppen durchgeführte Erneuerung von Wirkstoff und Plasma.

Therapeutischer Ultraschall

Im Rahmen der Experimente in den Gruppen C und E wurde zusätzlich zu den verwendeten Wirkstoffen in therapeutischer Intention Ultraschall appliziert. Die Distanz vom Ultraschallkopf zu der Mitte des Thrombus wurde auf 50 mm eingestellt. Der Schallkopf wurde stets direkt auf der Wasseroberfläche platziert. Lufteinschlüsse zwischen Schallkopf und Thrombus wurden durch die leicht angewinkelte Montierung des Thrombus im statischen Modell vermieden. Womöglich entstehende kleinere Luftbläschen sammelten sich am Verschluss des Behälters, in ausreichender Distanz von der Thrombus Oberfläche und der Richtung der Beschallung. So wurde gewährleistet, dass weder an der Oberfläche des Schallkopfes noch im Gefäß selbst Luftartefakte entstehen konnten. Die Einstellungen des verwendeten Ultraschallgeräts waren wie folgt: eine Intensität (Spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA})) von $0,179 \text{ W/cm}^2$. TCCS-Modus (transcranial color coded mode) mit einem anti-aliasing threshold von $0,25 \text{ m/s}$ und einem power threshold von 100%. Der mechanische Index (MI onscreen) war $0,6$. Der verwendete Ultraschallkopf sendet mit einer Frequenz von $2,0$ bis $2,5 \text{ MHz}$. Diese Einstellungen entsprechen denjenigen, welche in der klinischen Routinediagnostik verwendet werden.

Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Evaluation der Dichte des Fibrinnetzes mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden spezielle Thromben angefertigt, bei denen der Erythrozytenreiche Boundary Layer Anteil nicht hinzugefügt wurde. Erythrozyten sorgen in TEM-Schnitten für Artefakte und verhindern eine zuverlässige Darstellung des Fibrinnetzes. Im Weiteren wurden die Thromben identisch zu den korrespondierenden Experimenten zur relativen Gewichtsabnahme behandelt. Anschließend wurden sie mit $0,15 \text{ M HEPES}$ und in $1,5\%$ Formaldehyd fixiert. Um Quetschartefakte bei der weiteren Analyse zu verhindern, wurden die Thromben anschließend eingefroren: Zunächst wurden diese in eine 20% Saccharoselösung überführt und anschließend bei -26°C gefroren. Zur Anfertigung der Schnitte wurden die Thromben in kleinere Teile gebrochen. Für die Präparierung der TEM-Schnitte erfolgte zunächst eine Postfixierung in 1% Osmiumtetroxid in aqua bidest, dann wurden die Proben in halbgesättigtem Wasser

Uranylacetat gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und letztendlich in Agar 100-Harz eingebettet. Mit einem Ultramikrotom wurden anschließend ultradünne Schnitte angefertigt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Die dabei entstehenden digitalen Aufnahmen wurden mit einer slow-scan 2K CCD Kamera aufgenommen.

Auswertung der TEM-Schnitte

Die Analyse der TEM-Schnitte wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (ImageJ, Java V.1.8.0_77) durchgeführt. ImageJ, ursprünglich als „NIH Image“ bekannt, wurde 1987 programmiert (Schneider et al., 2012) und ist auf Grund einer Reihe von Vorteilen für den Zweck der wissenschaftlichen Anwendung verbreitet. Vorzüge sind die verhältnismäßig einfache Bedienung und Übersichtlichkeit bei im zeitlichen Verlauf konstanter und damit verlässlicher Funktionalität (Schindelin et al., 2015; Schneider et al., 2012). ImageJ erfährt trotz seines Status als Open-source Software regelmäßige Updates und ist auf multiplen Betriebssystemen einsetzbar (Schneider et al., 2012). Die Graustufenbestimmung von ImageJ ermöglicht eine reproduzierbare und zuverlässige Methode der Bildanalyse (Girish & Vijayalakshmi, 2004). ImageJ kann 256 8Bit Graustufen differenzieren und die Graustufenverteilung berechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Graustufenanalyse eingesetzt, um die fibrinbedeckten Anteile der Schnitte von den nicht Fibrinbedeckten zu differenzieren. Abbildung 10 stellt das Histogramm der Graustufenverteilung sowie ein entsprechend ausgewertetes TEM Bild dar.

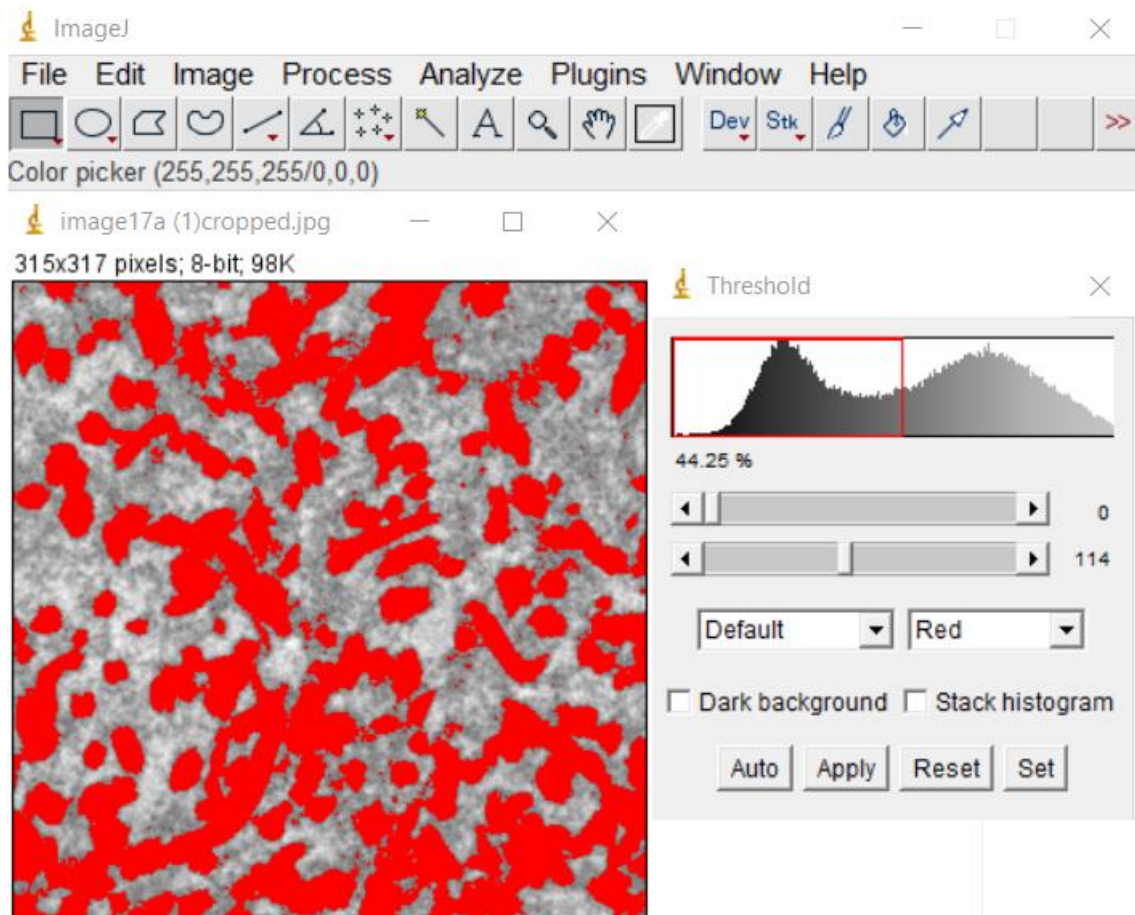


Abbildung 10: Histogramm der Graustufenverteilung in einem TEM Schnitt eines *in vitro* Thrombus (rechts) sowie der korrespondierende Anschnitt des Thrombus (links). Der fibrinbedeckte Anteil des Schnittes ist rot markiert.

Bei den entstehenden Bildern wurden repräsentative Ausschnitte gleicher Größe ($25 \mu\text{m}^2$, beziehungsweise 317×317 Pixel) ausgewählt und anschließend die Dichte der Fibrinfasern berechnet. Die Auswahl repräsentativer Schnitte war notwendig, da die hergestellten Thromben unterschiedlich konfiguriert sind und sich am Rand des Thrombus unphysiologisch gequetschte Areale bilden können, welche einen falschen Eindruck der tatsächlichen Dichte des Fibrinnetzes suggerieren können. Außerdem bildeten sich in den Schnitten der Thromben bei der Aufbereitung teilweise Luftbläschen, auch diese können größenabhängig das Ergebnis verfälschen. Mittels IMAGE/ADJUST/THRESHOLD wurden eine automatische Markierung der kompletten von Fibrin bedeckten Fläche ausgeführt und der Anteil an der Gesamtfläche des Ausschnittes berechnet.

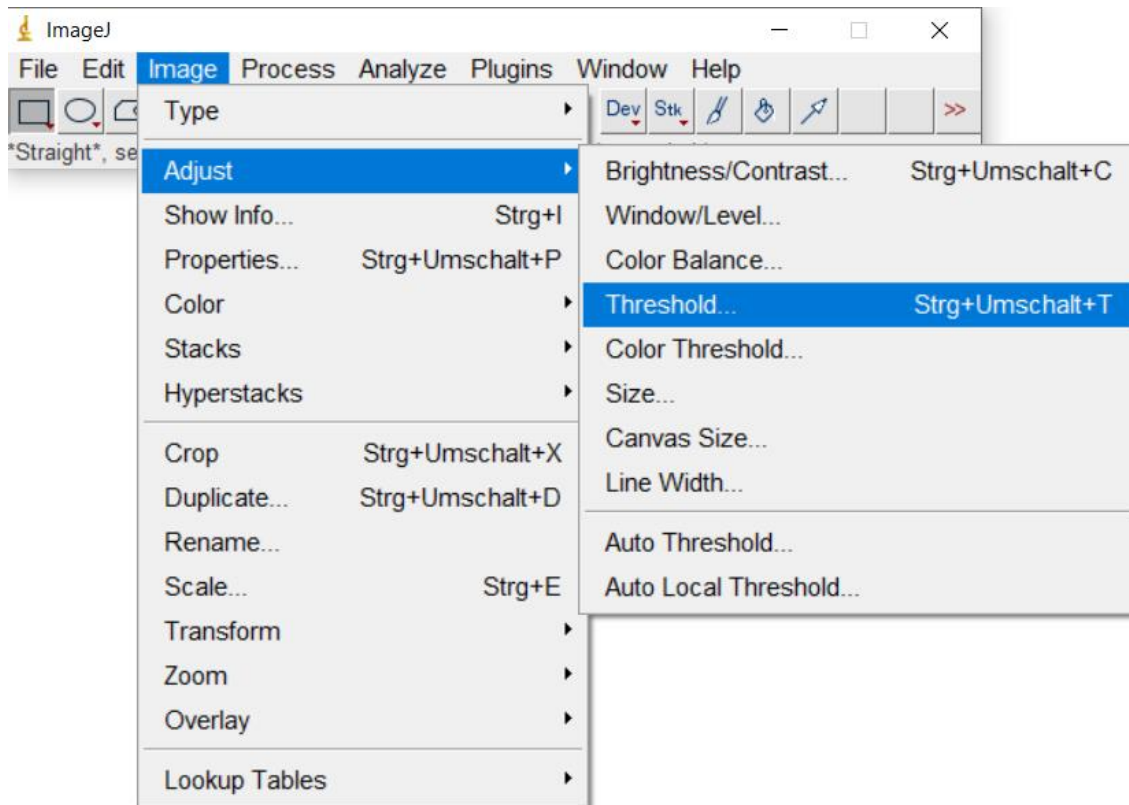
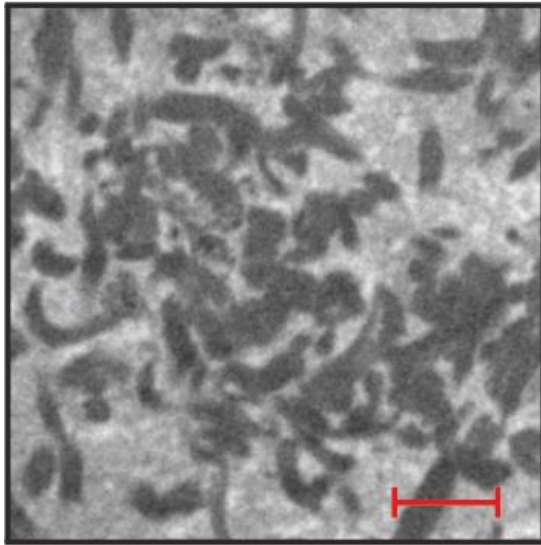


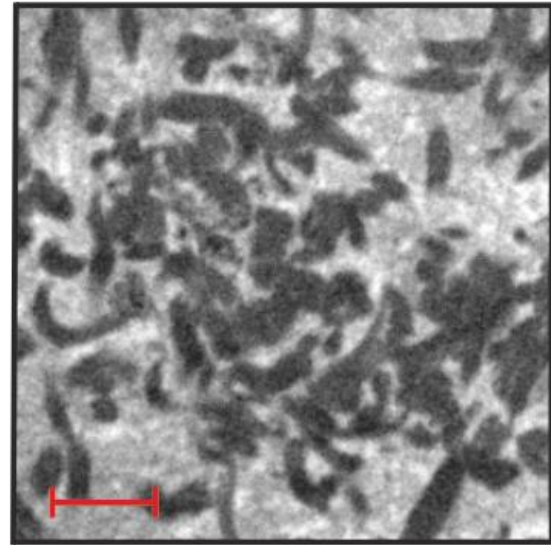
Abbildung 11: Einstellungen zur Auswertung der Fibrinschnitte in ImageJ

Vor der Auswertung wurden die Abbildungen mit Adobe Photoshop in ihrem Tonwert korrigiert (Adobe Photoshop CS6 Extended), sodass alle Aufnahmen die gleichen Graustufen für Fibrin und Nicht-Fibrinbestandteile aufwiesen. Diese Korrektur war notwendig, da variable Graustufen zwischen den Schnitten die Auswertung verfälschen können, indem unterschiedliche Mengen des Grenzbereichs zwischen Fibrin und leerer Fläche gefiltert werden. (Siehe Abbildung Nr. 12). Die Stichprobenzahl bei der Transmissionselektronenmikroskopie war $n=25$ ($n=5$ für jede Versuchsgruppe)

ohne Tonwertkorrektur



mit Tonwertkorrektur



1 μm

Abbildung 12: TEM-Schnitte ohne (links) und mit (rechts) Tonwertkorrektur. Die Tonwertkorrektur stellt sicher, dass ImageJ für alle Schnitte die Grenzbereiche zwischen Fibrin und leerer Fläche gleich berechnet.

Berechnungen und Statistik

Die statistische Relevanz der Experimente zur relativen Gewichtsabnahme wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) und *post hoc* T-Tests ermittelt. Getestet wurde auf Unterschiede bezüglich der Variablen Behandlung (mit oder ohne Thrombolyse), Medikation (rt-PA oder Tenecteplase) und Ultraschall (mit oder ohne zusätzliche Ultraschallbehandlung). Berechnungen und Statistiken wurden mit IBM SPSS Statistics durchgeführt.

Erstellung von Tabellen und Abbildungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen wurden mittels Corel Draw Home Student Suite X7 (2014, Ottawa, Ontario, Kanada) oder MS Paint (1985, Microsoft Corp., Redmond, Washington USA) erstellt. Sie wurden für diese Arbeit erstellt oder entstammen Publikationen, welche sich auf die ursprüngliche Entwicklung des statischen Modells bzw. der verwendeten Thromben beziehen. Diese Abbildungen wurden entsprechend gekennzeichnet.

Ergebnisse

Dosisfindungsexperimente

Dosisfindung für rt-PA

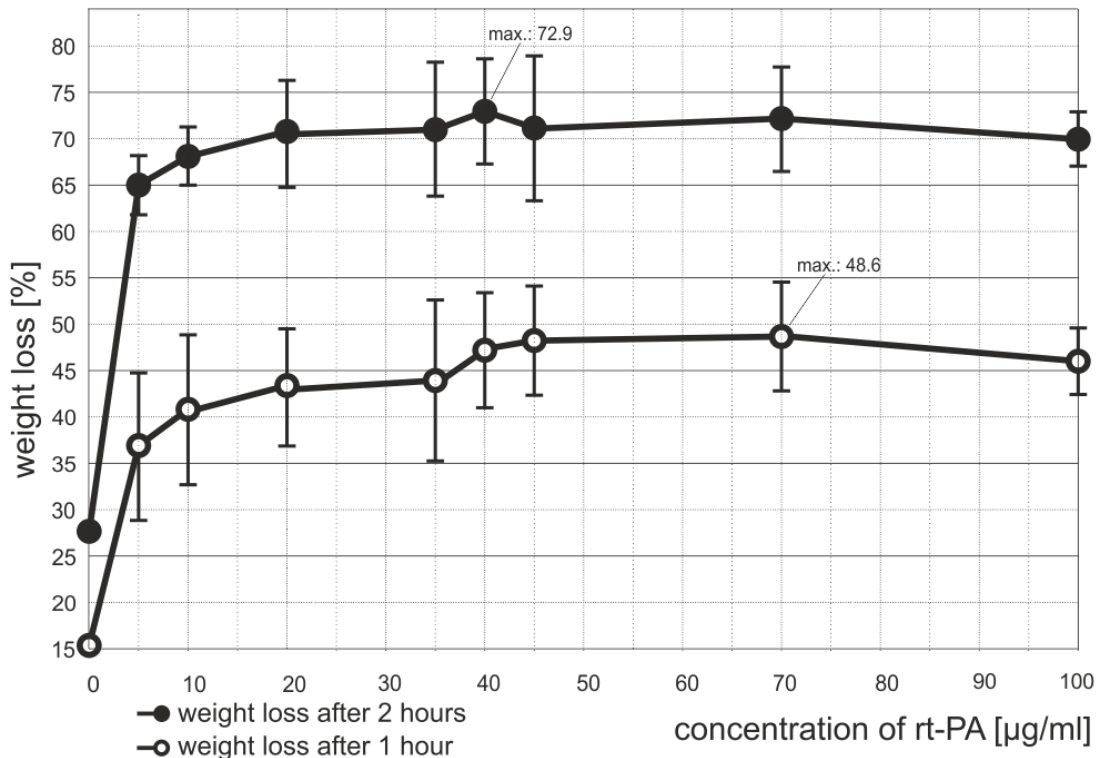


Abbildung 13: Ergebnisse der Dosisfindungsexperimente mit rt-PA nach einer bzw. zwei Stunden. Die Dosierungen lagen zwischen 0-100 µg/ml (jeweils n=10). Balken über den einzelnen Werten repräsentieren die mittlere Standardabweichung der jeweiligen Versuchsgruppe. Die SD der Kontrollgruppe wurden aufgrund eingeschränkter Darstellbarkeit auf der Y-Achse nicht aufgeführt (SD nach 1 Std.: 5,7%, nach zwei Stunden: 7,4%) (Abbildung aus Frühwald et al. 2019)

Im Rahmen der Dosisfindungsexperimente wurde rt-PA mit einer aufsteigenden Dosierung von 0 bis 100 µg/ml appliziert (Siehe Abbildung Nr. 13). Bei Applikation der Minimaldosis von 5 µg/ml wurde ein deutlicher Anstieg des relativen Gewichtsverlustes um mehr als 20%, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, beobachtet. Ab 40 µg/ml zeichnete sich ein Wirkungsplateau ab, bei den nachfolgenden höheren Dosierungen war keine signifikante Zunahme der Thrombolyseraten darstellbar. Der relative Gewichtsverlust erreichte, mit einer Dosierung von 40 µg/ml, nach zwei Stunden Experimentdauer, ein Maximum (72,9%) und betrug nach einer Stunde 47,2%. Der

Maximalwert nach einer Stunde betrug 48,6% bei einer rt-PA Dosierung von 70 µg/ml. Für die nachfolgenden Experimente mit rt-PA wurde eine Dosierung von 50 µg/ml (ca. 3,6 mg/kg KG) verwendet. Dieser Wert liegt, mit sehr hoher Sicherheit, über der Dosissättigungsschwelle, bei der eine weitere Dosissteigerung keine weitere Erhöhung der Thrombolyserate bewirkt. Die verabreichte Dosierung von rt-PA für die nachfolgenden Experimente war etwa 4-mal höher als die vermutete Dosierung bei der *in vivo* Therapie.

Dosisfindung für Tenecteplase

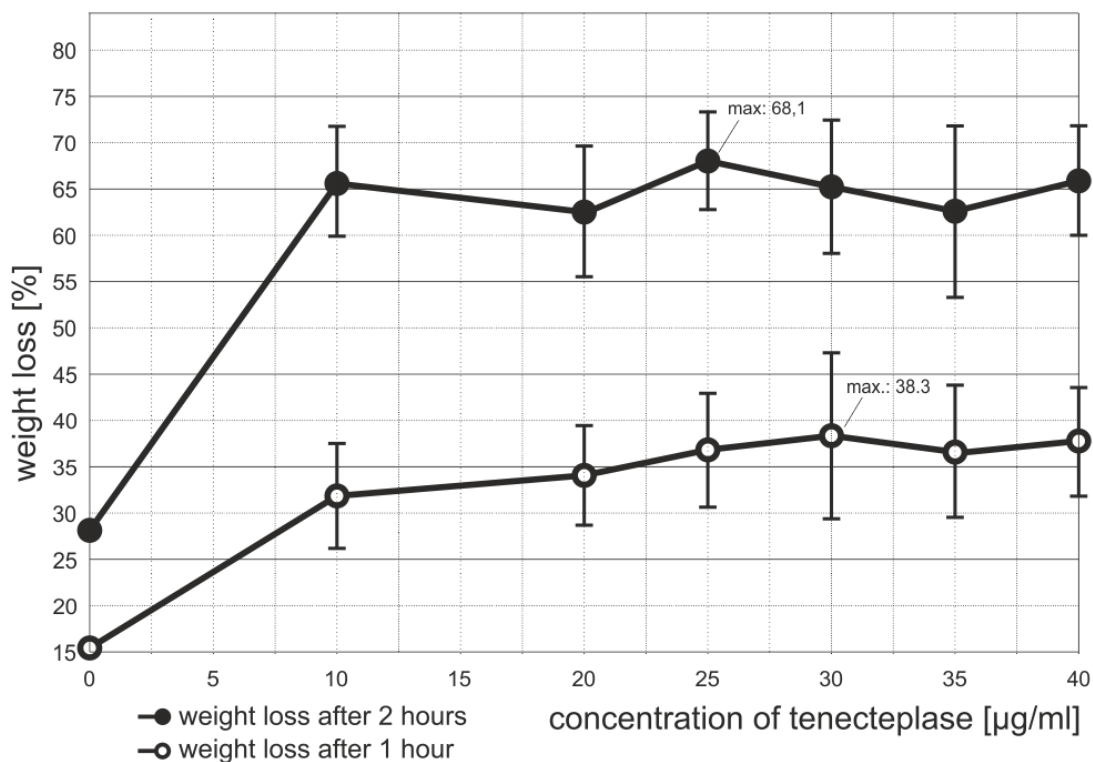


Abbildung 14: Ergebnisse der Dosisfindungsexperimente mit Tenecteplase nach einer bzw. zwei Stunden. Die Dosierungen lagen zwischen 0 und 40 µg/ml (jeweils n=10). Balken über den einzelnen Werten repräsentieren die mittlere Standardabweichung der jeweiligen Versuchsgruppe. Die SD der Kontrollgruppe wurde aufgrund eingeschränkter Darstellbarkeit auf der Y-Achse nicht aufgeführt (SD nach 1 Std.: 5,7%, nach zwei Stunden: 7,4%) (Abbildung aus Frühwald et al. 2019)

Zur Bestimmung des Dosissättigungswerts von Tenecteplase wurden Dosierungen von minimal 10 µg/ml bis maximal 40 µg/ml verwendet. Der maximale Gewichtsverlust lag bei einer Dosierung von 25 µg/ml (38,3% Gewichtsverlust). Der maximale Gewichtsverlust nach zwei Stunden lag bei 68,1%, bei einer Dosierung von 30 µg/ml (2,1 mg/kg) (Siehe Abbildung Nr. 14).

Im Folgenden wurde daher 30 µg/ml als Dosierung verwendet. Die in der größten verfügbaren klinischen Studie NORTEST verwendete Dosierung von 0,4 mg/kg Körpergewicht entspricht 5,6 µg/ml. Die verabreichte Dosierung von Tenecteplase im Experiment war somit etwa 5,25-mal höher als die vermutete *in vivo* Dosierung.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Dosisfindung

Die Dosisfindungsexperimente beider Fibrinolytika zeigten eine deutliche Zunahme der Lyseraten aller untersuchten Dosierungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Eine Korrelation zwischen Dosis und Wirkung mit einem sichtbaren Plateau, welches - wie erwünscht - das Erreichen eines Sättigungswertes impliziert. Die innerhalb der Experimente erzielten Werte waren zudem von Seiten der Variabilität der Ergebnisse sowie der tatsächlichen Lyseraten einander ähnlich. Zusammenfassend waren rt-PA und Tenecteplase, innerhalb des vorliegenden experimentellen Aufbaus, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wirksam.

Ergebnisse der relativen Gewichtsabnahme

	A Kontrollgruppe	B rt-PA	C rt-PA + US	D Tenecteplase	E Tenecteplase + US
Gewichtsverlust (% ± SD)	17.3 (± 7.4)	28.3 (± 9.6)	31.6 (± 10)	34.5 (± 8)	38.1 (± 6.7)
Fibrinbedeckte Fläche (% ± SD)	58.0 (± 5.2)	54.7 (± 3.6)	52.9 (± 6.5)	42.3 (± 6)	45.1 (± 2.3)

Tabelle 1: Durchschnittlicher Gewichtsverlust der Versuchsgruppen (A-E), sowie der mit Fibrin bedeckten Fläche in den TEM-Schnitten, SD: mittlere Standardabweichung, US: Ultraschall, TNK: Tenecteplase

Wirksamkeit der Therapiegruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe A, in welcher Thromben nur mit gepuffertem Plasma behandelt wurden, zeigte, mit einem mittleren Gewichtsverlust von 17,3%, signifikant geringere Gewichtsabnahmen als alle anderen Behandlungsgruppen. Hierbei war bei allen Gruppen der Signifikanzwert $p < 0,001$.

Wirksamkeit von Tenecteplase verglichen mit rt-PA

Gruppe B und C wurden mit rt-PA behandelt. Thromben in Gruppe B hatten einen mittleren Gewichtsverlust von 28,3%, Gruppe C einen mittleren Gewichtsverlust von 31,6%. Die Gruppen D und E wurden mit Tenecteplase behandelt, Gruppe D hatte einen mittleren Gewichtsverlust von 34,5% und Gruppe E einen mittleren Gewichtsverlust von 38,1%. Die mit Tenecteplase behandelte Gruppe D zeigte eine Differenz von 6,2% relativem Gewichtsverlust, im Vergleich zu der mit rt-PA behandelten Gruppe B. Diese Differenz bedeutet im Vergleich eine signifikant ($p = 0,001$) erhöhte Lyserate. Die Gruppen C und E wurden zusätzlich, zu den jeweiligen Therapeutika, mit Ultraschall behandelt. Die Differenz des relativen Gewichtsverlustes zwischen diesen beiden Gruppen beträgt 6,5%. Dies bedeutete eine signifikant erhöhte ($p < 0,001$) Thrombolyserate von Gruppe E im Vergleich zu Gruppe C.

Zusammenfassend zeigten beide mit Tenecteplase behandelten Gruppen, im Vergleich zu den korrespondierenden, mit rt-PA behandelten Vergleichsgruppen, mit deutlicher Signifikanz höhere relative Gewichtsverluste.

Wirksamkeit von Ultraschall

Gruppe C, welche mit rt-PA und Ultraschall behandelt wurde, hatte im Vergleich zu Gruppe B, welche monotherapeutisch mit rt-PA behandelt wurde, einen um 3,2% erhöhte Thrombolyserate. Dies entspricht einem Signifikanzniveau von $p = 0,227$. Gruppe E hatte, im Vergleich zu Gruppe D, eine um 3,5% erhöhten relativen Gewichtsverlust. Dies entspricht einem Signifikanzniveau von $p = 0,155$. Trotz des höheren mittleren relativen Gewichtsverlustes in beiden, zusätzlich mit Ultraschall behandelten, Gruppen gegenüber ihren jeweiligen Behandlungsgruppen ohne Ultraschall, konnte keine Signifikanz ($p < 0,05$) nachgewiesen werden.

Zusammenfassende Ergebnisse der relativen Gewichtsabnahme

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurden mit sehr hoher Signifikanz ($p < 0,001$) höhere durchschnittliche Gewichtsverluste in allen Behandlungsgruppen erzielt. Dies bestätigt die Wirksamkeit von rt-PA und Tenecteplase, zusätzlich zu den Ergebnissen der Dosisfindungsexperimente. Tenecteplase zeigte sowohl mit als auch ohne Ultraschall gegenüber der jeweiligen rt-PA Vergleichsgruppe mit deutlicher Signifikanz höhere durchschnittliche Gewichtsverluste (Abb. 15). Tenecteplase war zusammenfassend innerhalb des experimentellen Aufbaus besser wirksam als rt-PA

In keiner der Versuchsgruppen mit zusätzlicher Sonothrombolyse konnte eine signifikante Veränderung des durchschnittlichen Gewichtsverlusts dargestellt werden. Es zeigten sich zudem keine Hinweise für einen wirkstoffabhängigen Zusatzeffekt. Die zusätzliche Applikation von Ultraschall führte nicht zu einer verbesserten Wirksamkeit der applizierten medikamentösen Thrombolyse.

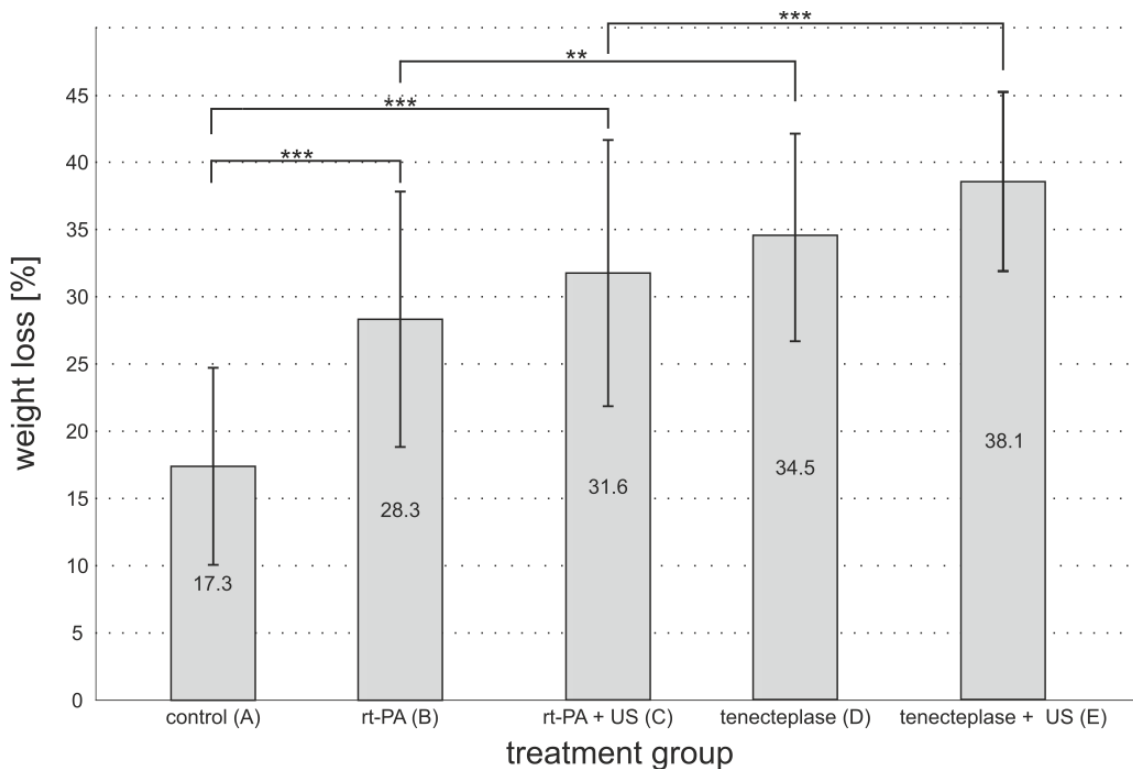


Abbildung 15: Balkendiagramm des mittleren relativen Gewichtsverlusts der fünf Versuchsgruppen (jeweils $n=60$). Balken stellen die mittlere Standardabweichung dar. Gruppe A: Kontrolle, Gruppe B: rt-PA, Gruppe C: rt-PA + Ultraschall, Gruppe D: Tenecteplase, Gruppe E: Tenecteplase + Ultraschall. Ultraschall: (2 MHz, 179 W/cm²). ***: $p < 0,001$, **: $p = 0,001$. (Abbildung aus Frühwald et al. 2019)

Ergebnisse der TEM-Analyse

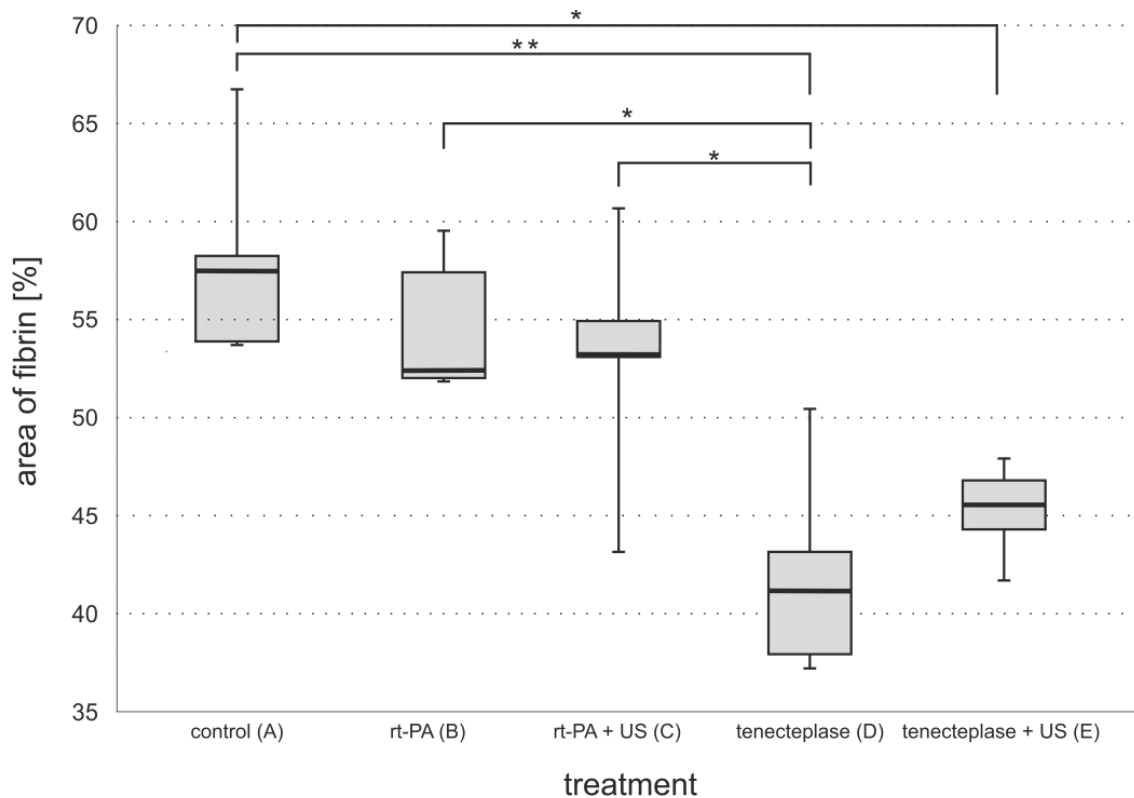


Abbildung 16: Boxplot der prozentual mit Fibrin bedeckten Fläche in den angefertigten TEM Ausschnitten. Für alle Versuchsgruppen galt n=5, Behandlungsdauer mit jedem Wirkstoff eine Stunde. *: $p < 0.05$, **: $p = 0.001$. US: Ultraschall (Abbildung aus Frühwald et al. 2019)

Für die Transmissionselektronenmikroskopische Auswertung wurde für jede Versuchsgruppe jeweils ein repräsentativer Ausschnitt aus fünf Thromben gewählt. Der mittlere Anteil der fibrinbedeckten Oberfläche in der Kontrollgruppe lag bei 58%. Die niedrigste Dichte hatte das Fibrinnetzwerk in Gruppe D (42,5%). In Gruppe E bestand trotz zusätzlicher Sonothrombolyse eine etwas höhere Dichte (45,1%). In Gruppe B (rt-PA Monotherapie) waren 54,7% der Oberfläche mit Fibrin bedeckt, in Gruppe C (rt-PA + US) waren es 52,9%. Allerdings wurden nicht zwischen allen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede erreicht. Während beide TNK-Gruppen signifikante Dichteabnahmen im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten ($p = 0,001$ bei Gruppe D und $p = 0,006$ bei Gruppe E), waren die Ergebnisse keiner der rt-PA Gruppen signifikant im Vergleich mit der Kontrollgruppe (beide $p = 1$). Gruppe D, welche die niedrigste Dichte des Fibrinnetzwerks zeigte, hatte zusätzlich zu der Signifikanz im Vergleich zur

Kontrollgruppe, auch im Vergleich zu den beiden rt-PA Gruppen, eine signifikant geringere Dichte des Fibrinnetzes ($p=0,008$ im Vergleich zu Gruppe B und $p=0,003$ im Vergleich zu Gruppe C).

Ein signifikanter Effekt der Sonothrombolyse war, ebenso wie bei den Experimenten mit Messung der relativen Gewichtsabnahme, auch in dieser Versuchsreihe nicht nachzuweisen. Während die Fibrindichte in Gruppe C im Vergleich zu Gruppe B nicht signifikant geringer war ($p=1$), zeigte im Vergleich der beiden TNK-Gruppen, die Sonothrombolyse Gruppe E sogar eine höhere Dichte der Fibrinfasern als in Gruppe D. Es bestand zwischen Gruppe D und E ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=1$).

Die in den Transmissionselektronenmikroskopischen Experimenten erzeugten Ergebnisse waren zum Teil vergleichbar mit solchen aus der Versuchsreihe mit Auswertung der relativen Gewichtsabnahme. Als wichtiger Faktor hervorzuheben ist die vergleichsweise niedrige Stichprobengröße der TEM-Experimente. Eine Bestätigung der Validität der semiquantitativen Auswertung der Dichte des Fibrinnetzes mittels ImageJ gestützter Analyse von TEM-Schnitten ist nicht uneingeschränkt möglich.

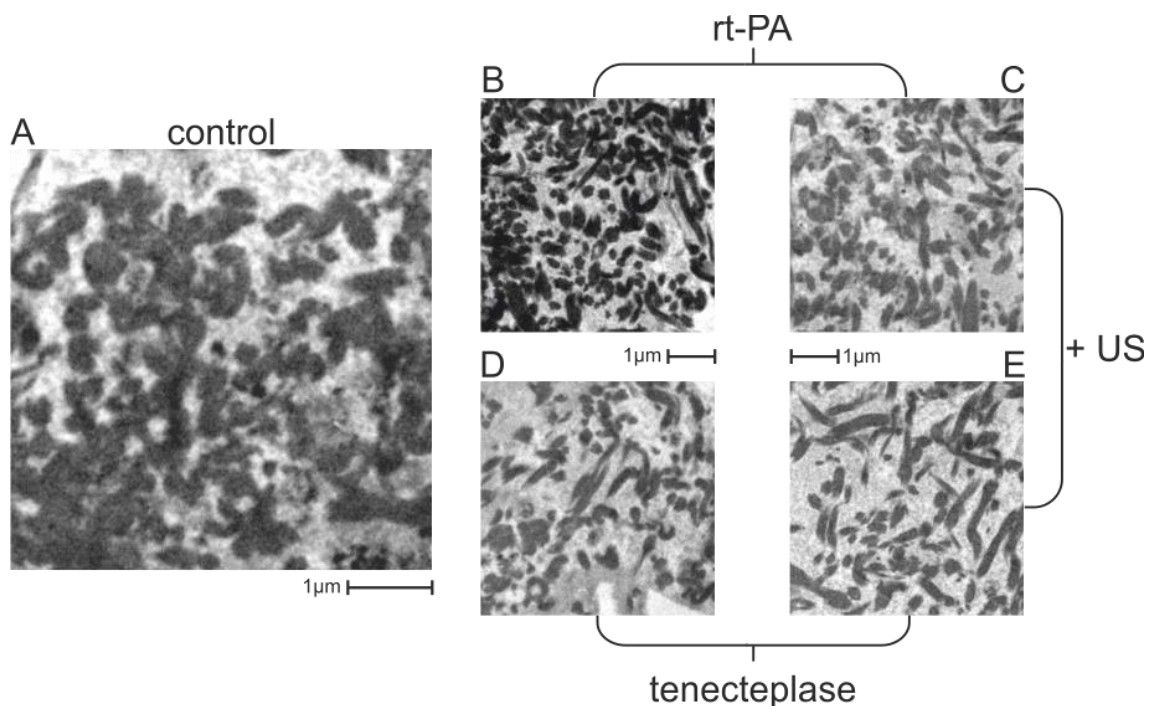


Abbildung 17: Beispiele der repräsentativen TEM-Ausschnitte, jeweils ein Ausschnitt der Gruppen A-E

Diskussion

Vorteile der *in vitro* Experimente

Die Optimierung der thrombolytischen Therapie und Erweiterung der Therapiemöglichkeiten ist für die Verbesserung der Therapie von Hirninfarkten essentiell. Ziel der für diese Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente war ein Vergleich der verfügbaren Therapien in einem standardisierten Rahmen. Vorteil der *in vitro* Experimente ist unter anderem die Möglichkeit, im Verhältnis zu *in vivo Studien*, große Stichprobengrößen einzusetzen: Für diese Arbeit wurden insgesamt über 400 Thromben behandelt, ähnliche Zahlen würden *in vivo* einen erheblich größeren Aufwand bedeuten. Standardisierte Bedingungen von *in vitro* Experimenten bedeuten zudem eine signifikant geringere Menge zu beachtender Störvariablen in der Analyse der Ergebnisse, zum Beispiel stets gleichartige Thromben, gleiche Umgebungsverhältnisse, gleiche Mischverhältnisse von Medium und Wirkstoff und zeitlich konstante experimentelle Bedingungen.

Dosisfindungsexperimente belegen die Funktionalität des eingesetzten Versuchsaufbaus

Im Rahmen der Dosisfindungsexperimente wurde eine für den Versuchsaufbau optimale Dosierung beider Thrombolytika ermittelt, so konnte sichergestellt werden, dass der Medikamenteneffekt der beiden Thrombolytika nicht unterschätzt wurde. Im Rahmen der Sonothrombolyse wurde der jeweilige Thrombus, zu jeder Zeit überprüfbar, wie gewünscht beschallt, sodass auch der Effekt von STL nicht durch fehlerhafte Applikation unterschätzt werden konnte.

Die Thromben selbst waren für die Experimente gut geeignet: In allen Gruppen nahmen sie ausreichend an Gewicht ab, sodass eine statistische Ermittlung der Gewichtsabnahme möglich wurde. Sie blieben aber auf der anderen Seite stabil genug, um eine Differenzierung zwischen den Behandlungsgruppen zu ermöglichen. Dies war in vergleichbaren *in vitro* Experimenten (zum Beispiel: Papadopoulos & Damianou, 2016) nicht der Fall, sodass dort keine valide Differenzierung der Effektivität der Thrombolyse möglich war.

Experimente belegen größere Effektivität von TNK auf den relativen Gewichtsverlust, STL ohne signifikanten Effekt.

Die Experimente, in welchen die relative Gewichtsabnahme als Auswertungsmodalität eingesetzt wurde, konnten mit den zuvor ermittelten maximal wirksamen Dosierungen, die Wirksamkeit beider Thrombolytika innerhalb des „statischen Modells“ bestätigen. Die relative durchschnittliche Gewichtsabnahme in der Kontrollgruppe war gegenüber allen Behandlungsgruppen hochsignifikant geringer ($p < 0,001$). Im Vergleich der Gruppen, in denen eine thrombolytische Therapie appliziert wurde, zeigten die beiden Tenecteplasegruppen (D + E) gegenüber ihrem jeweiligen rt-PA Gegenspieler (B + C), ebenfalls signifikant höhere durchschnittliche Gewichtsverluste (Siehe Abbildung Nr. 15) ($p \leq 0,001$). Lediglich die Ultraschallgruppen (C + E) konnten keine signifikante Verbesserung gegenüber den korrespondierenden Gruppen, in denen eine Monotherapie mit rt-PA bzw. Tenecteplase eingesetzt wurde (Gruppen B + D), erbringen. Trotz fehlender Signifikanz wiesen beide STL-Gruppen höhere mittlere Gewichtsabnahmen als die Vergleichsgruppen auf. Der zu erwartende therapeutische Effekt von Ultraschall ist im Verhältnis zu rt-PA und TNK geringer. Die durchschnittlichen Standardabweichungen innerhalb der Therapiegruppen lagen zwischen 6,7 und 10% (siehe Tabelle 1, S. 50). Es ist möglich, dass ein Therapieeffekt von STL mangels ausreichender Teststärke nicht erfasst werden konnte.

Die TEM-Analyse zeigt nur teilweise signifikante Ergebnisse

Für die TEM-Analyse wurden aus insgesamt 25 Thromben Schnitte generiert, aus denen repräsentative Ausschnitte zur Auswertung gewählt wurden. Die Analyse der Daten der Transmissionselektronenmikroskopie ergab vom Trend her ähnliche Ergebnisse, zu den durch relative Gewichtsabnahme ermittelten Ergebnissen (Siehe Abbildung Nr 16, Tabelle 1).

Insgesamt zeigten sich allerdings größere Standardabweichungen innerhalb der Gruppen und geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Nur die mit Tenecteplase behandelten Versuchsgruppen zeigten signifikant niedrigere, relative Dichtewerte als die Kontrollgruppe (Gruppe D $p < 0,01$ bzw. Gruppe E $p < 0,05$). Zusammenfassend konnten die Daten der TEM-Analyse die Wirksamkeit von Tenecteplase, aber nur eingeschränkt rt-PA, illustrieren. Die Ultraschallwirkung konnte

auch in dieser Untersuchungsmodalität nicht untermauert werden. In Gruppe D war die Dichte des Fibrinnetzes sogar im Mittel niedriger als mit zusätzlicher STL, wenn auch nicht in statistisch signifikantem Ausmaß. Die TEM-Analyse eignet sich als Analysetool der Thrombolyse, wobei für zukünftige Experimente weitere Optimierungen der Methodik und Stichprobengröße notwendig sind.

TNK ist in beiden Untersuchungsmodalitäten effektiver als rt-PA

Tenecteplase war in Zusammenschau der relativen Gewichtsabnahme und semiquantitativen TEM-Analyse wirksamer als rt-PA. Zu vermutender Grund sind die veränderten biochemischen Eigenschaften von TNK, vor allem die verbesserte Spezifität gegenüber Fibrin (Tanswell et al., 2002). Mittels TEM-Analyse wurde ausschließlich das Verhalten des Fibrinnetzes optisch analysiert. Es ist möglich, dass diese Eigenschaft von TNK in der TEM-Analyse daher besonders ins Gewicht fällt. Möglicherweise lässt sich die im Vergleich zu rt-PA deutlich niedrigere Dichte des Fibrinnetzes in diesem Kontext erklären.

Einordnung der Ergebnisse in die klinische Literatur: TNK vs rt-PA

Während sich rt-PA und Tenecteplase beide auch in klinischen Studien als wirksam erwiesen haben, gilt nur rt-PA als Goldstandard für die i.v.-Thrombolyse eines akuten Hirninfarktes, vor allem da in den bisher durchgeführten klinischen Studien zwar vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, aber größtenteils keine Überlegenheit von Tenecteplase als möglicher Nachfolger, nachgewiesen werden konnte (Logallo et al., 2017; Parsons et al., 2012). Eine Überlegenheit wurde nur in Kombination mit der mechanischen Thrombektomie demonstriert (zum Beispiel: Campbell et al., 2018)

Die Tatsache, dass Tenecteplase vollständig als Bolus appliziert wird könnte die besonders gute Wirksamkeit in Verbindung mit der mechanischen Thrombektomie bedingen. Im Vergleich zu rt-PA, welches nur zu 10% als Bolus und zu 90% als 60 Minuten dauernde Infusion verabreicht wird, führt die Bolusgabe von TNK mutmaßlich zur einer höheren maximalen Wirkstoffkonzentration. Bei unmittelbar danach eingeleiteter Thrombektomie, besteht im Optimalfall die maximale systemische Wirkstoffkonzentration während der interventionellen Angiographie und damit verbesserte Bedingungen für die mechanische Extraktion des Thrombus. In diesem Kontext werden weitere Studien benötigt.

Darüber hinaus sind klinische Studien sinnvoll, die eine mögliche Überlegenheit in bestimmten Einsatzbereichen überprüfen. Studien, welche bezüglich dieser Fragestellung aktuell rekrutieren, sind z.B. TASTE-a (Bivard et al., 2022), TEMPO und TIMELESS (U.S. National Library of Medicine). Insgesamt bleiben beide Thrombolytika weiterhin für die Behandlung des Hirninfarktes relevant. Zusätzliche Gründe für eine zunehmende Signifikanz von TNK könnten das im Rahmen der verbesserten diagnostischen Mittel zunehmend erweiterte Behandlungszeitfenster und die in diesem Rahmen zunehmende Relevanz der mechanischen Thrombektomie sein. Zusätzlich zu der thrombolytischen Effektivität war aufgrund der an Tenecteplase durchgeführten molekularen Veränderungen ein geringeres Blutungsrisiko erhofft worden. Bisher konnte eine diesbezügliche Überlegenheit in klinischen Studien aber nicht nachgewiesen werden (Campbell et al., 2018; Huang et al., 2015; Logallo et al., 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der i.v. Thrombolytika sind insgesamt mit den diskutierten klinischen Daten vergleichbar. Eine klare Überlegenheit von TNK zeigt sich in klinischen Studien bisher nicht. Analog war TNK bezüglich des relativen Gewichtsverlustes rt-PA überlegen, aber nur eine der beiden TNK-Gruppen wies eine signifikant verringerte Dichte auf als die rt-PA Gruppen.

Einordnung der Ergebnisse in die klinische Literatur: Sonothrombolyse

Die Sonothrombolyse ist in *in vivo* Studien bisher nur zum Teil mit signifikant verbesserten Therapieergebnissen assoziiert worden (Barlind et al., 2014; Saqqur et al., 2014), größer angelegte Studien mit stärkeren Stichprobengrößen konnten keinen signifikanten zusätzlichen Effekt der Sonothrombolyse nachweisen (Alexandrov et al., 2019; Alexandrov et al., 2004; Eggers et al., 2008). Die erstgenannten Studien zeigten zwar zum Teil verbesserte Reperfusionraten mit Sonothrombolyse, diese korrelierten aber oft nicht mit signifikant verbesserten klinischen Ergebnissen. Andere wiesen Defizite bezüglich der Nachsorge (Saqqur et al., 2014) auf. Studien mit niederfrequentem, und damit potenteren Schallwellen, mussten teilweise abgebrochen werden (Daffertshofer et al., 2005). Ein signifikanter Effekt der Sonothrombolyse konnte weder in Kombination mit rt-PA, noch mit Tenecteplase und außerdem mit keiner der beiden Auswertungsmodalitäten nachgewiesen werden. Die klinische Evidenz für eine Wirksamkeit der Sonothrombolyse ist ebenfalls nicht ausreichend und folglich wird STL,

in den aktuellen Leitlinien – außerhalb des Einsatzes in Studien - nicht empfohlen. Es ist zusätzlich zu erwähnen, dass die STL *in vitro*, wie sie zum Beispiel in diesen Experimenten eingesetzt wurde, deutlich weniger Störvariablen, vor allem in der Anwendung, mit sich bringt. Daher ist in der klinischen Praxis eher eine Verringerung des, in diesem Versuchsaufbau ohnehin nicht statistisch nachzuweisenden Effektes, zu erwarten.

Zusammenfassung der Erkenntnisse der Experimente

Zusammenfassend waren die Ergebnisse dieser Arbeit, sowohl von Seiten der eingesetzten Fibrinolytika (Campbell et al., 2018; Logallo et al., 2017; Parsons et al., 2012), als auch der Sonothrombolyse (Alexandrov et al., 2019; Eggers et al., 2008) vergleichbar zu den verfügbaren klinischen Daten. Von einem linearen Verhältnis der Fibrindichte zum Gewichtsverlust eines Thrombus ist nicht sicher auszugehen, sodass TEM-Analyse und relativer Gewichtsverlust ergänzend eingesetzt werden können. Der Einsatz beider Messmethoden zur Analyse der Effektivität von Thrombolyse ist daher auch in Zukunft sinnvoll. Die Sonothrombolyse hatte in den durchgeführten Experimenten in keiner Auswertungsmodalität einen signifikanten Effekt. Für die Konzipierung weiterer Experimente zu STL sollte daher eine Modifikation der Ultrachalleinstellungen, zum Beispiel variierende Ultraschallfrequenzen, eingesetzt werden. Zudem ist der Einsatz von Echosignalverstärkern zu erwägen. Die Vergleichbarkeit der Experimente mit den klinischen Daten untermauert die Eignung des statischen Modells, valide Thrombolyseexperimente durchzuführen.

Limitationen des Versuchsaufbaus und der Thrombusgenerierung

Den einleitend erwähnten Vorteilen eines standardisierten *in vitro* Versuchsaufbaus (s. Seite 55) im Vergleich zu *in vivo* Experimenten stehen nicht zu vermeidende Limitationen gegenüber, welche die Übertragbarkeit der Ergebnisse für den klinischen Einsatz einschränken können.

Erstens ist die Herstellung eines *in vitro* Thrombus immer eine Vereinfachung, im Vergleich mit den „natürlichen“ Entstehungsprozessen von *in vivo* Thromben. Diese können zudem, je nach Ätiologie und lokalen Flussprozessen, unterschiedliche Konfigurationen und Stabilität aufweisen (De Meyer et al., 2017; Jolugbo & Ariens, 2021) Dennoch besitzen die eingesetzten Thromben histologisch sehr ähnliche

Eigenschaften im Vergleich zu Thromben, welche mittels mechanischer Thrombektomie gewonnen wurden (Roessler et al., 2011). Daher ist davon auszugehen, dass das Verhalten beider hinsichtlich einer thrombolytischen Therapie ähnlich ist.

Um die Bildung zusätzlichen Thrombusmaterials während des laufenden Experiments zu verhindern, wurde während der Thrombolyse als Blutersatz Plättchen-freies Blutplasma verwendet. Trotz der resultierenden Abwesenheit zellulärer Blutbestandteile, welche an der Hämostase beteiligt sind (hauptsächlich Erythrozyten und Thrombozyten), waren alle weiteren Inhaltsstoffe für einen regelhaften Ablauf von Hämostase und Hämolyse weiterhin vorhanden, sodass die Hämolyse des Thrombus physiologisch ablaufen konnte. Dennoch kann kein experimentelles Modell vollständig die komplexen Interaktionen zwischen Thrombus und Endothel, sowie die Wechselwirkungen zwischen Koagulation, Fibrinolyse und Inflamationsprozessen, sowohl im prä- als auch postischämischen Areal abbilden. Beispielsweise kommt es im postischämischen Areal, nach wenigen Stunden, zu einer inflammatorischen Reaktion (Iadecola et al., 2020). Eine Überschneidung der frühen Immunantwort und der thrombolytischen Therapie - und damit eine mögliche Einflussnahme auf die Effektivität der Therapie - ist daher nicht gänzlich auszuschließen. Der Großteil dieser Prozesse manifestiert sich allerdings erst nach einigen Stunden bis Tagen (Dirnagl et al., 1999), die vollständige immunologische Antwort erstreckt sich sogar über Wochen (Anrather & Iadecola, 2016). Der überwiegende Teil der postischämischen inflammatorischen Reaktion ist aus diesen Gründen nicht relevant für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, welche sich auf Therapien in der Akutphase des Hirninfarkts beziehen. Die lokale Inflammation und ihre Ausprägung sind zudem Gegenstand fortlaufender Forschung, viele Details sind weiterhin nicht bekannt (Iadecola et al., 2020). Inwiefern sich der Einfluss dieser Prozesse bezüglich spezifischer Therapieformen der Thrombolyse überhaupt unterscheidet, sofern sie in der Akutphase aktiv sind, kann daher ebenfalls nicht benannt werden.

Zuletzt kann der physiologische Blutfluss, und damit die Einflüsse der lokalen Strömungsverhältnisse auf die Thrombolyse, im Rahmen des „statischen Modells“ nicht reproduziert werden.

Limitationen der *in vitro* Thrombolyse

Aufgrund der niedrigen Halbwertszeit von rt-PA wurde die Applikation des Wirkstoffes jeweils in 15-minütigen Abständen durchgeführt, insgesamt vier Mal in der einstündigen Versuchsdauer. Die Dauerinfusion einer geringen Menge rt-PA, äquivalent zu der klinischen Verabreichung, wäre bei den eingesetzten geringen Dosismengen nicht technisch umsetzbar gewesen. Zusätzlich wäre im Rahmen der geringen Dosismenge und mangels dynamischen Flusses, eine ausreichende Durchmischung von Wirkstoff und Plasma nicht zu garantieren gewesen. Häufigeres Wechseln hätte eine deutlich erhöhte mechanische Belastung, und damit höhere Vulnerabilität des Fibrinnetzes, für den Thrombus bedeutet.

Diese Form der Wirkstoffapplikation entspricht natürlich nur einer Annäherung an die klinische Realität. Die Auswirkungen von rt-PA auf die Blutgerinnung bestehen allerdings deutlich länger als die Halbwertszeit von weniger als 10 Minuten. Die Menge systemisch vorhandenen Plasminogens erreicht beispielsweise erst drei Stunden nach Therapiebeginn das Minimum (Bell, 2002), welches auf eine für längere Zeit fortbestehende Aktivierung der Hämolysen hinweist. Tenecteplase wird für den klinischen Gebrauch, aufgrund der höheren Halbwertszeit von 22 Minuten (Tanswell et al., 2002), nur einmalig als Bolus verabreicht, sodass der Einsatz von Tenecteplase analog zu dem klinischen Gebrauch erfolgen konnte.

Die Ergebnisse beider Dosisfindungsexperimente zeigten Dosis-Wirkungskurven, welche in den höheren Dosierungen eng zusammenliegende Thrombolyseraten für die einzelnen Dosierungen aufweisen. Abnehmende Unterschiede bei zunehmender Dosierung sind im Rahmen der Annäherung an den Dosissättigungswert zu erwarten. Der Einsatz einer geringeren Dosierung für weitere Experimente wäre dennoch zu begründen gewesen, insbesondere da die letztendlich eingesetzten Dosierungen sowohl für rt-PA als auch für Tenecteplase vermutlich die *in vivo* eingesetzte therapeutische Dosierung überschreiten. Einschränkend anzumerken ist allerdings, dass die angenommenen *in vivo* Konzentrationen von rt-PA und TNK, nur eine rechnerische Annäherung darstellen: Mittels Nadler Formel wurde das durchschnittliche Blutvolumen eines idealisierten Menschen errechnet (Nadler et al., 1962). Eine Übertragung auf die Bandbreite der tatsächlichen Konzentrationen im klinischen Einsatz ist daher nur eingeschränkt möglich. Die pharmakokinetischen Unterschiede, zwischen dem *in vitro* Versuchsaufbau und einer *in vivo* i.v.-Thrombolyse, können in diesem Kontext ebenfalls nicht quantifiziert werden.

Hochwertige Untersuchungen bezüglich der tatsächlichen systemischen Wirkstoffkonzentration im Rahmen der Akuttherapie eines Hirninfarktes gibt es weder für rt-PA noch für Tenecteplase. Von Tanswell et al. (Tanswell et al., 1992) wurden zum Beispiel nur bei 4 Patienten die Serumkonzentration rt-PA gemessen. Diese Patientin waren außerdem mit einer von der Hirninfarkttherapie abweichenden Dosierung behandelt worden. Zusammenfassend hätte die, für diese Arbeit letztendlich eingesetzte Dosierung, in jedem Fall lediglich einer theoretischen Annäherung an die klinische Realität entsprochen. Priorisiert wurde für die Dosisfindung die Ermittlung der Dosisättigungsschwelle und damit das Erreichen der optimalen Wirksamkeit beider Thrombolytika. Die Konsequenz der höheren Dosierung beider Medikamente war mit diesem Ziel ausreichend zu Begründen.

Limitationen der *in vitro* Sonothrombolyse

Die Sonothrombolyse muss im klinischen Einsatz Gewebe und Schädelkalotte durchdringen, um das betroffene Gefäß zu beschallen. Die resultierende Dämpfung der Schallwellen variiert intraindividuell deutlich. Bei der Messung unterschiedlicher Schädelkalloten mit einer Ultraschallfrequenz von 1,8 MHz wurden zwischen 8,8 bis 21,1 dB Dämpfung nachgewiesen (Pfaffenberger et al., 2005) Eine vergleichsweise geringere Dämpfung ist im eingesetzten experimentellen Aufbau zu vermuten, sodass die Möglichkeit einer Überschätzung des thrombolytischen Effektes der Therapie besteht. Außerdem kann eine tatsächliche Beschallung des Thrombusmaterials *in vivo* nicht immer garantiert werden. Selbst unter Annahme dieser –*in vitro* mutmaßlich wirkungsverstärkenden – Störvariablen, konnte innerhalb der durchgeführten Experimente keine signifikante Verbesserung der Effektivität der Thrombolyse mit zusätzlicher STL nachgewiesen werden.

Zuletzt wurde das eingesetzte experimentelle Modell ausschließlich für die Analyse der thrombolytischen Effektivität verschiedener Therapien konzipiert. Das Auftreten klinisch relevanter Komplikationen, zum Beispiel die Rate intrakranieller Blutungen, werden im Rahmen der Experimente selbstverständlich nicht abgebildet.

Limitation der Vergleichbarkeit bezüglich Blutungskomplikationen

Die große Mehrheit der klinischen Studien zeigten bisher bezüglich der Komplikationsrate nach i.v.-Thrombolyse keinen signifikanten Unterschied zwischen rt-PA und TNK. Lediglich NORTEST-2 wies signifikant erhöhte Blutungsraten mit TNK nach (Kvistad et al., 2022). Die Mehrzahl der klinischen Studien wurden allerdings ohnehin mit einer niedrigeren Dosierung als NORTEST-2 durchgeführt (in der Regel 0,25 mg/kg anstatt 0,4 mg/kg) und ergaben größtenteils sehr ähnliche Ergebnisse bezüglich der Effektivität der Thrombolyse. Auch die Publikationen, in denen TNK bessere Ergebnisse als rt-PA erreichte, sind nicht auf solche mit 0,4 mg/kg beschränkt. Ein Beispiel ist EXTEND-IA (Campbell et al., 2018), hier wurden 0,25 mg/kg eingesetzt. Dass TNK mehr Blutungskomplikationen als rt-PA verursacht, oder dass eine Dosierung von 0,25 mg/kg KG die Effektivität von TNK relevant reduziert, ist also in Zusammenschau der verfügbaren Daten unwahrscheinlich. Die im Rahmen der modifizierten pharmakologischen Eigenschaften erhoffte Überlegenheit von TNK, in Bezug auf Blutungskomplikationen, konnte anhand derselben Daten aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Limitationen der TEM-Analyse

Die Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Thromben kann als Analysetool der Thrombolyse eingesetzt werden. Es sind aber weitere Optimierungen der Methodik notwendig. In einigen der eingesetzten Thromben hätte die Qualität mehrerer Schnitte eine Analyse ermöglicht, da dies aber nicht für alle Thromben der Fall war, konnte jeweils nur ein Schnitt analysiert werden. Die Folge war, dass nur eine sehr geringe Fläche der jeweiligen Thromben analysiert wurde. Dies ging außerdem mit einem sehr hohen Herstellungsaufwand der TEM Schnittbildgebung einher. Prinzipiell könnten, für weitere Experimente, größere Schnitte, und gegebenenfalls mehr Schnitte pro Thrombus, analysiert werden. Da allerdings in beinahe allen Schnitten Artefakte, im Sinne von gewebefreien Stellen oder Quetschungen, auftraten, müssten dennoch weiterhin manuelle Kontrollen und Korrekturen durchgeführt werden, in welchen Artefakt-belastete Teile der Schnitte aus der Analyse genommen werden. Für diese erweiterten Experimente ist daher trotzdem keine vollständig automatisierte - und damit völlig objektive Auswahl der zu analysierenden Schnitte - möglich. Für die TEM-Experimente wurden Thromben ohne die Erythrozyten reiche „boundary layer“

hergestellt. Ziel der TEM-Analyse ist die Darstellung der Auswirkungen der Therapie auf das Fibrinnetz, welche durch die Anwesenheit von Erythrozyten eingeschränkt wird, da die Grenze zwischen Erythrozyten und Fibrin in der TEM Analyse nicht sicher zu differenzieren ist. Veränderungen im Verhalten des Fibrinnetzes können aber nicht ausgeschlossen werden. Die Hypothese, nachdem der Ultraschall seine thrombolytische Wirkung über eine Entfernung der roten Blutkörperchen aus dem Thrombus entfaltet (Auboire et al., 2017), kann mit dem eingesetzten Algorithmus der Thrombusgenerierung in den TEM-Experimenten daher nicht überprüft werden.

Die erhöhte Spezifität von Fibrin könnte dazu führen, dass TNK im Vergleich zu rt-PA, in der isolierten Beurteilung des Fibrinnetzes noch besser abschneidet als in der Beurteilung der Effektivität der Thrombolyse auf den ganzen Thrombus, inklusive aller zellulärer Bestandteile. Sofern sich TNK allerdings von Seiten seiner rein fibrinolytischen Wirkung als effektiver erweisen sollte, stellt sich folglich die Frage, ob TNK als Thrombolytikum insgesamt effektiver ist, oder ob rt-PA, mittels eines aktuell nicht bekannten Mechanismus, diesen Nachteil „ausgleichen“ kann. Da Fibrin maßgeblich für die Stabilität des Thrombus verantwortlich ist, erscheint dies aber unwahrscheinlich.

Optimierung der TEM-Analyse

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten TEM-Experimente war die Entwicklung einer bildgebenden Analysemodalität als Ergänzung zu der primären Auswertung des relativen Gewichtsverlustes. Dies ermöglicht potentiell eine Verbesserung der Analysequalität, sowie die genauere Charakterisierung der Veränderungen. Dem Autor sind (Stand 12/2022) keine weiteren systematischen Auswertungen von Thrombolysexperimenten mittels TEM bekannt, sodass ein Literaturvergleich nicht möglich war.

Weitere Anpassungen sowohl des Studiendesigns als auch der Auswertung sind daher für mögliche Folgestudien notwendig:

- höhere Probenanzahl
- Analyse von mehreren Schnitten pro Thrombus
- zusätzliche Kontrollgruppe (mit Messung sofort nach Thrombusgenerierung)

Die niedrige Stichprobengröße innerhalb der Experimente führte zu einer geringeren Testschärfe. Zusätzlich kann zur Verbesserung der Testschärfe die Auswahl mehrerer Schnitte aus den einzelnen Thromben erfolgen. Eine manuelle Auswahl der Schnitte ist ohnehin auf Grund von Artefaktbildung notwendig. Es muss aber sichergestellt sein, dass die Ergebnisse einzelner Thromben nicht übermäßig ins Gewicht fallen, zum Beispiel dadurch, dass mehr Schnitte von Thromben besonders guter Qualität in die Analyse einbezogen werden. Zuletzt sollte eine zusätzliche Referenzgruppe eingesetzt werden, welche „frische“, nicht behandelte Thromben beinhaltet. Die Dichte des Fibrinnetzes in dieser Gruppe sollte als Referenzwert für die maximale Dichte des Fibrinnetzes für die produzierten Thromben gelten, da aufgrund der zellulären Bestandteile eines Thrombus die maximale relative Dichte des Fibrinnetzes nie 100% betragen kann. Ergebnisse werden in diesem Fall als relative Größe, im Verhältnis zu der „maximalen“ Dichte der Referenzgruppe, gemessen. Die modifizierte Berechnung des relativen Dichteverlustes der Thromben, anhand des Beispiels der für diese Arbeit durchgeführten Versuche, sähe folgendermaßen aus:

$$\frac{\text{relative Fibrindichte (\%) Gruppen A – E}}{\text{relative Fibrindichte (\%) neue Referenzgruppe A'}}$$

Dies wird zu einer besseren Trennschärfe im Vergleich der Behandlungsgruppen führen.

Implikationen für zukünftige Experimente und den klinischen Einsatz von TNK

Zusätzlich zu den beschriebenen Möglichkeiten für ergänzende TEM-Studien ist für den Versuchsaufbau das Einsetzen von *ex vivo* Thromben aus der Thrombektomie interessant für weitere Experimente. Auf diese Art geborgene Thromben waren durch die alleinige medikamentöse Thrombolyse *in vivo* – fast immer mit rt-PA - nicht ausreichend behandelbar. Das Verhalten dieser Thromben im experimentellen Aufbau ist zum Beispiel relevant in Bezug auf die vermuteten Vorteile von TNK gegenüber rt-PA für die mechanische Thrombektomie. Die Datenlage bezüglich der Zusammensetzung und Widerstandsfähigkeit von *ex vivo* Thromben, in Abhängigkeit von der Ätiologie des Thrombus, ist uneinheitlich. Marder et al. konnten keine entsprechende Korrelation abbilden (Marder et al., 2006), während Jolugbo et al. vermuteten, dass kardial-embolische Thromben reicher an Fibrin und Thrombozyten seien (Jolugbo & Ariens, 2021). Inwiefern möglicherweise Wirkstoffabhängig das Therapieergebnis modifiziert

wird, ist nicht bekannt. Es ist zum Beispiel vorstellbar, dass ein fibrinreicher Thrombus aufgrund der höheren Fibrinspezifität von TNK, „anfälliger“ für eine Therapie mit TNK ist.

Auch der Einsatz von *ex vivo* Thromben birgt einige potentielle Störvariablen, welche bedacht werden müssen. Diese umfassen beispielsweise die geringere Verfügbarkeit und größere Variabilität der Morphologie von *ex vivo* Thromben. Des Weiteren sind *ex vivo* Thromben bereits in unterschiedlichem Ausmaß behandelt worden, sodass eine weitere Unterteilung in Subgruppen erfolgen müsste, welches die ohnehin geringe Stichprobengröße weiter fraktionieren würde. Zusätzlich findet durch die mechanische Thrombektomie selbst bereits eine Selektion der Thromben statt: Im Rahmen der Therapie bereits fragmentierte Thromben, sowie Thromben mit der größten Therapieresistenz, welche naturgemäß häufiger zu erfolglosen Behandlungen führen, können seltener geborgen werden und stehen für *ex vivo* Experimente in geringerem Ausmaß zur Verfügung. (Marder et al., 2006). Letztlich scheint es, dass TNK zeitnah möglicherweise auch außerhalb klinischer Studien auf die Probe gestellt werden wird. Boehringer Ingelheim, alleiniger Produzent von rt-PA und TNK, hat Produktionsschwierigkeiten gemeldet. Ab Ende des Jahres 2022 kam es zu Lieferengpässen, die Produktion einer Packungsgröße (2mg) wurde – vorerst vorübergehend - eingestellt. Lieferunterbrechungen von rt-PA sind weiter möglich. Vorübergehend würde Tenecteplase dann als einziges Thrombolytikum zur Verfügung stehen, sodass möglicherweise die - Off-label - Thrombolyse mit Tenecteplase als einzige Therapiemöglichkeit zur Verfügung stünde. Zumindest bis Juli 2023, denn zu diesem Zeitpunkt rechnet Boehringer Ingelheim auch mit einer „längeren Lieferunterbrechung“ von Tenecteplase (siehe: Boehringer Ingelheim).

Zusammenfassung

Ischämische Hirninfarkte führen zu einer großen Last an Morbidität und Mortalität und daher großem individuellen Leid. Die verfügbaren medikamentösen Akuttherapien bestehen aus: - i.v.-Thrombolyse mittels rt-PA (Alteplase) oder Tenecteplase (TNK).

- Sonothrombolyse (kombiniert mit i.v.-Thrombolyse)

- Bei großen Gefäßverschlüssen: mechanische Thrombektomie

Goldstandard ist rt-PA, TNK verspricht eine effektivere und nebenwirkungsärmere Therapie ist aber noch nicht ausreichend evidenzbasiert belegt. Der Einsatz von Sonothrombolyse (STL) soll synergistisch, mit der i.v.-Thrombolyse, die Effektivität der Lysetherapie verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Thromben verwendet, um die Wirksamkeit von TNK, rt-PA, sowie der STL zu vergleichen. Auswertungsparameter waren der relative Gewichtsverlust (n=300) und die in der TEM ermittelte Dichte des Fibrinnetzes (n=25). Nach experimenteller Dosisfindung wurde in fünf Gruppen die Effektivität der Thrombolyse untersucht. Alle Therapieformen zeigten signifikant höhere relative Gewichtsabnahmen als die Kontrollgruppe. Für TNK wurden signifikant bessere Ergebnisse als für rt-PA erzielt (alle $p \leq 0,001$). Die Ergebnisse der TEM-Auswertung waren weniger aussagekräftig: In beiden TNK-Gruppen war die Fibrindichte signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$), in einer TNK-Gruppe (D) im Vergleich zu rt-PA (B und C, $p < 0,05$). Keine der rt-PA Gruppen erzielte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant bessere Ergebnisse. Ein therapeutischer Effekt von STL konnte mit keiner Auswertungsmethode belegt werden. In klinischen Studien konnte bisher keine umfassende Überlegenheit von Tenecteplase gegenüber rt-PA nachgewiesen werden. Für bestimmte Indikationen, zum Beispiel in Kombination mit der mechanischen Thrombektomie, ist TNK aber möglicherweise effektiver als rt-PA. Weitere Studien sind notwendig. Ein signifikanter Effekt der STL konnte auch in den größten klinischen Studien nicht belegt werden. In einigen Subpopulationen deutete sich ein potentieller Nutzen an. Ergänzende klinische Daten sind vonnöten. Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente belegen die Validität des experimentellen Aufbaus für *in vitro* Thrombolyseexperimente. Die TEM-Analyse als Auswertungsmethode zeigt großes Potential. Sie muss methodisch weiter optimiert werden. Für zukünftige Studien ist der Einsatz von *ex vivo* Thromben in das „statische Modell“ interessant.

Conclusion

Optimizing thrombolytic therapy is vital for improving stroke outcomes, as stroke causes high rates of populational morbidity and mortality. Available treatments include:

- i.v. thrombolysis with rt-PA (alteplase) or Tenecteplase (TNK).
- Sonothrombolysis (additionally to i.v. thrombolysis)
- For large vessels mechanical thrombectomy

The current gold standard treatment is rt-PA, while the goal of developing TNK was to produce a more efficacious and less side effect prone compound. Sonothrombolysis (STL) as an additional form of treatment is theorized to improve thrombolysis efficacy by allowing medication to penetrate the clot more extensively. The aim of this study was to create standardized experimental conditions to evaluate the efficacy of TNK compared to rt-PA with and without additional STL. For this, *in vitro* clots were used and analyzed using two main metrics of evaluation: relative weight loss (n=300) and semiquantitative transmission electron microscopy (TEM) analysis of fibrin fiber density (n=25). Following dose-finding experiments for both TNK and rt-PA both metrics were examined in 5 treatment groups. All 4 treatment groups exhibited significantly higher relative weight loss than the controls. Furthermore, TNK was more efficacious in both groups when compared to rt-PA (all $p \leq 0,001$). TEM evaluation did not achieve similar significance. While clots in both TNK groups were demonstrated to have significantly less dense fibrin fiber networks ($p < 0,01$ and $p < 0,05$) compared to the control group, and one TNK group significantly outperformed rt-PA groups ($p < 0,05$), neither rt-PA group demonstrated significantly reduced values for fiber density compared to control. Concerning STL, increased efficacy could not be demonstrated for rt-PA or TNK, neither for weight loss nor fibrin fiber density.

Current clinical studies have not been able to confirm a general superiority of TNK. However, its utility in certain forms of treatment, such as the combination with mechanical thrombectomy have demonstrated greater efficacy for TNK. Further studies are ongoing. In the largest clinical studies STL could not significantly improve stroke outcomes, but showed possible value in distinct subgroups, especially in the setting of peripheral hospitals. The experiments performed in the frame of this dissertation demonstrate the validity of the *in vitro* experimental setup for thrombolysis experiments, while TEM analysis shows promise as an evaluation tool, providing prior optimization of methods. *Ex vivo* thrombi should be considered for use in future experiments.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
ASCOD	A – atherosclerosis/large vessel disease, S – small vessel disease, C – cardiac source, O – other cause, D – dissection Klassifikation
BMI	body mass index
CT	Computertomographie
CTP	CT-Perfusion
DALY	disability adjusted life years
DOAK	direkte orale Antikoagulantien
ESUS	embolic stroke of unknown source
ICB	intrazerebrale Blutung
ICH	intracranial hemorrhage
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
mRS	modified Rankin Scale
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobengröße
NIHSS	national institute of health stroke scale
p	Signifikanzwert
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PAR	Protease aktivierte Rezeptor
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PFP	Plättchen-freies Plasma

POM	Polyoxymethylene
rt-PA	recombinant tissue Plasminogen Activator oder rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
SAB	Subarachnoidalblutung
SAH	subarachnoid hemorrhage
SD	standart deviation oder Standardabweichung
STL	Sonothrombolyse
TAG	Thrombozytenaggregationshemmung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIA	transitorische ischämische Attacke
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment Klassifikation
TNK	Tenecteplase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Plaque Ruptur und arterio-arterielle Embolie	4
Abb. 2: Makroangiopathischer Infarkt	5
Abb. 3: Kardial embolischer Infarkt	6
Abb. 4: mikroangiopathischer Infarkt	7
Abb. 5: schematische Darstellung eines Moleküls Tenecteplase	20
Abb. 6: Histologischer Vergleich verschiedener Thrombus Zusammensetzungen	31
Abb. 7: Statisches Modell, schematische Darstellung	40
Abb. 8: Schema der Thrombolyseexperimente mit rt-PA	41
Abb. 9: Schema der Thrombolyseexperimente mit Tenecteplase	42
Abb. 10: Histogramm der Graustufenverteilung im TEM Schnitt eines <i>in vitro</i> Thrombus	45
Abb. 11: Einstellungen zur Auswertung der Fibrinschnitte in ImageJ	46
Abb. 12: TEM-Schnitte ohne und mit Tonwertkorrektur	47
Abb. 13: Ergebnisse der Dosisfindungsexperimente mit rt-PA nach einer bzw. zwei Stunden	48
Abb. 14: Ergebnisse der Dosisfindungsexperimente mit Tenecteplase nach einer bzw. zwei Stunden.	49
Abb. 15: Balkendiagramm des mittleren relativen Gewichtsverlusts der fünf Versuchsgruppen	52
Abb. 16: Boxplot der prozentual mit Fibrin bedeckten Fläche in den angefertigten TEM Ausschnitten	53
Abb. 17: Beispiele der repräsentativen TEM-Ausschnitte	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittlicher Gewichtsverlust der Versuchsgruppen (A-E) 50

Literaturverzeichnis

Adams, H. P., Jr., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E., 3rd. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24(1), 35-41.
<https://doi.org/10.1161/01.str.24.1.35>

Albers, G. W., Marks, M. P., & Lansberg, M. G. (2018). Thrombectomy for Stroke with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med*, 378(19), 1849-1850.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1803856>

Alemseged, F., Ng, F. C., Williams, C., Puetz, V., Boulouis, G., Kleinig, T. J., Rocco, A., Wu, T. Y., Shah, D., Arba, F., Kaiser, D., Di Giuliano, F., Morotti, A., Sallustio, F., Dewey, H. M., Bailey, P., O'Brien, B., Sharma, G., Bush, S., . . . group, E. I. T. s. (2021). Tenecteplase vs Alteplase Before Endovascular Therapy in Basilar Artery Occlusion. *Neurology*, 96(9), e1272-e1277.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011520>

Alexandrov, A. V., Kohrmann, M., Soenne, L., Tsvigoulis, G., Barreto, A. D., Demchuk, A. M., Sharma, V. K., Mikulik, R., Muir, K. W., Brandt, G., Alleman, J., Grotta, J. C., Levi, C. R., Molina, C. A., Saqqur, M., Mavridis, D., Psaltopoulou, T., Vosko, M., Fiebich, J. B., . . . Investigators, C.-E. T. (2019). Safety and efficacy of sonothrombolysis for acute ischaemic stroke: a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*, 18(4), 338-347.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30026-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30026-2)

- Alexandrov, A. V., Molina, C. A., Grotta, J. C., Garami, Z., Ford, S. R., Alvarez-Sabin, J., Montaner, J., Saqqur, M., Demchuk, A. M., Moye, L. A., Hill, M. D., Wojner, A. W., & Investigators, C. (2004). Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, *351*(21), 2170-2178. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041175>
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Callahan, A., 3rd, Goldstein, L. B., Hennerici, M., Rudolph, A. E., Sillesen, H., Simunovic, L., Szarek, M., Welch, K. M., Zivin, J. A., & Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels, I. (2006). High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med*, *355*(6), 549-559. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061894>
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L. R., Donnan, G. A., Wolf, M. E., & Hennerici, M. G. (2013). The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis*, *36*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1159/000352050>
- Anderson, C. S., Robinson, T., Lindley, R. I., Arima, H., Lavados, P. M., Lee, T. H., Broderick, J. P., Chen, X., Chen, G., Sharma, V. K., Kim, J. S., Thang, N. H., Cao, Y., Parsons, M. W., Levi, C., Huang, Y., Olavarria, V. V., Demchuk, A. M., Bath, P. M., . . . Coordinators. (2016). Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*, *374*(24), 2313-2323. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515510>
- Anrather, J., & Iadecola, C. (2016). Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*, *13*(4), 661-670. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x>
- Astrup, J., Siesjo, B. K., & Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, *12*(6), 723-725. <https://doi.org/10.1161/01.str.12.6.723>
- Auboire, L., Tranquart, F., Ossant, F., Sennoga, C., & Bouakaz, A. (2017). Impact of Sonothrombolysis on in vitro Blood Clot: Pictographic Validation with Electron Microscopy. *Ultraschall Med*, *38*(1), 83-84. <https://doi.org/10.1055/s-0035->

1553322 (Wirkung der Sonothrombolyse auf einen In-Vitro-Thrombus:
Piktografische Bewertung mittels Elektronenmikroskopie.)

- Banks, J. L., & Marotta, C. A. (2007). Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. *Stroke*, 38(3), 1091-1096.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258355.23810.c6>
- Barlinn, K., Tsivgoulis, G., Barreto, A. D., Alleman, J., Molina, C. A., Mikulik, R., Saqqur, M., Demchuk, A. M., Schellinger, P. D., Howard, G., & Alexandrov, A. V. (2014). Outcomes following sonothrombolysis in severe acute ischemic stroke: subgroup analysis of the CLOTBUST trial. *Int J Stroke*, 9(8), 1006-1010.
<https://doi.org/10.1111/ijvs.12340>
- Bell, W. R. (2002). Present-day thrombolytic therapy: therapeutic agents--pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med*, 3 Suppl 2, S34-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556741>
- Bembenek, J. P., Niewada, M., Siudut, J., Plens, K., Czlonkowska, A., & Undas, A. (2017). Fibrin clot characteristics in acute ischaemic stroke patients treated with thrombolysis: the impact on clinical outcome. *Thromb Haemost*, 117(7), 1440-1447. <https://doi.org/10.1160/TH16-12-0954>
- Bivard, A., Zhao, H., Coote, S., Campbell, B., Churilov, L., Yassi, N., Yan, B., Valente, M., Sharobeam, A., Balabanski, A., Dos Santos, A., Ng, F., Langenberg, F., Stephenson, M., Smith, K., Bernard, S., Thijs, V., Cloud, G., Choi, P., . . . Parsons, M. (2022). Tenecteplase versus Alteplase for Stroke Thrombolysis Evaluation Trial in the Ambulance (Mobile Stroke Unit-TASTE-A): protocol for a prospective randomised, open-label, blinded endpoint, phase II superiority trial of tenecteplase versus alteplase for ischaemic stroke patients presenting within 4.5 hours of symptom onset to the mobile stroke unit. *BMJ Open*, 12(4), e056573.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-056573>

Blanco, P., & Abdo-Cuza, A. (2018). Transcranial Doppler ultrasound in neurocritical care. *J Ultrasound*, 21(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s40477-018-0282-9>

Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG 55216 Ingelheim am Rhein, Wichtige Information zu Actilyse®, Actilyse® Cathflo und Metalyse®, Pressemeldung des Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte https://www.bfarm.de/SharedDocs/Arzneimittelzulassung/Lieferengpaesse/DE/2022/info_tenecteplase_alteplase_20220427.html Zugriff: 03.07.2022 12:32

Brinjikji, W., Duffy, S., Burrows, A., Hacke, W., Liebeskind, D., Majoie, C., Dippel, D. W. J., Siddiqui, A. H., Khatri, P., Baxter, B., Nogueira, R., Gounis, M., Jovin, T., & Kallmes, D. F. (2017). Correlation of imaging and histopathology of thrombi in acute ischemic stroke with etiology and outcome: a systematic review. *J Neurointerv Surg*, 9(6), 529-534. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2016-012391>

Burghardt, R. C., & Droleskey, R. (2006). Transmission electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 2, Unit 2B 1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b01s03>

Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., Yan, B., Bush, S. J., Dewey, H. M., Thijs, V., Scroop, R., Simpson, M., Brooks, M., Asadi, H., Wu, T. Y., Shah, D. G., Wijeratne, T., Ang, T., Miteff, F., . . . Investigators, E.-I. T. (2018). Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N Engl J Med*, 378(17), 1573-1582. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal716405>

Carr, M. E., Jr., & Hardin, C. L. (1987). Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol*, 253(5 Pt 2), H1069-1073. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.253.5.H1069>

Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA):

- Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
- Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*, *129*(3), 307-321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>
- Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, *29*(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>
- Choi, M. H., Park, G. H., Lee, J. S., Lee, S. E., Lee, S. J., Kim, J. H., & Hong, J. M. (2018). Erythrocyte Fraction Within Retrieved Thrombi Contributes to Thrombolytic Response in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, *49*(3), 652-659. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.019138>
- Cines, D. B., Lebedeva, T., Nagaswami, C., Hayes, V., Masefski, W., Litvinov, R. I., Rauova, L., Lowery, T. J., & Weisel, J. W. (2014). Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*, *123*(10), 1596-1603. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523860>
- Collet, J. P., Park, D., Lesty, C., Soria, J., Soria, C., Montalescot, G., & Weisel, J. W. (2000). Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *20*(5), 1354-1361. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1354>
- Crawley, J. T., Zanardelli, S., Chion, C. K., & Lane, D. A. (2007). The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*, *5 Suppl 1*, 95-101. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x>
- Cunningham, K. S., & Gotlieb, A. I. (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest*, *85*(1), 9-23. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700215>

- Daffertshofer, M., Gass, A., Ringleb, P., Sitzer, M., Sliwka, U., Els, T., Sedlaczek, O., Koroshetz, W. J., & Hennerici, M. G. (2005). Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial. *Stroke*, 36(7), 1441-1446. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000170707.86793.1a>
- Datta, S., Coussios, C. C., McAdory, L. E., Tan, J., Porter, T., De Courten-Myers, G., & Holland, C. K. (2006). Correlation of cavitation with ultrasound enhancement of thrombolysis. *Ultrasound Med Biol*, 32(8), 1257-1267. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.04.008>
- De Meyer, S. F., Andersson, T., Baxter, B., Bendszus, M., Brouwer, P., Brinjikji, W., Campbell, B. C., Costalat, V., Davalos, A., Demchuk, A., Dippel, D., Fiehler, J., Fischer, U., Gilvarry, M., Gounis, M. J., Gralla, J., Jansen, O., Jovin, T., Kallmes, D., . . . Clot Summit, G. (2017). Analyses of thrombi in acute ischemic stroke: A consensus statement on current knowledge and future directions. *Int J Stroke*, 12(6), 606-614. <https://doi.org/10.1177/1747493017709671>
- Di Cera, E. (2008). Thrombin. *Mol Aspects Med*, 29(4), 203-254. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.01.001>
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22(9), 391-397. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01401-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01401-0)
- Dong, Y., Sui, Y., Cheng, X., & Wang, D. Z. (2022). Is tenecteplase ready to replace alteplase to treat acute ischaemic stroke? The knowns and unknowns. *Stroke Vasc Neurol*, 7(1), 1-5. <https://doi.org/10.1136/svn-2021-001321>
- Donnan, G. A., Davis, S. M., Chambers, B. R., Gates, P. C., Hankey, G. J., McNeil, J. J., Rosen, D., Stewart-Wynne, E. G., & Tuck, R. R. (1996). Streptokinase for acute ischemic stroke with relationship to time of administration: Australian

- Streptokinase (ASK) Trial Study Group. *JAMA*, 276(12), 961-966.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805730>
- Eggers, J., Konig, I. R., Koch, B., Handler, G., & Seidel, G. (2008). Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: results from a randomized study. *Stroke*, 39(5), 1470-1475.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.503870>
- Emberson, J., Lees, K. R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S., Donnan, G., Grotta, J., Howard, G., Kaste, M., Koga, M., von Kummer, R., Lansberg, M., Lindley, R. I., Murray, G., Olivot, J. M., . . . Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative, G. (2014). Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*, 384(9958), 1929-1935. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60584-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60584-5)
- Feigin, V. L., Roth, G. A., Naghavi, M., Parmar, P., Krishnamurthi, R., Chugh, S., Mensah, G. A., Norrving, B., Shiue, I., Ng, M., Estep, K., Cercy, K., Murray, C. J. L., Forouzanfar, M. H., Global Burden of Diseases, I., Risk Factors, S., & Stroke Experts Writing, G. (2016). Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol*, 15(9), 913-924.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30073-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30073-4)
- Ferro, J. M. (2003). Cardioembolic stroke: an update. *Lancet Neurol*, 2(3), 177-188.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00324-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00324-7)
- Flint, A. C., Banki, N. M., Ren, X., Rao, V. A., & Go, A. S. (2012). Detection of paroxysmal atrial fibrillation by 30-day event monitoring in cryptogenic ischemic stroke: the Stroke and Monitoring for PAF in Real Time (SMART) Registry. *Stroke*, 43(10), 2788-2790. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.665844>

- Francis, C. W., Blinc, A., Lee, S., & Cox, C. (1995). Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol*, *21*(3), 419-424. [https://doi.org/10.1016/0301-5629\(94\)00119-x](https://doi.org/10.1016/0301-5629(94)00119-x)
- Frühwald, T., Gärtner, U., Stöckmann, N., Marxsen, J. H., Gramsch, C., & Roessler, F.C. (2019). In vitro examination of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA. *BMC Neurol*, *19*(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1404-5>
- Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J. M., & Baron, J. C. (1996). Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol*, *40*(2), 216-226. <https://doi.org/10.1002/ana.410400213>
- Gale, A. J. (2011). Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol*, *39*(1), 273-280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>
- Girish, V., & Vijayalakshmi, A. (2004). Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*, *41*(1), 47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105580>
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., & Investigators, E. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, *359*(13), 1317-1329. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>
- Haley, E. C., Jr., Thompson, J. L., Grotta, J. C., Lyden, P. D., Hemmen, T. G., Brown, D. L., Fanale, C., Libman, R., Kwiatkowski, T. G., Llinas, R. H., Levine, S. R., Johnston, K. C., Buchsbaum, R., Levy, G., Levin, B., & Tenecteplase in Stroke, I. (2010). Phase IIB/III trial of tenecteplase in acute ischemic stroke: results of a prematurely terminated randomized clinical trial. *Stroke*, *41*(4), 707-711. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572040>
- Holland, C. K., Vaidya, S. S., Datta, S., Coussios, C. C., & Shaw, G. J. (2008). Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro

- porcine clot model. *Thromb Res*, 121(5), 663-673.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.07.006>
- Hossmann, K. A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*, 36(4), 557-565. <https://doi.org/10.1002/ana.410360404>
- Huang, X., Cheripelli, B. K., Lloyd, S. M., Kalladka, D., Moreton, F. C., Siddiqui, A., Ford, I., & Muir, K. W. (2015). Alteplase versus tenecteplase for thrombolysis after ischaemic stroke (ATTEST): a phase 2, randomised, open-label, blinded endpoint study. *Lancet Neurol*, 14(4), 368-376. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70017-7)
- Hurbain, I., & Sachse, M. (2011). The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biol Cell*, 103(9), 405-420. <https://doi.org/10.1042/BC20110015>
- Iadecola, C., Buckwalter, M. S., & Anrather, J. (2020). Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J Clin Invest*, 130(6), 2777-2788. <https://doi.org/10.1172/JCI135530>
- ImageJ. 2021. ImageJ. (Version Java V.1.8.0_77) erhältlich: <https://imagej.nih.gov>, letzter Zugriff 27.10.2021
- Jolugbo, P., & Ariens, R. A. S. (2021). Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 52(3), 1131-1142. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032810>
- Katsanos, A. H., Safouris, A., Sarraj, A., Magoufis, G., Leker, R. R., Khatri, P., Cordonnier, C., Leys, D., Shoamanesh, A., Ahmed, N., Alexandrov, A. V., & Tsvigoulis, G. (2021). Intravenous Thrombolysis With Tenecteplase in Patients With Large Vessel Occlusions: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*, 52(1), 308-312. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030220>
- Khatri, P., Kleindorfer, D. O., Devlin, T., Sawyer, R. N., Jr., Starr, M., Mejilla, J., Broderick, J., Chatterjee, A., Jauch, E. C., Levine, S. R., Romano, J. G., Saver, J.

- L., Vagal, A., Purdon, B., Devenport, J., Pavlov, A., Yeatts, S. D., & Investigators, P. (2018). Effect of Alteplase vs Aspirin on Functional Outcome for Patients With Acute Ischemic Stroke and Minor Nondisabling Neurologic Deficits: The PRISMS Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *320*(2), 156-166. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.8496>
- Kline, J. A., Nordenholz, K. E., Courtney, D. M., Kabrhel, C., Jones, A. E., Rondina, M. T., Diercks, D. B., Klinger, J. R., & Hernandez, J. (2014). Treatment of submassive pulmonary embolism with tenecteplase or placebo: cardiopulmonary outcomes at 3 months: multicenter double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Thromb Haemost*, *12*(4), 459-468. <https://doi.org/10.1111/jth.12521>
- Kvistad, C. E., Naess, H., Helleberg, B. H., Idicula, T., Hagberg, G., Nordby, L. M., Jenssen, K. N., Tobro, H., Rorholt, D. M., Kaur, K., Eltoft, A., Evensen, K., Haasz, J., Singaravel, G., Fromm, A., & Thomassen, L. (2022). Tenecteplase versus alteplase for the management of acute ischaemic stroke in Norway (NOR-TEST 2, part A): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint, non-inferiority trial. *Lancet Neurol*, *21*(6), 511-519. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00124-7)
- Lancellotti, S., Sacco, M., Basso, M., & De Cristofaro, R. (2019). Mechanochemistry of von Willebrand factor. *Biomol Concepts*, *10*(1), 194-208. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0022>
- Larena-Avellaneda, A. (2018). Wirklich Virchows Trias? *Gefässchirurgie*, *23*(2), 64-65. <https://doi.org/10.1007/s00772-018-0367-y>
- Liebeskind, D. S. (2003). Collateral circulation. *Stroke*, *34*(9), 2279-2284. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000086465.41263.06>
- Logallo, N., Kvistad, C. E., Nacu, A., Naess, H., Waje-Andreassen, U., Asmuss, J., Aamodt, A. H., Lund, C., Kurz, M. W., Ronning, O. M., Salvesen, R., Idicula, T. T., & Thomassen, L. (2014). The Norwegian tenecteplase stroke trial (NOR-TEST): randomised controlled trial of tenecteplase vs. alteplase in acute

ischaemic stroke. *BMC Neurol*, 14, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-14-106>

Logallo, N., Novotny, V., Assmus, J., Kvistad, C. E., Alteheld, L., Ronning, O. M., Thommessen, B., Amthor, K. F., Ihle-Hansen, H., Kurz, M., Tobro, H., Kaur, K., Stankiewicz, M., Carlsson, M., Morsund, A., Idicula, T., Aamodt, A. H., Lund, C., Naess, H., . . . Thomassen, L. (2017). Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *Lancet Neurol*, 16(10), 781-788. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30253-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30253-3)

Lu, Y., Wang, J., Huang, R., Chen, G., Zhong, L., Shen, S., Zhang, C., Li, X., Cao, S., Liao, W., Liao, Y., & Bin, J. (2016). Microbubble-Mediated Sonothrombolysis Improves Outcome After Thrombotic Microembolism-Induced Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 47(5), 1344-1353. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012056>

Ma, H., Campbell, B. C. V., Parsons, M. W., Churilov, L., Levi, C. R., Hsu, C., Kleinig, T. J., Wijeratne, T., Curtze, S., Dewey, H. M., Miteff, F., Tsai, C. H., Lee, J. T., Phan, T. G., Mahant, N., Sun, M. C., Krause, M., Sturm, J., Grimley, R., . . . Investigators, E. (2019). Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med*, 380(19), 1795-1803. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813046>

Mann, K. G., Butenas, S., & Brummel, K. (2003). The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(1), 17-25. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000046238.23903.fc>

Marder, V. J., Chute, D. J., Starkman, S., Abolian, A. M., Kidwell, C., Liebeskind, D., Ovbiagele, B., Vinuela, F., Duckwiler, G., Jahan, R., Vespa, P. M., Selco, S., Rajajee, V., Kim, D., Sanossian, N., & Saver, J. L. (2006). Analysis of thrombi retrieved from cerebral arteries of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 37(8), 2086-2093. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000230307.03438.94>

- Masomi-Bornwasser, J., Winter, P., Muller-Werkmeister, H., Strand, S., Konig, J., Kempfski, O., Ringel, F., Kantelhardt, S. R., Giese, A., & Keric, N. (2017). Combination of ultrasound and rtPA enhances fibrinolysis in an In Vitro clot system. *PLoS One*, *12*(11), e0188131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188131>
- Meairs, S., Alonso, A., & Hennerici, M. G. (2012). Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke*, *43*(6), 1706-1710. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.636332>
- Medcalf, R. L. (2017). Fibrinolysis: from blood to the brain. *J Thromb Haemost*, *15*(11), 2089-2098. <https://doi.org/10.1111/jth.13849>
- Meinel, T. R., Kaesmacher, J., Chaloulos-Iakovidis, P., Panos, L., Mordasini, P., Mosimann, P. J., Michel, P., Hajdu, S., Ribo, M., Requena, M., Maegerlein, C., Friedrich, B., Costalat, V., Benali, A., Pierot, L., Gawlitza, M., Schaafsma, J., Pereira, V. M., Gralla, J., & Fischer, U. (2019). Mechanical thrombectomy for basilar artery occlusion: efficacy, outcomes, and futile recanalization in comparison with the anterior circulation. *J Neurointerv Surg*, *11*(12), 1174-1180. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2018-014516>
- Memon, M. Z., Kushnirsky, M., Brunet, M. C., Saini, V., Koch, S., & Yavagal, D. R. (2021). Mechanical thrombectomy in isolated large vessel posterior cerebral artery occlusions. *Neuroradiology*, *63*(1), 111-116. <https://doi.org/10.1007/s00234-020-02505-w>
- Meschia, J. F., Bushnell, C., Boden-Albala, B., Braun, L. T., Bravata, D. M., Chaturvedi, S., Creager, M. A., Eckel, R. H., Elkind, M. S., Fornage, M., Goldstein, L. B., Greenberg, S. M., Horvath, S. E., Iadecola, C., Jauch, E. C., Moore, W. S., Wilson, J. A., American Heart Association Stroke, C., Council on, C., . . . Council on, H. (2014). Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, *45*(12), 3754-3832. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000046>

- Miller, M. W., Miller, D. L., & Brayman, A. A. (1996). A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol*, 22(9), 1131-1154. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(96\)00089-0](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(96)00089-0)
- Miszta, A., Huskens, D., Donkervoort, D., Roberts, M. J. M., Wolberg, A. S., & de Laat, B. (2021). Assessing Plasmin Generation in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052758>
- Molina, C. A., Barreto, A. D., Tsivgoulis, G., Sierzenski, P., Malkoff, M. D., Rubiera, M., Gonzales, N., Mikulik, R., Pate, G., Ostrem, J., Singleton, W., Manvelian, G., Unger, E. C., Grotta, J. C., Schellinger, P. D., & Alexandrov, A. V. (2009). Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial. *Ann Neurol*, 66(1), 28-38. <https://doi.org/10.1002/ana.21723>
- Momjian-Mayor, I., & Baron, J. C. (2005). The pathophysiology of watershed infarction in internal carotid artery disease: review of cerebral perfusion studies. *Stroke*, 36(3), 567-577. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000155727.82242.e1>
- Morawetz, R. B., DeGirolami, U., Ojemann, R. G., Marcoux, F. W., & Crowell, R. M. (1978). Cerebral blood flow determined by hydrogen clearance during middle cerebral artery occlusion in unanesthetized monkeys. *Stroke*, 9(2), 143-149. <https://doi.org/10.1161/01.str.9.2.143>
- Muir, K. W., Weir, C. J., Murray, G. D., Povey, C., & Lees, K. R. (1996). Comparison of neurological scales and scoring systems for acute stroke prognosis. *Stroke*, 27(10), 1817-1820. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.10.1817>
- Nadler, S. B., Hidalgo, J. H., & Bloch, T. (1962). Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery*, 51(2), 224-232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21936146>
- Nasr, D. M., Brinjikji, W., Cloft, H. J., & Rabinstein, A. A. (2013). Utilization of intravenous thrombolysis is increasing in the United States. *Int J Stroke*, 8(8), 681-688. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00844.x>

- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 333(24), 1581-1587. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Nogueira, R. G., Jadhav, A. P., Haussen, D. C., Bonafe, A., Budzik, R. F., Bhuva, P., Yavagal, D. R., Ribo, M., Cognard, C., Hanel, R. A., Sila, C. A., Hassan, A. E., Millan, M., Levy, E. I., Mitchell, P., Chen, M., English, J. D., Shah, Q. A., Silver, F. L., . . . Investigators, D. T. (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*, 378(1), 11-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706442>
- Papadopoulos, N., & Damianou, C. (2016). In Vitro Evaluation of Focused Ultrasound-Enhanced TNK-Tissue Plasminogen Activator-Mediated Thrombolysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 25(8), 1864-1877. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.051>
- Parsons, M., Spratt, N., Bivard, A., Campbell, B., Chung, K., Miteff, F., O'Brien, B., Bladin, C., McElduff, P., Allen, C., Bateman, G., Donnan, G., Davis, S., & Levi, C. (2012). A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 366(12), 1099-1107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109842>
- Petit, B., Bohren, Y., Gaud, E., Bussat, P., Arditi, M., Yan, F., Tranquart, F., & Allemann, E. (2015). Sonothrombolysis: the contribution of stable and inertial cavitation to clot lysis. *Ultrasound Med Biol*, 41(5), 1402-1410. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.12.007>
- Pfaffenberger, S., Devcic-Kuhar, B., Kollmann, C., Kastl, S. P., Kaun, C., Speidl, W. S., Weiss, T. W., Demyanets, S., Ullrich, R., Sochor, H., Wober, C., Zeitlhofer, J., Huber, K., Groschl, M., Benes, E., Maurer, G., Wojta, J., & Gottsauner-Wolf, M. (2005). Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke*, 36(1), 124-128. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000150503.10480.a7>

Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (2019). 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*, *50*(12), e344-e418. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>

Rabkin, S. W., Mathewson, F. A., & Tate, R. B. (1978). Long term changes in blood pressure and risk of cerebrovascular disease. *Stroke*, *9*(4), 319-327. <https://doi.org/10.1161/01.str.9.4.319>

Ringleb P., Köhrmann M., Jansen O., et al.: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 23.03.2020, 01.11.2021)

Roessler, F. C., Ohlrich, M., Marxsen, J. H., Stellmacher, F., Sprenger, A., Dempfle, C. E., & Seidel, G. (2011). The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows. *Blood Coagul Fibrinolysis*, *22*(5), 407-415. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3283468a60>

Roessler, F. C., Schumacher, S., Sprenger, A., Gartner, U., Al-Khaled, M., & Eggers, J. (2016). Clot Formation in the Presence of Acetylsalicylic Acid Leads to Increased Lysis Rates Regardless of the Chosen Thrombolysis Strategy. *J Vasc Res*, *53*(3-4), 128-137. <https://doi.org/10.1159/000449386>

Roessler, F. C., Teichert, A., Ohlrich, M., Marxsen, J. H., Stellmacher, F., Tanislav, C., & Seidel, G. (2014). Development of a new clot formation protocol for

- standardized in vitro investigations of sonothrombolysis. *J Neurosci Methods*, 237, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.025>
- Roessler, F. C., Wang, Z., Schumacher, S., Ohlrich, M., Kaps, M., Menciassi, A., & Eggers, J. (2015). In Vitro Examination of the Thrombolytic Efficacy of Desmoteplase and Therapeutic Ultrasound Compared with rt-PA. *Ultrasound Med Biol*, 41(12), 3233-3240. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2015.07.007>
- Ropper A.H., S. M. A., & Klein J.P., & Prasad S(Eds.). (2019). *Adams and Victor's Principles of Neurology* (Vol. 11).
- Ryan, E. A., Mockros, L. F., Weisel, J. W., & Lorand, L. (1999). Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J*, 77(5), 2813-2826. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77113-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77113-4)
- Sakharov, D. V., Hekkenberg, R. T., & Rijken, D. C. (2000). Acceleration of fibrinolysis by high-frequency ultrasound: the contribution of acoustic streaming and temperature rise. *Thromb Res*, 100(4), 333-340. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(00\)00319-4](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(00)00319-4)
- Saqqur, M., Tsivgoulis, G., Nicoli, F., Skoloudik, D., Sharma, V. K., Larrue, V., Eggers, J., Perren, F., Charalampidis, P., Storie, D., Shuaib, A., & Alexandrov, A. V. (2014). The role of sonolysis and sonothrombolysis in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and case-control studies. *J Neuroimaging*, 24(3), 209-220. <https://doi.org/10.1111/jon.12026>
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*, 82(7-8), 518-529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Shah, R. S., & Cole, J. W. (2010). Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 8(7), 917-932. <https://doi.org/10.1586/erc.10.56>
- Smith, W. S., Sung, G., Starkman, S., Saver, J. L., Kidwell, C. S., Gobin, Y. P., Lutsep, H. L., Nesbit, G. M., Grobelny, T., Rymer, M. M., Silverman, I. E., Higashida, R. T., Budzik, R. F., Marks, M. P., & Investigators, M. T. (2005). Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke*, 36(7), 1432-1438. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000171066.25248.1d>
- Stanford, S. N., Sabra, A., D'Silva, L., Lawrence, M., Morris, R. H., Storton, S., Brown, M. R., Evans, V., Hawkins, K., Williams, P. R., Davidson, S. J., Wani, M., Potter, J. F., & Evans, P. A. (2015). The changes in clot microstructure in patients with ischaemic stroke and the effects of therapeutic intervention: a prospective observational study. *BMC Neurol*, 15, 35. <https://doi.org/10.1186/s12883-015-0289-1>
- Suelter, C. H. (1993). *Methods of Biochemical Analysis, Volume 37: Bioanalytical Instrumentation*. Wiley. <https://books.google.de/books?id=H5mHxQEACAAJ>
- Tanswell, P., Modi, N., Combs, D., & Danays, T. (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction. *Clin Pharmacokinet*, 41(15), 1229-1245. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241150-00001>
- Tanswell, P., Tebbe, U., Neuhaus, K. L., Glasle-Schwarz, L., Wojcik, J., & Seifried, E. (1992). Pharmacokinetics and fibrin specificity of alteplase during accelerated infusions in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 19(5), 1071-1075. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90297-z](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90297-z)
- Tayal, A. H., Tian, M., Kelly, K. M., Jones, S. C., Wright, D. G., Singh, D., Jarouse, J., Brillman, J., Murali, S., & Gupta, R. (2008). Atrial fibrillation detected by mobile cardiac outpatient telemetry in cryptogenic TIA or stroke. *Neurology*, 71(21), 1696-1701. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000325059.86313.31>

- Thomas, G. R., Thibodeaux, H., Errett, C. J., Badillo, J. M., Keyt, B. A., Refino, C. J., Zivin, J. A., & Bennett, W. F. (1994). A long-half-life and fibrin-specific form of tissue plasminogen activator in rabbit models of embolic stroke and peripheral bleeding. *Stroke*, 25(10), 2072-2078; discussion 2078-2079. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.10.2072>
- Tomaiuolo, M., Brass, L. F., & Stalker, T. J. (2017). Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.iccl.2016.08.001>
- Tsivgoulis, G., Katsanos, A. H., Eggers, J., Larrue, V., Thomassen, L., Grotta, J. C., Seitidis, G., Schellinger, P. D., Mavridis, D., Demchuk, A., Novotny, V., Molina, C. A., Veroniki, A. A., Kohrmann, M., Soenne, L., Khanevski, A. N., Barreto, A. D., Saqqur, M., Psaltopoulou, T., . . . Alexandrov, A. V. (2021). Sonothrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *Stroke*, 52(12), 3786-3795. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030960>
- Tsoucalas, G., Papaioannou, T. G., & Karamanou, M. (2019). The Hippocratic Doctrine of "the Acute Brain Suffering" as the Brain Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 28(2), 412-417. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.10.017>
- Undas, A., Podolec, P., Zawilska, K., Pieculewicz, M., Jedlinski, I., Stepien, E., Konarska-Kuszevska, E., Weglarz, P., Duszyńska, M., Hanschke, E., Przewlocki, T., & Tracz, W. (2009). Altered fibrin clot structure/function in patients with cryptogenic ischemic stroke. *Stroke*, 40(4), 1499-1501. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.532812>
- U.S. National Library of Medicine. Tenecteplase in Stroke Patients Between 4 and 24 Hours (TIMELESS). Zugriff: 13.06.2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03785678>.

- U.S. National Library of Medicine. A Randomized Controlled Trial of TNKtPA Versus Standard of Care for Minor Ischemic Stroke With Proven Occlusion (TEMPO-2). Zurich: 04.04.2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02398656>.
- Vaughan, D. E. (2005). PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1879-1883. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01420.x>
- Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., . . . Stroke Statistics, S. (2021). Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 143(8), e254-e743. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950>
- von Kummer, R., Mori, E., Truelsen, T., Jensen, J. S., Gronning, B. A., Fiebich, J. B., Lovblad, K. O., Pedraza, S., Romero, J. M., Chabriat, H., Chang, K. C., Davalos, A., Ford, G. A., Grotta, J., Kaste, M., Schwamm, L. H., Shuaib, A., Albers, G. W., & Investigators, D.-. (2016). Desmoteplase 3 to 9 Hours After Major Artery Occlusion Stroke: The DIAS-4 Trial (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke). *Stroke*, 47(12), 2880-2887. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013715>
- Weimar, C., Konig, I. R., Kraywinkel, K., Ziegler, A., Diener, H. C., & German Stroke Study, C. (2004). Age and National Institutes of Health Stroke Scale Score within 6 hours after onset are accurate predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke*, 35(1), 158-162. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000106761.94985.8B>
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2017). Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem*, 82, 405-456. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13
- Wohner, N., Sotonyi, P., Machovich, R., Szabo, L., Tenekedjiev, K., Silva, M. M., Longstaff, C., & Kolev, K. (2011). Lytic resistance of fibrin containing red blood

cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(10), 2306-2313.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.229088>

Wolberg, A. S., Aleman, M. M., Leiderman, K., & Machlus, K. R. (2012). Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg*, 114(2), 275-285. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31823a088c>

Wolf, P. A., Abbott, R. D., & Kannel, W. B. (1991). Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*, 22(8), 983-988.
<https://doi.org/10.1161/01.str.22.8.983>

Zhang, Z., Xi, L., Zhang, S., Zhang, Y., Fan, G., Tao, X., Gao, Q., Xie, W., Yang, P., Zhai, Z., & Wang, C. (2022). Tenecteplase in Pulmonary Embolism Patients: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Front Med (Lausanne)*, 9, 860565.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2022.860565>

Zhong, C. S., Beharry, J., Salazar, D., Smith, K., Withington, S., Campbell, B. C. V., Wilson, D., Le Heron, C., Mason, D., Duncan, R., Reimers, J., Mein-Smith, F., Diprose, W. K., Barber, P. A., Ranta, A., Fink, J. N., & Wu, T. Y. (2021). Routine Use of Tenecteplase for Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 52(3), 1087-1090. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030859>

Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse der für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden vorab publiziert in „BMC Neurology“ unter dem Titel: in vitro examination of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA:

Frühwald, T., Gärtner, U., Stöckmann, N., Marxsen, J. H., Gramsch, C., & Roessler, F.C. (2019). In vitro examination of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA. *BMC Neurol*, 19(1), 181.

<https://doi.org/10.1186/s12883-019-1404-5>

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen 06.07.2023

Tobias Frühwald

Für alle die gelesen, beraten und auch manchmal genervt haben.

Danke!

Niemand weiß, wie weit seine Kräfte gehen, bis er sie versucht hat.

Johann Wolfgang von Goethe, 1774