

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Medizin

Klinik für Neurologie

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

**- „Clot is brain“ -
Die Bedeutung der Thrombusstruktur
für die Rekanalisation
zerebraler Gefäßverschlüsse**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie
im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. Dr. rer. medic. Dipl. Phys. Florian C. Roessler

Gießen 2021

“Success is not final. Failure is not fatal.
It is the courage to continue that counts.”

Winston Churchill

Gewidmet meinen Kindern Levin, Luca und Ella

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Ischämische Schlaganfälle	4
1.2	Historie der Behandlung ischämischer Schlaganfälle	5
1.3	Standard der Akuttherapie im Jahr 2015	18
1.4	Hypothesen und Fragestellungen	20
A	Präklinische Untersuchungen	23
2	<i>Entwicklung von in vitro Modellen zur Untersuchung der Thrombolyse</i>	23
2.1	In vitro Thrombolyse-Modelle.....	23
2.2	Das statische Modell	26
2.3	Das dynamische Flussmodell.....	27
2.3.1	Beschreibung des Modellaufbaus	28
2.3.2	Generierung pulsatiler Flussgeschwindigkeiten	30
2.3.3	Datenerhebung zur Bestimmung der Lyserate	31
2.3.4	Der Thrombuskorb	31
2.3.5	Auswertung der erfassten Druckdifferenz und Bestimmung der Lyserate	34
2.4	Das standardisierte Gerinnungsprotokoll	37
2.4.1	Physiologische Überlegungen	37
2.4.2	Thrombusherstellung	38
2.4.3	Histologische Beurteilung.....	40
2.4.4	Untersuchung der Thrombusstabilität.....	41
2.4.5	Bestimmung der Thrombolyserate	42
2.4.6	Auswahl des geeigneten Gerinnungsprotokolls.....	44
2.5	Diskussion.....	44
3	<i>Untersuchung verschiedener Thrombolyseszenarien</i>	48
3.1	Der Einsatz des Ultraschalls.....	48
3.2	Die Durchführung der Dosisfindungsexperimente	50
3.3	Die Bestimmung der Fibrinfaserdichte	50
3.4	Die thrombolytische Wirksamkeit von Desmoteplase.....	51
3.4.1	Hintergrund und Fragestellung	51
3.4.2	Methoden und Ergebnisse	52
3.4.3	Diskussion.....	54
3.5	Die thrombolytische Wirksamkeit von Tenecteplase	58
3.5.1	Hintergrund und Fragestellung	58

3.5.2	Methoden und Ergebnisse	59
3.5.3	Diskussion.....	63
3.6	Der Einfluss einer Vormedikation mit Acetylsalicylsäure auf die Thrombolyse	65
3.6.1	Hintergrund und Fragestellung	65
3.6.2	Methoden und Ergebnisse	66
3.6.3	Diskussion.....	71
B	Klinische Untersuchungen.....	79
4	<i>Die THROMBEX-Studie</i>	79
4.1	Hintergrund	79
4.2	Methoden.....	83
4.3	Ergebnisse	91
4.4	Diskussion.....	100
5	Abschließende Zusammenfassung und Ausblick	111
6	Abkürzungsverzeichnis.....	117
7	Tabellenverzeichnis.....	119
8	Abbildungsverzeichnis.....	121
9	Danksagung	123
10	Lebenslauf	125
11	Literaturverzeichnis.....	127
12	Anlagenverzeichnis.....	155

1 Einleitung

1993 formulierte der Neurologe Camilo R. Gomez einen Satz, der in den folgenden Jahrzehnten zum fundamentalen Leitmotiv der Therapie ischämischer Schlaganfälle wurde: „*Time is brain*“ [1]. Dieser Slogan zielt auf die rasche Wiedereröffnung schlaganfallverursachender Gefäßverschlüsse ab, um möglichst viele Neurone vor dem drohenden Zelltod zu bewahren.

Fortschritte in der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls konnten seitdem durch die Entwicklung neuer Medikamente, den Einsatz neuartiger Behandlungstechniken, durch moderne bildgebende Selektionsverfahren sowie eine stetige Prozessoptimierung des Rettungswesens erzielt werden. Dabei stand das „*Time is brain*“-Konzept immer im Zentrum der Überlegungen.

Auch die vorliegende Arbeit soll zur Verbesserung der Behandlung ischämischer Schlaganfälle beitragen. Im Fokus steht dabei jedoch nicht die Zeit, sondern das Blutgerinnsel (engl. *clot*), das zum Verschluss eines Hirngefäßes führt.

Dieser Perspektivwechsel resultiert aus der Überlegung, dass das gefäßverschießende Blutgerinnsel nicht nur die Ursache des Schlaganfalls, sondern auch das Angriffsziel aller Behandlungsversuche und somit Dreh- und Angelpunkt des Therapieerfolges ist. Der Erfolg der angewendeten Rekanalisationsverfahren hängt maßgeblich von der Beschaffenheit des Gerinnsels ab und die spätere Sekundärprophylaxe sollte auf den Entstehungsprozess des Gerinnsels abgestimmt sein, um weitere Schlaganfälle zu verhindern. In Analogie zu dem seit über 25 Jahren bestehenden „*Time is brain*“-Paradigma widmet sich daher die vorliegende Arbeit dem Leitsatz „*Clot is brain*“ und stellt erste präklinische und klinische Untersuchungen zu diesem Thema vor.

Die folgende Einleitung soll zunächst die Bedeutung ischämischer Schlaganfälle beleuchten und dem Leser einen Überblick über die Entstehung der modernen Schlaganfalltherapie verschaffen. Die wichtigsten Medikamente der akuten Schlaganfalltherapie und deren Studiendaten werden beschrieben, genauso wie das Verfahren der Thrombektomie und das der Sonothrombolyse.

Auch werden die therapeutischen Grundsätze der akuten Schlaganfallbehandlung für den Zeitraum zusammengefasst, in dem die hier vorgestellten Untersuchungen geplant und durchgeführt wurden. Aus ihnen leitet sich schließlich die Motivation dieser Arbeit ab.

1.1 Ischämische Schlaganfälle

Die jährliche Inzidenz von Schlaganfällen liegt allein in Deutschland bei 270.000. Für rund 200.000 Menschen handelt es sich dabei um ein Erstereignis [2]. Innerhalb des ersten Jahres verstirbt etwa ein Viertel bis ein Drittel aller Schlaganfallpatienten.

Damit stellt der Schlaganfall in Deutschland sowie weltweit die dritthäufigste Todesursache nach koronaren und kanzerogenen Erkrankungen dar [2, 3]. In Deutschland ist er für rund 8% aller Todesfälle verantwortlich [2].

In den Industriestaaten ist der Schlaganfall darüber hinaus der häufigste Grund einer erworbenen Behinderung im Erwachsenenalter [4–6]. Etwa zwei Drittel der überlebenden Patienten sind nach dem Schlaganfall auf fremde Hilfe angewiesen. Laut Erhebungen des Robert-Koch-Instituts lebten 2006 rund 1.3 Millionen Menschen in Deutschland mit den Folgen eines Schlaganfalls [7, auf S. 84]. Aufgrund des demographischen Wandels ist von einem stetigen Anstieg dieser Zahl auszugehen [8]. Aus gesundheitsökonomischer Sicht entstehen durch die Pflege- und Rehabilitationsbedürftigkeit vieler Patienten enorme Kosten [9]. In Deutschland belaufen sich die lebenslangen Behandlungskosten eines Schlaganfallpatienten im Durchschnitt auf 43.000 € [10].

Man unterscheidet ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle: Bei einem ischämischen Schlaganfall liegt eine akute Mangeldurchblutung des Hirngewebes durch Verschlüsse blutzuführender Gefäße vor. Verschlössen werden die Gefäße durch Blutgerinnsel. Entsteht das Blutgerinnsel direkt am Ort des Gefäßverschlusses, spricht man von einem Thrombus. Gelangt es erst durch den Blutstrom dorthin, handelt es sich definitionsgemäß um einen thrombotischen Embolus. In allen Fällen kommt es in dem betroffenen Hirnareal zu einem Sauerstoff- und Glukosemangel. Unterschreitet die Durchblutung den Wert von 12 ml/100g/min tritt innerhalb weniger Minuten der irreversible Zelltod ein. Rund 85% aller Schlaganfälle sind ischämisch bedingt [8, 11]. Die verbleibenden 15%, also die hämorrhagischen Hirninfarkte [12], entstehen durch eine Einblutung in das Hirngewebe.

Ischämische Schlaganfälle, die durch akute Verschlüsse proximal gelegener Arterien ausgelöst werden, sind besonders gefährlich, da sie zu einer Minderperfusion in einem ausgedehnten Hirnareal führen und somit in der Regel für schwerwiegende klinische Verläufe verantwortlich sind. Mit Abstand am häufigsten lassen sich solche proximalen Hirngefäßverschlüsse auf kardiale oder arterioarterielle thrombotische Emboli zurückführen. Ntaios et al. fanden bei

der Datenauswertung von 2109 Schlaganfallpatienten, die an einem proximalen Gefäßverschluss litten, in 41.2% aller Fälle eine kardioembolische Genese und in 23.6% der Fälle eine arterioarteriell embolische Ursache des Schlaganfalls [13].

Aus klinischer wie auch gesundheitsökonomischer Sicht handelt es sich bei dem ischämischen Schlaganfall also um ein äußerst wichtiges Krankheitsbild, dessen Bedeutung in Zukunft aufgrund seiner steigenden Inzidenz noch zunehmen wird.

1.2 Historie der Behandlung ischämischer Schlaganfälle

Ischämische Schlaganfälle gehen auf eine Verengung oder Verstopfung einer oder mehrerer hirnversorgender Arterie/n zurück. Dadurch kommt es zu einer plötzlichen Minderversorgung von Nervenzellen mit Sauerstoff, Glukose und anderen Substraten. Diese kann vom Organismus nur kurzzeitig kompensiert und toleriert werden. Ohne rasche therapeutische Intervention sterben die betroffenen Neuronen nach 4 bis 5 Minuten ab. Es kommt zu funktionellen Ausfallerscheinungen. Man unterscheidet den Infarktkern, der das Areal mit irreversibel geschädigten Neuronen umfasst, von der Penumbra, d.h. dem Gebiet der reversibel geschädigten Neurone, die zwar funktionell beeinträchtigt sind, aber noch einen erhaltenen Stoffwechsel aufweisen. Das Ausmaß der zunehmenden Zellschädigung im Bereich der Penumbra hängt von der Ausprägung und von der Dauer der bestehenden Hypoperfusion ab. Bei der akuten Schlaganfalltherapie ist deshalb die frühzeitige Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes von größter Bedeutung, da so Hirngewebe gerettet und eine zunehmende Behinderung des Patienten abgewendet werden kann [14, 15].

Diese Zusammenhänge waren lange Zeit nicht bekannt. Bis hinein in das 17. Jahrhundert galt die bereits 2000 Jahre alte Lehre der Körpersäfte. Die von Hippokrates von Kos (ca. 460 bis 370 v. Chr.) begründete Humoralpathologie wurde von Galenus von Pergamon (ca. 128 – 199 n. Chr.) weiterentwickelt [16]. Als prädisponierende Faktoren des Schlaganfalls vermutete er Faulheit, übermäßige Erregung, Blutandrang, Trunksucht und Völlerei sowie höheres Lebensalter und kaltes Klima. Durch sie käme es zu einer Fehlmischung der vier Kardinalsäfte (Blut, Schleim, gelbe und schwarze Galle) und der vier Elementarqualitäten (warm, kalt, feucht und trocken). Als „kalte Erkrankung“ würde der Schlaganfall durch eine Ansammlung von kaltem, feuchtem Schleim oder kalter, trockener Galle in den Hohlräumen des Gehirns zustande kommen. Dadurch würde die Passage des Spiritus animalis, des „Seelengeistes“, zu

Nerven und Rückenmark behindert. Die Folgen seien unweigerlich Bewusstlosigkeit, Taubheit und Bewegungslosigkeit [17].

Ein Paradigmenwechsel trat erst mit einer 1619 vom Wittenberger Arzt Gregor Nymann veröffentlichten Monografie ein, in der die These vertreten wurde, dass der Schlaganfall direkt mit einem Gefäßverschluss einhergehe. Immer noch verhaftet in der hippokratischen und galenischen Tradition, sah Nymann dadurch allerdings nicht den Blutfluss, sondern vielmehr den Strom des Spiritus animalis behindert [17].

Im Jahre 1628 beschrieb der englische Arzt und Physiologe William Harvey den großen Blutkreislauf und begründete so die Kreislaufphysiologie, die 1664 von seinem Landsmann Thomas Willis auf das Hirn übertragen wurde.

Auf dieser Grundlage differenzierte der Stadtarzt von Schaffhausen Johann Jakob Wepfer in seinem in der zweiten Hälfte des 17. Jahrhunderts erschienenen Buch erstmals den ischämischen vom hämorrhagischen Schlaganfall [18, 19]. Aber auch er konnte sich noch nicht vollständig von der alten humoralen Lehre der großen Lehrmeister Hippokrates und Galenus trennen. So führte laut Wepfer die Verstopfung einer Arterie nicht nur zu einer Unterbindung des Zuflusses von Blut, sondern auch von Lebensgeistern ins Hirn, wo sie nicht mehr in den Seelengeist umgewandelt werden können. Beim hämorrhagischen Schlaganfall behinderte das ins Parenchym austretende Blut laut Wepfer den Übertritt des Spiritus animalis in die Nerven und das Rückenmark [17].

In Bezug auf den ischämischen Schlaganfall wurden die entscheidenden Thesen zur Pathophysiologie schließlich durch den britischen Neurologen William Richard Gowers (1845 - 1915) sowie die beiden deutschen Ärzte Hans Chiari (1851 - 1916) und Rudolf Virchow (1821 - 1902) formuliert. Gowers beschrieb 1885 zwei Wege, auf denen sich ein Gefäßverschluss entwickeln könne, die Embolie und die lokale Thrombose. Chiari stellte sklerotische Prozesse und Verschlüsse extrakranieller Hirngefäße bei seinen Betrachtungen zur Pathogenese des Schlaganfalls in den Vordergrund. Virchow formulierte schließlich 1856 in seiner Schrift *Thrombose und Embolie* die nach ihm benannte Trias der Thrombogenese aus zellulären, plasmatischen und rheologischen Anteilen, bzw. aus Stase, Gefäßalteration und Hyperkoagulabilität [20]. Hier beschreibt Virchow auch das Phänomen der thrombotischen Emboli, die zu funktionellen Störungen, wie z.B. die Apoplexie führen könne.

Als weiterer Meilenstein für die moderne Betrachtungsweise ischämischer Schlaganfälle ist die Entdeckung der X-Strahlung am 08. November 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen zu

nennen, der eine rasante Weiterentwicklung bildgebender Verfahren folgte. Bereits zwei Monate später veröffentlichten der österreichische Physiker Eduard Haschek und der Wiener Arzt Otto Theodor Lindenthal in der *Wiener klinischen Wochenschrift* das erste Arteriogramm [21]. Die erste Karotisangiographie wurde 1927 durch den Portugiesen Egas Moniz durchgeführt [22]. Nach der Entwicklung des Computertomographen (CT) durch den englischen Ingenieur Godfrey Newbold Hounsfield 1971 konnte bereits ein Jahr später die erste kranielle Computertomographie durchgeführt werden [19]. Die Theorie zur Magnetresonanztomographie (MRT) wurde 1973 durch Paul Christian Lauterbur veröffentlicht [23].

Die entscheidenden Entwicklungen zur Behandlung des akuten Schlaganfalls liegen noch kürzer zurück. Bis hinein ins 19. Jahrhundert stellten Aderlässe (Abb. 1), begründet durch die Humoralpathologie von Hippokrates und Galenus, die wichtigste, wenn auch nicht unumstrittene, Standardtherapie dar [24]. In seinem

Buch *Meilensteine aus der Geschichte des Schlaganfalls* [17] fasst Gruber-Gerardy die am 25. Juli 1694 erfolgte Therapie des an einem Schlaganfall leidenden Marcello Malpighi durch den bereits erwähnten Schaffhausener Stadtarzt Johann Jakob Wepfer wie folgt zusammen: *„Der Schlaganfall ... führte zu einer kompletten Lähmung der rechten Seite und zur Verzerrung im Bereich des Mundes und der Augen. Wie üblich war der Aderlass die erste und wichtigste Behandlungsmethode; freilich konnten sich die anwesenden Ärzte nicht recht einigen, auf welcher Seite Malpighi zur Ader gelassen werden sollte: Wepfer plädierte für die rechte Seite, beugte sich aber der Mehrheitsmeinung, so dass das Blut schließlich aus dem linken Arm entnommen wurde.*

Dank dieses Eingriffs (so Jakob Wepfer) und dank verschiedener Einreibungen und sonstiger Remeduren erholte sich Malpighi nach 40 Tagen leidlich von seinem Schlaganfall. Am 29. November 1694 allerdings erlitt er nach einer schweren Schwindelattacke einen weiteren Schlaganfall, an dem er kurze Zeit später verstarb.“



Abbildung 1: Der Aderlass

Miniatur aus dem Luttrell-Psalter, England 14. Jahrhundert.

Nachdem über längere Zeit auch Blutegel zur Anwendung kamen, wurde schließlich 1915 durch McLean das Heparin entdeckt, dass 1941 in einem Selbstversuch durch Per Hedenius erstmals zur intravenösen Anwendung beim Menschen kam [25]. Einige Jahre später dokumentierte Hedenius positive Effekte bei der Anwendung des Heparins an Patienten mit arteriellen Embolien sowie arteriellen und venösen Thrombosen [17]. In der Folge wurden hierzu in den 1950er Jahren viele Studien mit jedoch sehr geringer Fallzahl durchgeführt. Letztendlich konnten sich aber das Heparin und andere Antikoagulantien bei der Behandlung akuter Schlaganfälle nicht behaupten, was u.a. am vermehrten Auftreten intrakranieller Blutungen lag [26].

Die Entdeckung thrombolytischer Substanzen in den 1930er Jahren markiert schließlich den Beginn der modernen Thrombolysebehandlung: 1947 wurde die thrombolytische Wirksamkeit des menschlichen Urins durch MacFarlane und Philling beschrieben, was zur Extraktion und Anwendung der Urokinase führte [27]. 1955 folgte die Publikation über die klinische Wirksamkeit der Streptokinase bei der Behandlung extrakranieller thrombotischer Gefäßverschlüsse [28]. In frühen klinischen Studien fanden sich beim Einsatz dieser beiden Medikamente jedoch vermehrt intrakranielle Blutungen mit zum Teil tödlichen Verläufen bei gleichzeitig fehlendem Nachweis eines positiven therapeutischen Effekts [29–31]. Auch wenn die Aussagekraft dieser negativen Studienergebnisse verglichen mit heutigen Untersuchungen durch die damals noch unausgereifte Bildgebung und fehlende Expertise bei der Auswahl geeigneter Patienten deutlich limitiert ist, konnten sich die beiden Substanzen daraufhin nicht mehr in der Akuttherapie des Schlaganfalls in den Industrieländern etablieren. Im Falle der Urokinase liegen allerdings mittlerweile einige neuere Studien vor, die die Wirksamkeit des Medikaments hinsichtlich der Rekanalisation und des klinischen Behandlungsverlaufs demonstrieren [32]. Darüber hinaus ist Urokinase sehr preiswert und leicht verfügbar. In Entwicklungsländern ist daher der Einsatz von Urokinase immer noch weit verbreitet.

Gewebespezifischer Plasminogenaktivator

1979 wurde der auf natürliche Weise in Endothelzellen gebildete gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA) durch Collen et al. entdeckt [33, 34]. Seit 1983 ist die Herstellung des rekombinierten t-PA (rt-PA) möglich [35]. Rt-PA initiiert die Fibrinolyse des schlaganfallauslösenden Thrombus, indem es an Fibrin bindet und Plasminogen in Plasmin umwandelt. Plasmin wiederum spaltet den Thrombus in Fibrinabbauprodukte. Das National

8

Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) führte im Jahr 1992 zwei Pilotstudien durch, in denen rt-PA in Dosierungen zwischen 0.35 und 1.08 mg/kgKG bei Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall binnen drei Stunden nach Symptombeginn angewendet wurde [36, 37]. In der nachfolgenden placebokontrollierten NINDS-2-Studie konnte dann trotz des vermehrten Auftretens symptomatischer intrakranieller Blutungen (6.4% vs. 0.6%, $p < 0.001$) eine Verbesserung des Behinderungsgrades drei Monate nach erfolgter Therapie bei Schlaganfallpatienten festgestellt werden (Odds-Ratio für mRS ≤ 1 : 1.7; 95%-Konfidenzintervall: 1.2 – 2.6), die innerhalb von drei Stunden mit 0.9 mg/kgKG rt-PA intravenös behandelt worden waren [38]. Im Jahr 1996 wurde rt-PA aufgrund dieser positiven Ergebnisse zur Behandlung akuter ischämischer Schlaganfälle zugelassen. Zwischen 1998 und 2008 wurden die Sicherheit und Wirksamkeit des rt-PAs in weiteren Studien (ECASS-I/II/III, ATLANTIS-A/B, EPITHET) getestet [39–44], wobei lediglich die ECASS-III-Studie einen überzeugenden Vorteil der rt-PA-Behandlung nachweisen konnte [44]. 2010 veröffentlichten Lees et al. eine gepoolte Analyse aller bisherigen rt-PA-Studien, in denen sich ein moderater Vorteil der rt-PA-Behandlung im Vergleich zu Placebo in einem Zeitfenster von 3 – 4.5 Stunden nachweisen ließ, wobei die Überlegenheit des rt-PAs mit einem zunehmend früheren Behandlungsbeginn anstieg [43, 45]. Diese Ergebnisse wurden durch Kanadische Registerstudien unterstrichen [46, 47]. Aufgrund dieser Daten ist rt-PA (Alteplase®) das bislang einzige von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Thrombolytikum zur i.v.-Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls in einer Dosierung von 0.9 mg/kgKG (10% als Bolus gefolgt von einer kontinuierlichen Applikation der Restmenge via Perfusor). In Japan gilt seit 2005 die rt-PA-Zulassung in einer Dosierung von 0.6 mg/kgKG [48]. Die Resultate des SITS-ISTR-Registers [49, 50], der ECASS-III-Studie [44] sowie der Metaanalyse von Lees et al. [45] führten 2011 zu einer Erweiterung des Lysezeitfensters auf 4.5 Stunden durch die European Medical Agency. In Japan erfolgte die Vergrößerung des Zeitfensters ein Jahr später.

Die Wirksamkeit des rt-PAs ist jedoch begrenzt. In einer von Rha et al. veröffentlichten Metaanalyse, in der Daten von 53 Studien (Publikationszeitraum: 1985 – 2002) mit insgesamt 2066 Patienten zusammengefasst wurden, beträgt die Rate aller kompletten und inkompletten Rekanalisationen binnen 24 Stunden nach Auftreten der Symptomatik bei Patienten, die einer systemischen Thrombolyse mit rt-PA unterzogen wurden, lediglich 46.2% im Vergleich zu 24.1% bei den Spontanverläufen [14]. Zu den wesentlichen unerwünschten Nebenwirkungen des rt-PAs zählen intrazerebrale Blutung, Blutungen in einem anderen

Bereich des Körpers, das Angioödem mit dem Risiko einer Atemwegsverlegung sowie neurotoxische Effekte [51, 52]. Darüber hinaus beinhaltet die Zulassung des rt-PAs einige Einschränkungen (u.a. hinsichtlich des Alters, der Vorerkrankungen, der Vormedikation und des Zeitfensters der Anwendung), die den Einsatz des Thrombolytikums limitieren. Aufgrund der begrenzten Anwendbarkeit und der vergleichsweise hohen Therapiekosten profitieren weltweit weniger als 2% aller Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall von einer systemischen Therapie mit rt-PA [44, 53].

Auf der Suche nach Thrombolytika mit einem erweiterten Anwendungsbereich, einer möglichst hohen Rekanalisationsrate und kurzen Rekanalisationsdauer bei gleichzeitig akzeptablem Behandlungsrisiko wurden etliche Varianten des rt-PAs entwickelt (Retepase, Montepase, Pamitepase, Lanoteplase, Alfimeplase), für die sich jedoch in der klinischen Praxis keine relevante Wirkung nachweisen ließ [54]. Zwei selektive Aktivatoren von fibrin gebundenem Plasminogen scheinen jedoch als alternative Thrombolytika für die akute Schlaganfalltherapie besonders geeignet zu sein: Die Desmoteplase und die Tenecteplase.

Desmoteplase

Der Plasminogenaktivator Desmoteplase wurde 1991 aus dem Speichel von Vampirfledermäusen extrahiert (Desmodus rotundus salivary plasminogen activator; DSPA; Desmoteplase®) [55]. Im Vergleich zu rt-PA zeichnet sich DSPA durch besondere Eigenschaften aus. Von wesentlicher Bedeutung ist dabei zunächst seine hohe Spezifität für fibrin gebundenes Plasminogen. Das Fibrin fungiert somit nicht nur als Substrat, sondern auch als Kofaktor des DSPA. Im Gegensatz zu rt-PA entfaltet DSPA zudem so gut wie keine Aktivität in Anwesenheit von Fibrinogen. Dadurch wird eine übermäßige Plasminogenaktivierung vermieden, wodurch das systemische Blutungsrisiko sinkt [56]. Darüber hinaus wird die plasminvermittelte Fibrinogenolyse unterdrückt und damit der Verbrauch von α 2-Antiplasmin, wodurch ebenfalls das systemische Blutungsrisiko verringert wird [56]. Auch hat DSPA ein geringes (meist NMDA-vermitteltes) neurotoxisches Potential und interagiert in nur vernachlässigbarer Weise mit β -Amyloid und humanem zellulärem Prionen-Protein [55, 57]. Auch diese Eigenschaft führt vermutlich zu einer Reduktion des Blutungsrisikos [58]. Schließlich verfügt DSPA aufgrund seiner relativen Resistenz gegen den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) über eine lange Halbwertszeit von rund drei Stunden [59], weshalb auch eine Therapie mit einer einzigen Bolusgabe möglich ist [59].

In den Phase II Studien DIAS [60] und DEDAS [61] fanden sich im Vergleich zu einer Placebobehandlung für die DSPA-Dosierungen 90 µg/kg und 125 µg/kg bei akuten Schlaganfallpatienten gesteigerte Reperfusionraten bei einem gleichzeitig nicht signifikant verschlechterten Risikoprofil. Bis zu neun Stunden nach Symptombeginn konnte die klinische Wirksamkeit des DSPA für Patienten mit einer signifikanten Penumbra nachgewiesen werden [61]. Andererseits konnte in der Phase III Studie DIAS-2 [62] keine signifikante klinische Verbesserung der Patienten unter der Behandlung mit DSPA sowohl in der niedrigen als auch in der höheren Dosierung im Vergleich zu Placebo in einem Zeitfenster von 3 – 9 Stunden gefunden werden [62]. Die Aussagekraft der DIAS-2-Studie wird allerdings durch eine geringe Fallzahl limitiert. Außerdem wurde zu Beginn der Behandlung nur bei 30% der untersuchten Patienten ein Gefäßverschluss nachgewiesen. Die Volumina des Infarktareals und der Penumbra waren zudem klein. Dafür lagen die Raten symptomatischer intrakranieller Blutungen (sICH) für beide DSPA-Dosierungen (90 µg/kg: 3.5%; 125 µg/kg: 4.5%) unterhalb des entsprechenden Wertes bei der herkömmlichen rt-PA-Therapie (8%) [43]. Die Mortalitätsrate nahm jedoch in der Gruppe mit der höheren DSPA-Dosierung in Verbindung mit sICH zu [62]. Eine nach der Thrombolysis In Myokardial Infarction- (TIMI)-Graduierung sortierte gemeinsame Auswertung der Daten aus den drei Studien DIAS, DEDAS und DIAS-2 bestätigte den klinischen Vorteil (Verbesserung des National Institutes of Health Stroke Scale; NIHSS) der DSPA-Behandlung gegenüber Placebo für Patienten mit einem vollständigen oder nahezu kompletten arteriellen Gefäßverschluss (TIMI 0 oder 1) zu Beginn der Behandlung [63].

Im Jahr 2015 wurde die randomisierte, doppelt verblindete, placebokontrollierte und multizentrische DIAS-3-Studie abgeschlossen [64]. Untersucht wurden die Daten von 492 Patienten mit einem akuten Schlaganfall und einem gesicherten proximalen Gefäßverschluss 3 – 9 Stunden nach Eintritt des Ereignisses. Die DSPA-Dosis lag bei 90 µg/kg, der Median des Zeitintervalls von Symptom- bis Behandlungsbeginn betrug 7.0 Stunden. Es bestätigte sich erneut das vorteilhafte Risikoprofil des DSPA. Die Rate unerwünschter Nebenwirkungen lag im Placebobereich. Auch die Mortalitätsraten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Nach 90 Tagen lagen sICH unter DSPA in 2.5% und in der Placebo-Gruppe in 2.1% der Fälle vor. Der primäre Endpunkt der Studie wurde jedoch nicht erreicht: Der Anteil der Patienten mit einem günstigen klinischen Verlauf, d.h. mit einem Wert des modified Rankin Scale (mRS) von 0-2 nach 90 Tagen, unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (DSPA 51.3% und Placebo

49.8%). Lediglich in der nachträglich durchgeführten Shift-Analyse zeigte sich bei den mit DSPA behandelten Patienten eine Verbesserung des funktionellen Behinderungsgrades [64].

Die an 270 Patienten durchgeführte und 2016 veröffentlichte DIAS-4-Studie [65] lieferte ein vergleichbares Ergebnis: Die Therapie mit 90 µg/kgKG DSPA unterschied sich hinsichtlich des Behandlungsrisikos und des 90-Tage-Outcomes (mRS ≤ 2) nicht signifikant von der Placebo-Kontrollgruppe. Im Mittel betrug der Abstand zwischen Symptom- und Behandlungsbeginn 7.3 Stunden. Die Studie wurde vorzeitig abgebrochen. Auch die in Japan initiierte DIAS-J-Studie bestätigte das mit einer Placebo-Behandlung vergleichbare Risikoprofil des DSPA in Konzentrationen von 70 und 90 µg/kgKG [66].

In der gemeinsamen Auswertung der Daten der DIAS-3, DIAS-4 und DIAS-J-Studien fand sich schließlich auch kein signifikanter Anstieg des Patientenanteils mit einem günstigen klinischen Verlauf nach drei Monaten (mRS ≤ 2) für eine Behandlung mit 90 µg/kgKG DSPA (48.9%) binnen 3 – 9 Stunden nach Symptombeginn gegenüber Placebo (44.9%; Odds-Ratio 1.33, 95%-Konfidenzintervall: 0.95 – 1.85; p=0.096). Erneut stellte sich die DSPA-Behandlung als sicher heraus und führte darüber hinaus zu einer signifikant höheren Rekanalisationsrate (49.3% vs. 38.3%; p=0.019) [65].

Die aktuelle Studienlage liefert somit kein klares Bild hinsichtlich einer verbesserten Wirksamkeit des DSPA. Zwar ließ sich wiederholt eine Steigerung der Rekanalisationsraten nachweisen, eine positive Auswirkung auf den klinischen Verlauf fand sich dagegen nur in post-hoc-Analysen. Alle Studien deuten jedoch darauf hin, dass die klinische Anwendung des DSPA in einer Dosierung von 90 µg/kgKG im Vergleich zur herkömmlichen rt-PA Therapie aufgrund der besonderen Eigenschaften des DSPA mit einer größeren Sicherheit (vergleichbar mit Placebo) in einem gleichzeitig erweiterten Behandlungszeitfenster verbunden ist [60–62, 65].

Tenecteplase

Auch die Tenecteplase (TNK, Metalyse®) ist ein selektiver Aktivator von fibrin gebundenem Plasminogen. Mutationen an drei Stellen des Alteplasmoleküls steigern seine Spezifität gegenüber Fibrin um den Faktor 14-15 und damit seine Affinität zu fibrinreichen Thromben im Vergleich zu rt-PA. Es ist deshalb anzunehmen, dass TNK eine vermehrte thrombolytische Wirksamkeit als rt-PA besitzt [67, 68]. Im Verhältnis zu rt-PA ist die Resistenz von TNK gegenüber PAI-1 um den Faktor 80 erhöht [67, 68]. Die Halbwertszeit von TNK liegt mit rund 22 Minuten [67, 68] deshalb deutlich über der rt-PA-Halbwertszeit von nur 4 – 9 Minuten [69].

Genau wie beim DSPA kann die Therapie des TNK somit auch in Form einer einzelnen Bolusgabe erfolgen [68]. Diese einfache Applikationsform könnte auch zu einem früheren Start der Behandlung und daher zu einer Verbesserung der Thrombolyserate führen. Durch den verringerten Verbrauch von Fibrinogen, Plasminogen und α_2 -Antiplasmin reduziert sich die systemische Fibrinolyseaktivität der TNK und das damit verbundene Blutungsrisiko [68].

Die erste randomisierte Studie, die die Überlegenheit der TNK gegenüber rt-PA in Bezug auf seine thrombolytische Wirksamkeit bei Schlaganfallpatienten mit einem Perfusions-mismatch (>20%) und einem Gefäßverschluss mittels Computertomographie nachwies, wurde bereits 2012 veröffentlicht [70]. Verglichen wurde der therapeutische Effekt von TNK in Dosierungen von 0.1 und 0.25 mg/kgKG mit der rt-PA-Standardtherapie (0.9 mg/kgKG) binnen sechs Stunden nach Eintritt der Symptomatik. Im TNK-Behandlungsarm fanden sich eine signifikant erhöhte Reperfusionrate und auch ein signifikant verbesserter klinischer Verlauf der Patienten (bzgl. NIHSS-Verbesserung sowie 90d-mRS), wohingegen die Raten intrakranieller Blutungen keine relevanten Unterschiede aufwiesen [70]. Die Validität dieser Studie wird allerdings durch die sehr kleinen Fallzahlen (n=25 in jeder Gruppe) eingeschränkt. Außerdem wurden Patienten mit milden Schlaganfallsymptomen ausgeschlossen.

Eine Phase IIb/III-Studie von Haley et al. musste dagegen vorzeitig abgebrochen werden, weil im Vergleich zu den Dosierungen von 0.1 bzw. 0.25 mg/kgKG für die höhere TNK-Dosierung von 0.4 mg/kgKG nicht nur eine signifikante Zunahme symptomatischer intrakranieller Blutungen gefunden wurde, sondern auch eine Unterlegenheit hinsichtlich der NIHSS-Verbesserung binnen 24 Stunden [71]. In Bezug auf das funktionelle Outcome der Patienten nach 90 Tagen ergaben sich keine Unterschiede, weder zwischen den einzelnen TNK-Dosierungen noch im Vergleich zur rt-PA-Standardtherapie.

Auch in der ATTEST-Studie (Alteplase-Tenecteplase Trial Evaluation for Stroke Thrombolysis) unterschied sich die Behandlung mit 0.25 mg/kgKG TNK nicht von der Therapie mit 0.9 mg/kgKG rt-PA in Bezug auf den prozentualen Anteil des geretteten Hirngewebes 24 - 48 Stunden nach Beginn der Thrombolyse [72]. Auch die sekundären Outcomedaten dieser Studie, die klinische Verbesserung nach 24 Stunden gemessen mittels NIHSS und mRS nach 90 Tagen sowie das Auftreten von sICH oder anderer schwerwiegender Nebenwirkungen, lieferten in den beiden Behandlungsarmen ähnliche Werte.

Die bislang größte randomisierte Vergleichsstudie zwischen TNK und rt-PA ist die NOR-TEST-Studie (n=1100) [73]. In dieser multizentrischen Studie wurde der Effekt von TNK (0.4

mg/kgKG) und rt-PA (0.9 mg/kgKG) bei der Behandlung akuter Schlaganfallpatienten im 4.5-Stunden-Zeitfenster untersucht. Die Patientenselektionierung erfolgte mittels CT-Bildgebung. Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Sicherheit oder den Anteil der Patienten mit einem hervorragenden funktionellen Outcome (mRS \leq 1) nach 90 Tagen nachweisen. Nachteil der Studie ist der hohe Anteil von Patienten mit einer geringgradigen Symptomatik (mittlerer Baseline-NIHSS: 4), einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) oder einer als Schlaganfall fehldiagnostizierten anderen Erkrankung (sog. Stroke mimic).

In der EXTEND-IA-Studie zeigten sich eine signifikant erhöhte Reperfusionrate sowie ein signifikant gebesserter Behinderungsgrad nach 90 Tagen bei Patienten mit proximalen Gefäßverschlüssen, bei denen das Bridging vor der mechanischen Thrombektomie mit 0.25 mg/kgKG TNK anstelle von 0.9 mg/kgKG rt-PA durchgeführt wurde [74]. Die beiden Lysestrategien unterschieden sich dagegen nicht hinsichtlich des Patientenanteils mit funktioneller Unabhängigkeit und des Auftretens von sICH [74]. Problematisch ist hier die geringe Probandenzahl (n=202).

Die Gründe für diese inhomogenen Studienergebnisse sind vielfältig. Eine zentrale Bedeutung spielen sicherlich die unterschiedlichen TNK-Dosierungen, die uneinheitlichen Einschlusskriterien, Studienendpunkte und Fallzahlen sowie die damit verbundenen variierenden statistischen Analyseverfahren. Einen ausführlicheren Überblick über die erwähnten Studien bietet die Publikation von Coutts et al. [75].

Mechanische Rekanalisationsverfahren

Neben dem bislang beschriebenen intravenösen Einsatz thrombolytischer Medikamente zur Wiederöffnung thrombotisch verschlossener Hirngefäße wurden auch lokale Applikationstechniken für Thrombolytika sowie rein mechanische Rekanalisationsverfahren entwickelt.

1982 gelang an der RWTH Aachen die erste erfolgreiche lokale Fibrinolysetherapie mit Streptokinase bei einer 27jährigen Patientin mit einem akuten Verschluss der A. basilaris [76]. Zu diesem Zeitpunkt wurden solche Gefäßverschlüsse systemisch mit Heparin therapiert, wobei hierdurch die Prognose nicht entscheidend verbessert werden konnte. Die Letalität der Basilarisverschlüsse wurde in der damaligen Literatur mit bis zu 80% angegeben [76]. In den Folgejahren wurden verschiedene mechanische Reperusionsverfahren entwickelt, die

zunächst nur bei Patienten mit einer Kontraindikation für eine intravenöse Thrombolyse angewandt wurden. Ziel war es, mittels Spezialkathetern, die von der Leiste aus bis zum verschlossenen Hirngefäß vorgeschoben wurden, den Thrombus zu sondieren, mit Thrombolytika aufzulösen (intraarterielle Thrombolyse) und / oder einfach aus dem Gefäß herauszuziehen (mechanische Thrombektomie). Die ersten nicht randomisierten Studien und Metaanalysen deuteten darauf hin, dass mit solchen endovaskulären Therapien höhere Rekanalisationsraten erzielt werden könnten [14, 77]. Im Jahr 2013 fielen jedoch die ersten drei randomisierten kontrollierten Studien (IMS-3, MR-RESCUE und SYNTHESIS, die sogenannte „unhappy triad“) hinsichtlich des Nutzens einer endovaskulären Therapie im Vergleich zur intravenösen rt-PA-Thrombolyse negativ aus [78–80]. Rückblickend lag dies in erster Linie an einer unzureichenden Patientenselektion, einer hohen Latenzzeit zwischen Symptom- und Therapiebeginn und einer noch unausgereiften Interventionstechnik. Der damals zugelassene Bergungskatheter (Merci-Retriever) war ein Coil-Retriever, bei dem sich der über den Thrombus vorgeschobene Draht distal zu einer Spirale aufwickelte und sich der Thrombus im Idealfall wie mit einem Korkenzieher herausziehen ließ. In der klinischen Praxis kam es jedoch häufig zu periinterventionellen Ischämien und auch zu Blutungskomplikationen infolge von Gefäßwandverletzungen.

Zwar konnte bereits vor Veröffentlichung der „unhappy triad“ in zwei randomisierten Studien gezeigt werden, dass die neue Generation der Extraktionsdevices, die sogenannten Stent-Retriever, eine effektivere und sicherere Form der mechanischen Thrombektomie darstellen [81, 82], die Publikationen der sechs großen Thrombektomiestudien (MR CLEAN, ESCAPE, EXTEND-IA, SWIFT-Prime, REVASCAT und THRACE), die der Methode letztendlich zum Durchbruch verhelfen sollten, erfolgten jedoch erst in den Jahren 2015 [83–87] bzw. 2016 [88]. Bei den neuen Stent-Retrievern entfaltet sich ein Maschendrahröhrchen direkt im Gerinnsel. Dieser Stent presst sich gegen die Gefäßwand und ergreift auf diese Weise das Gerinnsel in seiner ganzen Länge. Zusammen mit dem Stent zieht der Neuroradiologe das Blutgerinnsel zurück und saugt es über den Katheter ab. Es wurden auch reine Aspirationskatheter entwickelt („PENUMBRA-device“), über den das Blutgerinnsel aus dem verschlossenen Gefäß herausgesaugt werden kann [89]. Ihre relative Überlegenheit gegenüber den Stent-Retrievern konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden [90].

Sonothrombolyse

Ein anderer Ansatz zur Wiedereröffnung verschlossener Hirngefäße und damit zur Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls stellt die lokale Applikation diagnostischen Ultraschalls, die sogenannte Sonothrombolyse, dar. In verschiedenen Studien konnte der positive Effekt der Sonothrombolyse sowohl in Kombination mit einer systemischen rt-PA-Lyse [91–95] als auch in geringerem Maße im Rahmen einer Monotherapie [96–98] nachgewiesen werden. Die effizienteste Thrombolyse wird bei gleichzeitiger Verwendung von Ultraschall, Thrombolytikum und Echosignalverstärkern aus gasgefüllten Mikrobläschen erzielt [99–102]. Da Ultraschall besonders signifikant die Wirkung thrombolytischer Substanzen steigert, werden vornehmlich reversible und in ihrer Ausprägung energie- und frequenzabhängige Veränderungen der Fibrinstruktur durch eine Desaggregation noch nicht vernetzter Fibrinfasern und eine kavitationsbedingte Veränderung der Thrombusstruktur als wahrscheinlichste bzw. stärkste Wirkmechanismen diskutiert [103–106]. Durch sie entsteht vermutlich eine verbesserte Penetrations- und Bindungsmöglichkeit des Thrombolytikums [105, 107–109], was zu einer Verstärkung der enzymatischen Fibrinolyse und gleichzeitig zu einer Vergrößerung der Lysezone führt [105, 106, 110]. Thermische Effekte scheinen dagegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [111–113]. Bei der gleichzeitigen Anwendung von Ultraschall und Echosignalverstärkern dienen die lungengängigen Mikrobläschen als Kavitationsnuklei. In Abhängigkeit von der eingestellten Ultraschallfrequenz und der Schallenergie können sie zum Schwingen oder sogar zum Platzen gebracht werden [114], wodurch im Bereich des beschallten Gefäßverschlusses Energie freigesetzt wird. Es kommt so zu einer verstärkten Auflockerung des Thrombus und zu einer gesteigerten Wirkung der Sonothrombolyse [115–117]. In tierexperimentellen Studien konnte darüber hinaus ein positiver Effekt des Ultraschalls – insbesondere unter gleichzeitiger Verwendung eines Echosignalverstärkers – in Kombination mit rt-PA auf die Mikrozirkulation reperfundierter Hirnareale nachgewiesen werden [118–120]. Der Einsatz von kontrastmittelverstärktem Ultraschall führte allerdings in Patientenstudien zu keiner Verbesserung des funktionellen Outcomes [121].

In Bezug auf die Sicherheit fanden sich für den diagnostischen transkraniellen 2MHz-Ultraschall in klinischen Studien weder bei der alleinigen Ultraschallapplikation (verwendete Schallintensität bis zu 530 mW/cm²) [97, 122], noch bei einer zusätzlichen rt-PA-Behandlung (verwendete Schallintensität bis zu 750 mW/cm²) [91–93, 123] Hinweise auf Schädigungen

des Hirngewebes. Insbesondere wurde kein signifikanter Anstieg intrakranieller Blutungen registriert. Die TRUMBI-Studie zeigte dagegen, dass die rt-PA-unterstützte Sonothrombolyse risikoreich zu sein scheint, wenn die Frequenzen im kHz-Bereich, also unterhalb des üblichen diagnostischen Spektrums liegen [124]. Für die dabei aufgetretenen Blutungskomplikationen scheinen die Ausbildung stehender Wellen und dadurch induzierte vasodilatierende Effekte sowie eine Störung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich zu sein [125]. Bei hohen Schallintensitäten (1600 mW/cm^2) kann Ultraschall selbst im 1-MHz-Bereich bereits nach 15 Minuten erste Entzündungsreaktionen an den Endothelzellen von Rindern auslösen [126].

Unter Verwendung diagnostischer Ultraschallparameter kann die Sonothrombolyse jedoch sicher angewendet werden und eröffnet für Patienten mit Kontraindikationen für eine systemische Lysetherapie im Rahmen einer Monotherapie noch eine sinnvolle Therapieoption [97]. Als einzige Voraussetzung für eine suffiziente Behandlung ist der sonographische Nachweis des intrakraniellen Hirnarterienverschlusses zu erbringen, damit die Administration der Ultraschallenergie auch zielgenau erfolgen kann.

In der einfach verblindeten, prospektiv-randomisierten multizentrischen CLOTBUST-Studie ($n = 126$) wurde der Effekt einer zweistündigen, transtemporalen Ultraschallapplikation mit einem handelsüblichen, diagnostischen Dopplergerät (TCD: 2 MHz, 750 mW/cm^2) während bzw. nach einstündiger intravenöser Gabe von rt-PA bei akuten Verschlüssen der A. cerebri media untersucht [92]. In der Kontrollgruppe wurden die Patienten nur mit rt-PA behandelt. In der Ultraschallgruppe fand sich eine signifikant höhere Patientenzahl mit einer kompletten Rekanalisation oder drastischen klinischen Verbesserung innerhalb von zwei Stunden (49% vs. 30%). Nach drei Monaten wiesen 42% der beschallten Patienten ein gutes klinisches Outcome (mRS 0-1) auf. In der Kontrollgruppe lag die Rate bei lediglich 29%.

Im Jahr 2014 veröffentlichte Meta-Analysen wiesen die Wirksamkeit in Bezug auf die Rekanalisationsrate und den klinischen Verlauf sowie die sichere Anwendung der Sonothrombolyse in Hinblick auf das Auftreten symptomatischer Blutungen nach [127, 128]. Im Vergleich zur herkömmlichen systemischen Therapie mit rt-PA führte die kombinierte Therapie aus rt-PA und Ultraschall im MHz-Bereich zu einer dreifach höheren Wahrscheinlichkeit für eine komplette Rekanalisation und zu einer Verdopplung der Odds-Ratio für einen hervorragenden klinischen Verlauf (90-d-mRS ≤ 1) [128].

Die ultraschallunterstützte Thrombolyse stellte somit eine vielversprechende Behandlungsoption des akuten ischämischen Schlaganfalls dar.

1.3 Standard der Akuttherapie im Jahr 2015

Die Ausführungen in diesem Abschnitt beziehen sich auf den wissenschaftlichen Kenntnisstand des Jahres 2014 und spiegeln die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [129, 130] sowie der American Heart Association / American Stroke Association zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls [131] des Jahres 2015 wider.

Zu diesem Zeitpunkt waren alle Messungen dieser Habilitationsschrift bereits abgeschlossen oder befanden sich in ihrer Planung. Die hier vorgestellten Ergebnisse sollten daher vor dem Hintergrund der Behandlungsempfehlungen zur Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls des Jahres 2015 betrachtet werden.

2015 war lediglich das rt-PA durch die FDA zur intravenösen Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls bei Patienten über 18 Jahren zugelassen. Insbesondere wurde auch die Anwendung von (Pro)-Urokinase, Desmoteplase oder Tenecteplase nicht empfohlen. Im Falle der Tenecteplase und der Desmoteplase wurde allerdings darauf hingewiesen, dass die Evaluation noch nicht abgeschlossen sei.

Die rt-PA-Therapie erfolgt in einer Dosierung von 0.9 mg/kgKG (maximal 90 mg, 10% der Gesamtdosis als Bolus, den Rest anschließend als 60-minütige Infusion) innerhalb eines 4.5-Stunden-Zeitfensters. In der Gebrauchsinformation wurde vor dem Einsatz des rt-PAs bei Patienten über 80 Jahre gewarnt. Die Empfehlungen sahen jedoch aufgrund positiver Studien zu diesem Thema keine Altersbegrenzung mehr vor. Durch eine erweiterte Bildgebung im Sinne des Mismatch-Konzeptes (multimodales CCT oder MRT) konnte im Rahmen eines individuellen Heilversuches das Zeitfenster der systemischen Lysetherapie bei ausgewählten Patienten auf sechs Stunden erweitert werden. Dabei stellten frühe Ischämiezeichen, wie das Vorliegen einer Gewebshypodensität, ein hyperdenses Arterienzeichen sowie Parenchymschwellungen keine Kontraindikationen, sondern lediglich Hinweise für eine insgesamt schlechtere Prognose dar.

In Ausnahmefällen sollte unter Abwägung der möglichen Risiken und des zu erwartenden Nutzens die systemische Lyse auch bei Patienten mit einem niedrigen (NIHSS \leq 4) oder einem besonders hohen Schlaganfallschweregrad (NIHSS \geq 22), rückläufigen Symptomen, Diabetes mellitus mit Schlaganfall in der Anamnese, Schlaganfall oder größeren Operation in den vergangenen drei Monaten oder einem epileptischen Anfall erwogen werden.

Außerhalb der Zulassungskriterien konnte eine off-label-Therapie bei Patienten mit einer bestehenden Antikoagulation in Betracht gezogen werden. Als Voraussetzungen hierfür galt bei der Einnahme von Vitamin-K-Antagonisten ein INR-Wert von maximal 1.7 und bei einer Prämedikation mit einem direkten Thrombin- oder Faktor-Xa-Inhibitor das Vorliegen normwertiger spezifischer Gerinnungstests oder die nicht erfolgte Einnahme des Medikaments in den vergangenen 48 Stunden bei uneingeschränkter Nierenfunktion.

Eine klare Kontraindikation bestand bei ausgedehnten Infarktzeichen, einer intrakraniellen Blutung sowie einem nicht kontrollierbaren Hypertonus (Riva Rocci > 185/110 mmHg).

Die Thrombektomie wurde generell noch nicht empfohlen, sollte aber mittels Stent-Retriever bei sorgfältig ausgewählten Patienten als individueller Heilversuch durchgeführt werden. Als Auswahlkriterien galten ein mRS vor Symptombeginn von höchstens 1, ein großer Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf, eine schwere Behinderung (NIHSS \geq 6) trotz geringer Infarktdemarkation im CCT (Alberta stroke program early computed tomography score; ASPECTS \geq 6) und der Therapiestart binnen sechs Stunden nach Symptombeginn. In allen Fällen wurde bis zum Beginn der Thrombektomie eine "Bridging-Therapie" mit rt-PA empfohlen, sofern keine Kontraindikation für rt-PA vorliegt. Das Zeitfenster für die Behandlung konnte auf der Basis einer erweiterten Bildgebung für selektierte Patienten ausgedehnt werden. Die interventionelle Behandlung proximaler Gefäße im hinteren Stromgebiet sowie weiter distal gelegener Gefäße des vorderen Stromgebiets (M2- oder M3-Abschnitte der A. cerebri media) wurde als sinnvoll erachtet, aber nicht generell empfohlen. Im Falle eines Basilarisverschlusses bestand keine feste Obergrenze des Zeitfensters. Ab einer Zeitspanne von 12 Stunden nach Symptombeginn bzw. vier Stunden nach Komaeintritt wurde jedoch auf einen ungünstigen klinischen Verlauf verwiesen. Auch die endovaskuläre Therapie jüngerer Patienten (< 18 Jahren) oder Patienten mit einem geringen Behinderungsgrad (NIHSS < 6) oder einer größeren Infarktdemarkation (ASPECTS < 6) wurde nicht empfohlen, sondern lediglich als sinnvolle Einzelfalltherapie deklariert.

Im Zuge der mechanischen Thrombektomie wurden die intraarterielle Applikation von rt-PA sowie die Durchführung einer Angioplastie oder eines Stentings bei nachweislicher Gefäßstenosierung im Einzelfall als sinnvoll bezeichnet.

Trotz einiger vielversprechender Studien wurde die Sonothrombolyse in den Leitlinien vermutlich aufgrund der uneinheitlichen Datenlage nicht erwähnt.

1.4 Hypothesen und Fragestellungen

Als diese Arbeit konzipiert wurde, stellte die intravenöse rt-PA-Thrombolyse das Mittel der Wahl bei der Bekämpfung des akuten Schlaganfalls dar. Medikamentöse Alternativen gab es den damaligen Leitlinien zufolge nicht. Zu Gunsten eines raschen Behandlungsbeginns wurde auch die Durchführung einer erweiterten Bildgebung mittels diffusions- oder perfusionsgewichteter Sequenzen im MRT bzw. CT kritisch betrachtet und lediglich in Einzelfällen empfohlen. Die Indikationen für Interventionen jeglicher Art (intraarterielle Thrombolyse, Thrombektomie, Angioplastie oder Stenting) wurden ebenfalls sehr eng gefasst, so dass diese Methoden nur in Einzelfällen oder im Rahmen von Studien zur Anwendung kamen. Unabhängig davon stellt die Thrombektomie naturgemäß nur im Falle eines proximalen Gefäßverschlusses eine sinnvolle Behandlungsoption dar.

Auf der anderen Seite war bereits damals offensichtlich, dass der systemischen rt-PA-Therapie Grenzen gesetzt sind (vgl. S. 9 ff.). Die Notwendigkeit, unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden, sowie die Einhaltung genereller Zulassungsbeschränkungen führten dazu, dass nur ein Bruchteil der Schlaganfallpatienten mit rt-PA behandelt werden konnte. Eine entscheidende Rolle spielte früher vor allem das Festhalten an der zeitlichen Limitierung für die Anwendung des Medikaments [132]. US-amerikanische Daten aus dem Jahr 2008 belegen, dass zu dieser Zeit gerade einmal 3.5% aller akuten Schlaganfallpatienten einer systemischen Lysetherapie zugeführt werden konnten [133].

Vor diesem Hintergrund bestand die dringende Notwendigkeit, gängige Therapieverfahren zu optimieren und neue Verfahren zu entwickeln.

Als Alternative zur herkömmlichen rt-PA-Standardtherapie bietet sich der Einsatz selektiver Aktivatoren von fibrinogenem Plasminogen an. Sowohl für die Desmoteplase (vgl. S. 10 ff.) als auch für die Tenecteplase (vgl. S. 12 ff.) lagen im Jahr 2015 keine Anwendungsempfehlungen vor, obgleich einzelne Studien auf eine sichere und gleichzeitig effiziente Behandlung hinwiesen. Ähnlich verhielt es sich mit dem therapeutischen Einsatz des Ultraschalls. Trotz seiner nachweislich thrombolytischen Wirksamkeit spielte die Sonothrombolyse im klinischen Alltag keine wesentliche Rolle. Weiterführende Untersuchungen erschienen jedoch angebracht aufgrund der einfachen und sicheren Anwendbarkeit dieser Methode direkt am Patientenbett und deren Einsetzbarkeit bei vorliegender Kontraindikation für eine systemische Lyse mit rt-PA. Auch wurde vermutet, dass

die Kombination aus Ultraschall und Tenecteplase zu einer deutlichen Steigerung der Rekanalisationsrate führen könnte [134].

Gemäß des „Clot is brain“-Konzepts beschreibt die vorliegende Arbeit Untersuchungen an Thromben, die neue Erkenntnisse zur Optimierung der Therapie ischämischer Schlaganfälle liefern sollen. Drei Fragen galt es dabei zu beantworten:

1. Ergeben sich aufgrund messbarer Veränderungen am Thrombus Hinweise für effizientere Thrombolyseverfahren im Vergleich zur rt-PA-Standardtherapie?
2. Welchen Einfluss hat Acetylsalicylsäure auf die Beschaffenheit eines Thrombus und dessen Lysierbarkeit?
3. Kann mithilfe einer histologischen Analyse auf den pathophysiologischen Entstehungsprozess eines thrombotischen Embolus geschlossen werden?

Die beiden ersten Fragen stehen in Zusammenhang mit der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls und werden im ersten Teil der Arbeit (Kap. 2 und 3) behandelt. Analysiert wird dazu die Wirksamkeit der neuartigen Medikamente Desmoteplase und Tenecteplase sowie der Sonothrombolyse im direkten Vergleich zur rt-PA-Thrombolyse, dem aktuellen Standardtherapieverfahren. Für die entsprechenden präklinischen Versuche wurden *in vitro* Modelle entwickelt. Als Korrelat der thrombolytischen Wirkung der verschiedenen Lyseverfahren wurden die Gewichtsabnahme des Thrombus bzw. die Abnahme seines Flusswiderstandes und die Veränderungen seiner histologischen Beschaffenheit gewählt.

Zur Beantwortung der dritten Frage wurde die THROMBEX-Studie ins Leben gerufen. Ihr widmet sich der klinische Teil dieser Arbeit (Kap. 4). Hier wurden thrombotische Embolifragmente von thrombektomierten Schlaganfallpatienten histologisch untersucht. Sollte es eine Korrelation zwischen der histologischen Thrombuszusammensetzung und dem Entstehungsmechanismus der Blutgerinnsel geben, so ließe sich anhand der histologischen Analyse frühzeitig die passgenaue individuelle Prävention festlegen. Der langfristige klinische Verlauf vieler Schlaganfallpatienten könnte dadurch positiv beeinflusst werden.

A Präklinische Untersuchungen

2 Entwicklung von in vitro Modellen zur Untersuchung der Thrombolysen

In diesem Kapitel wird die Entwicklung der Modelle beschrieben, die für die Untersuchung verschiedener Thrombolysenszenarien im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Ziel war es, mit Hilfe der Modelle möglichst definierte und damit reproduzierbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, unter denen eine gezielte Änderung einzelner Parameter möglich ist. Auf diese Weise sollten die relevanten Einflussfaktoren der Thrombolysen akuter zerebraler Embolien besser erfasst und verstanden werden.

Mit dem statischen Modell sollten erste Untersuchungen zur Wirkungsweise verschiedener Medikamente, Thrombolytika und des Ultraschalls durchgeführt werden. Hydrodynamische Wechselwirkungen wurden bewusst vernachlässigt, um möglichst wenige Störgrößen zu erhalten. Für unterschiedliche Thrombolytika sollten auf diese Weise Dosisfindungsexperimente und direkte Effektivitätsvergleiche realisiert werden.

Das dynamische Flussmodell wurde mit der Intention konzipiert, auch den Einfluss pulsativer Strömungsverhältnisse auf die Thrombolysen erfassen zu können. Darüber hinaus sollte eine kontaktfreie und zeitkontinuierliche Messung Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf unterschiedlicher Thrombolysenszenarien zulassen. Die verschiedenen Therapiekonzepte lassen sich so hinsichtlich ihrer Effizienz in Echtzeit verfolgen, um beispielsweise Fragen nach der erforderlichen Dauer eines thrombolytischen Verfahrens besser beantworten und die effektivsten Parametereinstellung schneller festlegen zu können.

Schließlich wird die Entwicklung eines standardisierten Gerinnungsprotokolls vorgestellt. Ein solches Gerinnungsprotokoll ist für den Vergleich unterschiedlicher Therapieverfahren zwingend erforderlich.

2.1 In vitro Thrombolysen-Modelle

Bevor neue Thrombolysenstrategien an Patienten eingesetzt werden können, müssen deren Wirkungsweise und Effizienz, aber auch deren potentielle Risiken und Wechselwirkungen bekannt sein. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Untersuchung der

Wirkmechanismen und der thrombolytischen Effektivität der alternativen Thrombolytika Desmoteplase und Tenecteplase sowie der Sonothrombolyse. Die Bewertung möglicher Risiken und Nebenwirkungen sollte dann in klinischen Studien erfolgen.

Tiermodelle weisen meistens relevante Unterschiede zur humanen Biochemie, Anatomie oder Physiologie auf, so dass sich die gewonnenen Versuchsergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragen lassen. In Bezug auf die thrombolytische Wirkung des Ultraschalls sind beispielsweise Abweichungen der Schädelgeometrie und des Herzkreislaufsystems zu nennen. Ultraschallfrequenz und -intensität müssen daher auf diese veränderten Verhältnisse abgestimmt werden. Geschieht dies nicht, können Experimente bei Tier und Mensch zu widersprüchlichen Ergebnissen führen [135].

Aus diesem Grund wurden *in vitro* Modelle entwickelt. Im Gegensatz zu Tiermodellen bieten sie den Vorteil konstanter Untersuchungsbedingungen und generieren durch definierte Veränderungen relevanter Untersuchungsparameter in kurzer Zeit reproduzierbare Ergebnisse.

Allerdings lassen sich in einem *in vitro* Modell verschiedene physiologische Zusammenhänge nur unzureichend berücksichtigen. So verwendete, bis zur Entwicklung des hier vorgestellten Flussmodells, kein anderes Sonothrombolysemodell physiologische Flussverhältnisse, obgleich die Bedeutung der durch sie am Thrombus induzierten Scherkräfte immer wieder hervorgehoben wird [136–138]. Die meisten publizierten *in vitro* Modelle verwenden einen statischen Versuchsaufbau. Dabei wird die Wirkung von Thrombolytika und Ultraschall auf Thromben untersucht, die sich in einer Küvette befinden. Messgrößen sind die Gewichtsveränderung [94, 95, 139–142] oder die Radioaktivität der umgebenden Lösung bei zuvor radioaktiv markierten Thromben [113, 143]. In anderen Publikationen finden sich Versuchsanordnungen, in denen der Thrombus einer Strömung mit konstanter Flussgeschwindigkeit ausgesetzt ist [98, 144–147]. Die Reperfusion wird durch Auslitterung der am Thrombus vorbeiströmenden Flüssigkeit [144], durch fotoelektrische Verfahren [146] oder mit Hilfe der aufgezeichneten Flussgeschwindigkeit [145] gemessen. Die Thrombolyse wird durch Gewichtsmessungen [98, 147] oder anhand der Konzentration fortgespülter, radioaktiv markierter Thrombuspartikel [145] bestimmt. Nur wenige Gruppen verwenden Rollerpumpen, die zwar pulsatile aber dennoch unphysiologische Flüsse erzeugen [148]. Um die hämodynamischen Einflüsse berücksichtigen zu können, denen der Thrombus im

Blutkreislauf des Patienten ausgesetzt ist, müssen jedoch im Modell physiologische Fluss- und Druckverhältnisse generiert werden.

Ein weiterer großer Nachteil der meisten Thrombolyseversuche besteht darin, dass die Thrombolyse nur zu bestimmten Zeitpunkten gemessen werden kann. Kontinuierlich arbeitende Messverfahren wurden nur von wenigen Arbeitsgruppen verwendet [145, 146]. Kenntnisse über die zeitliche Dynamik der Thrombolyse sind jedoch von entscheidender Bedeutung, wenn man beispielsweise die Fragen nach der optimalen Insonationsdauer des Ultraschalls, der Dauer der Medikamentenapplikation oder der zeitlichen Korrelation zwischen Ultraschall und Medikamentengabe beantworten will. Zur Entwicklung effizienter und gleichzeitig sicherer Lysestrategien muss die Thrombolyse daher zeitkontinuierlich gemessen werden. In den meisten in vitro Modellen lässt sich die Thrombolyse außerdem nur bestimmen, indem der Thrombus aus dem Versuchsstand herausgenommen wird, z.B. zur Durchführung einer Gewichtsmessung. Dadurch wird der Prozess der Thrombolyse unterbrochen und der Thrombus mechanisch beeinflusst, was zu einer deutlichen Verfälschung der Messergebnisse führen kann.

Die Herausforderung bestand somit darin, physiologische Flussverhältnisse sowie zeitkontinuierliche und kontaktfreie Messungen zu ermöglichen, um unterschiedliche Thrombolyse Szenarien besser untersuchen zu können, als es bislang in der Literatur beschreiben wurde.

Entscheidend für die Durchführung reproduzierbarer Thrombolyseversuche ist aber auch die Festlegung eines standardisierten und gleichzeitig möglichst physiologischen Gerinnungsprotokolls.

In der Fachliteratur findet sich eine große Anzahl von Gerinnungsprotokollen, die erstaunlich vielfältig und oft sehr unphysiologisch sind. Bei ansonsten vergleichbaren Untersuchungen weichen die Thrombolyseraten aufgrund der verschiedenen Eigenschaften der Blutgerinnsel erheblich voneinander ab und lassen keine belastbaren Vergleiche zu. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden spontangeronnenes humanes Vollblut [98, 140, 149] oder rekalfiziertes Vollblut, das zuvor in Citratröhrchen aufbewahrt wurde [141, 142, 150]. Diese artifiziellen Gerinnsel sind jedoch nicht stabil genug, um physiologischen Flussverhältnissen Stand zu halten und können daher keine Thromben simulieren, die in der Lage wären, einen arteriellen Gefäßverschluss und somit einen Schlaganfall zu verursachen.

Daher war es erforderlich, ein Gerinnungsmodell zu entwickeln, das möglichst physiologisch ist und zudem Thromben generiert, die in physiologischen Strömungsverhältnissen ausreichend lange stabil bleiben, aber dennoch auf eine Lysetherapie ansprechen.

Die Erstellung eines gut funktionierenden Modells ist also keineswegs trivial und kann viel Zeit in Anspruch nehmen. Ist der Aufbau jedoch einmal realisiert, verläuft der Betrieb eines solchen Modells vergleichsweise preiswert und unkompliziert. Sofern das Modell auf die gestellte Fragestellung gut adaptiert ist, lassen die erzielten Ergebnisse im Rahmen der technischen Limitationen tragfähige Schlussfolgerungen zu.

2.2 Das statische Modell

(Roessler FC et al. *Journal of Neuroscience Methods* 2014, 237:26-32)

Der Aufbau des statischen Thrombolysemodells ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Thromben befinden sich in Eppendorf™ Mikroreaktionsgefäßen (REF 72.690.001, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), die mit gepuffertem Plasma (pH 7.4) gefüllt sind. Bis zu fünf Mikroreaktionsgefäße können gleichzeitig an einem Gestell aus Polyoxymethylen (POM) befestigt werden. Das POM-Gestell steht in einem Behälter, der mit entgastem Wasser gefüllt ist.

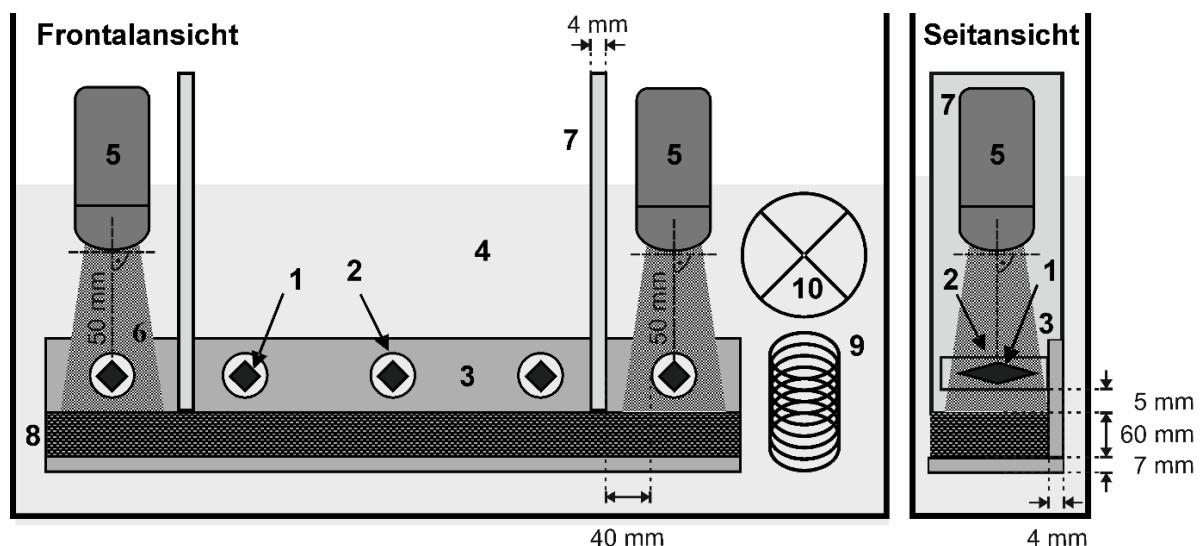


Abbildung 2: Das statische Thrombolysemodell

Die Thromben (1) befinden sich in plasmagefüllten Mikroreaktionsgefäßen (2), die an einer Halterung aus Polyoxymethylen (POM) (3) fixiert werden. Die Halterung wird in einem Behälter mit entgastem Wasser (4) versenkt. Mikroreaktionsgefäße, die sich in dem von einer Schallsonde (5) erzeugten Schallfeld (6) befinden, sind von den übrigen Thromben durch eine schallabsorbierende Wand aus POM (7) getrennt. Ein Ultraschallabsorber (8) verhindert Schallreflexionen. Die Temperatur des entgastem Wassers wird durch eine temperaturgesteuerte Heizung (9) und eine Umwälzpumpe (10) konstant gehalten.

Da die Mikroreaktionsgefäße lediglich an ihren Enden horizontal an dem POM-Gestell montiert wurden, ragen sie mit den in ihnen befindlichen Thromben frei in ein Wasserbad hinein, dessen Temperatur bei 37 °C mit Hilfe einer temperaturgesteuerten Heizung (Julabo ED (v.2) class1, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) und einer Umwälzpumpe konstant gehalten wird. Von den fünf montierten Mikroreaktionsgefäßen können die beiden rechts und links außen an der Halterung angebrachten Mikroreaktionsgefäße mit Ultraschall beschallt werden. Sie sind so montiert, dass sich die Thromben exakt 50 mm senkrecht unterhalb der Schallsonde genau im Sample Volume des Ultraschalls befinden. Die beschallten Mikroreaktionsgefäße sind von den drei mittleren Mikroreaktionsgefäßen durch eine schallabsorbierende Wand aus POM getrennt. Auf diese Weise werden die drei in der Mitte liegenden Mikroreaktionsgefäße vor Streuwellen geschützt. Schallabsorber aus Schaumstoff (SH002, aixFOAM, Eschweiler, Deutschland) unterhalb der Mikroreaktionsgefäße verhindern die Reflexion der eingestrahnten Schallwellen.

Die Quantifizierung der Thrombolyse erfolgt bei diesem Modell durch die Messung des Gewichtsverlustes des Thrombus. Dazu wird eine Analysenwaage (Kern 770; Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) verwendet, mit der die Thromben vor und nach der Behandlung gewogen werden. Um Messfehler durch Dehydrierung zu vermeiden, werden die Thromben in einem mit Ringer-Lösung gefüllten Gefäß gewogen. Das Gewicht des Gefäßes und der Ringer-Lösung wird zuvor bestimmt und anschließend von dem Gesamtgewicht abgezogen. Schließlich wird die relative Gewichtsabnahme in Bezug auf das Ausgangsgewicht des Thrombus ermittelt, damit auch Ergebnisse von Versuchen mit unterschiedlich schweren Thromben miteinander verglichen werden können.

2.3 Das dynamische Flussmodell

(Roessler FC et al. *BMC Neurology* 2011, 11:58-67)

Das dynamische Flussmodell wurde im Rahmen der zweiten Dissertationsarbeit des Autors entwickelt [151]. Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit, sollen in diesem Abschnitt die Funktionsweise des Modells und dessen wesentlichen Eigenschaften in verkürzter Form dargestellt werden.

Das Modell ist in der Lage, die Thrombolyse unter pulsatilen und physiologischen Flussverhältnissen zu untersuchen, wobei die hydrodynamischen Rahmenbedingungen der

Versuche variabel und präzise einstellbar sind. Darüber hinaus können die Messdaten zeitkontinuierlich und bezüglich des untersuchten Thrombus kontaktfrei erhoben werden, so dass der dynamische Prozess der Thrombolyse zeitlich hochaufgelöst, störungsfrei und in Echtzeit nachvollzogen werden kann. Bei der zu erfassenden Messgröße handelt es sich um die Druckdifferenz, die über einen speziellen Korb anliegt, in dem sich der Thrombus befindet. Die gemessene Druckdifferenz ist mit der Lyserate über eine streng monotone, nichtlineare Beziehung verknüpft. Schließlich gewährleistet eine adäquate Applikationsweise von Ultraschallwellen und thrombolytischen Substanzen die Durchführung unterschiedlicher Sonothrombolysezenarien, bei denen alle physikalisch erfassbaren Parameter definiert verändert werden können.

2.3.1 Beschreibung des Modellaufbaus

Der Aufbau des Modells ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Der Thrombus wird in einem speziellen Thrombuskorb innerhalb eines geschlossenen Schlauchsystems platziert. Als Blutersatzflüssigkeit fungiert eine isotone Elektrolytlösung (Ringer-Lösung, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Deutschland), die durch eine computergesteuerte Exzentrerschneckenpumpe vom Typ 2-E15A der Firma Netzsch (Netzsch Mohnopumpen GmbH, 84478 Waldkraiburg, Deutschland) angetrieben wird und durch das Schlauchsystem zirkuliert. Das Steuerungsprogramm kann sowohl konstante als auch pulsatile Flussgeschwindigkeitsprofile mit variablen Pulsformen generieren. Temperatur (37 °C) und pH-Wert (7.4) der Blutersatzflüssigkeit werden über ein Flüssigkeitsreservoir konstant gehalten. In dem Reservoir befinden sich dazu eine temperaturgesteuerte Heizung (Julabo ED (v.2) class1, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) und als Zusatz zur Blutersatzflüssigkeit eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland). Zwei parallel angeordnete, fein justierbare Nadelventile (Teflon 1/8" FNPT: Aalborg, Orangeburg / NY, USA) sorgen dafür, dass neben einer definierten Flussgeschwindigkeit auch stufenlos kontrollierbare Druckverhältnisse innerhalb des Schlauchsystems vorliegen.

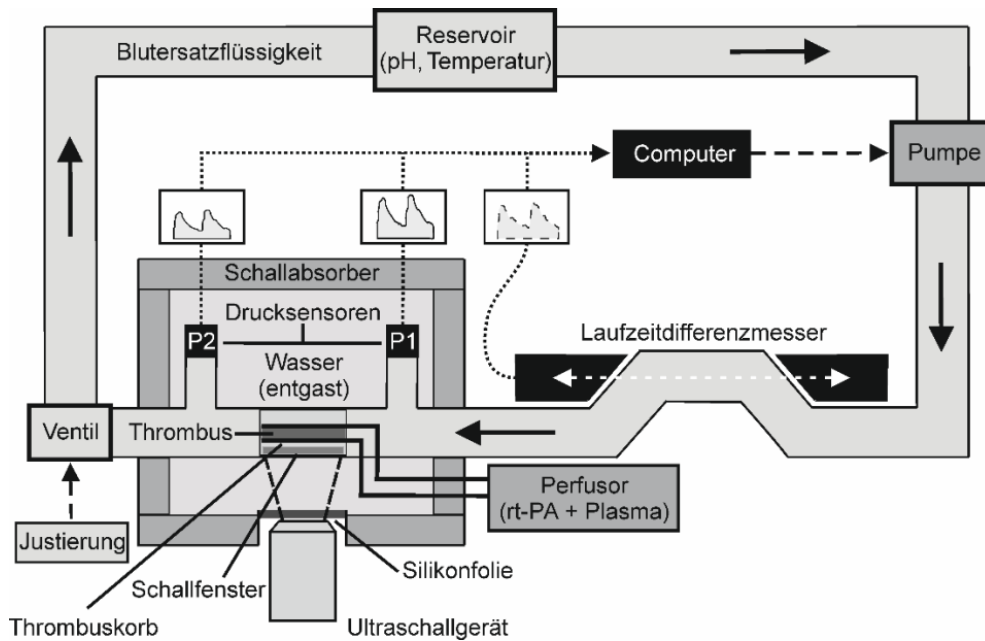


Abbildung 3: Das dynamische Flussmodell

Eine ausführliche Beschreibung findet sich im Text. Die durchgezogenen Pfeile geben die Flussrichtung der Blutersatzflüssigkeit an. Die gestrichelten Pfeile stellen die Möglichkeiten zur Beeinflussung der hydrodynamischen Bedingungen innerhalb des Modells dar. Die gepunkteten Pfeile kennzeichnen den Weg der Datenerfassung. Der weiße Doppelpfeil entspricht der Laufrichtung des Ultraschalls bei der Laufzeitdifferenzmessung. Zur besseren Übersicht ist nur eins der zwei parallel angeordneten Nadelventile abgebildet. Die Abbildung wurde der zweiten Dissertationsschrift des Autors [151] entnommen.

Die Pumpe, das Schlauchstück mit dem thrombusgefüllten Korb und die Nadelventile simulieren jeweils das Herz, das thrombembolisch verschlossene Gefäß sowie den peripheren Widerstand eines Patienten. Der Schlauchabschnitt, in dem sich der Thrombuskorb befindet, verläuft durch ein mit physiologisch temperiertem und entgastem Wasser gefülltes Becken, dessen Wände mit Schallabsorbern ausgekleidet sind. Durch eine Aussparung in der Beckenvorderwand, die mit einer dünnen Silikonfolie abgedichtet ist, können Ultraschallwellen senkrecht zur Flussrichtung der Blutersatzflüssigkeit auf den Thrombus gerichtet werden. Thrombolytische Substanzen können gemeinsam mit Blutplasma über spezielle Schläuche direkt in den Thrombuskorb injiziert werden. Über einfache Luer-lock-Anschlüsse lassen sich vor dem Thrombuskorb Echosignalverstärker in das Schlauchsystem applizieren. Zwei Drucksensoren (REF I-99-IA-013, pvb©: Critical Care GmbH, Kirchseeon, Deutschland), die kurz vor und hinter dem Thrombuskorb an das Schlauchsystem angeschlossen sind und ein Laufzeitdifferenzmesser, ermöglichen die zeitkontinuierliche Erfassung der Druckwerte vor und hinter dem Thrombus sowie der Flussgeschwindigkeit. Aus den erfassten Zustandsgrößen kann der Strömungswiderstand des Thrombus berechnet werden.

2.3.2 Generierung pulsatiler Flussgeschwindigkeiten

Als Vorlage für die pulsatilen Flussgeschwindigkeiten, die in den Versuchen verwendet werden, dienen duplexsonographisch erfasste Flussgeschwindigkeitsprofile in der distalen ACI (C1-Segment) gesunder Probanden.

Die duplexsonographisch gewonnenen Flussgeschwindigkeitswerte werden in das Steuerungsprogramm der Pumpe eingegeben. Durch Modifikation der Programmparameter und durch Justierung der Nadelventile, die sich hinter dem Thrombuskorb im Schlauchsystem befinden, wird schließlich im Modell kurz vor dem Thrombuskorb ein Flussgeschwindigkeitsprofil erzeugt, das mit dem ursprünglichen Flussgeschwindigkeitsprofil des Probanden übereinstimmt. Gleichzeitig werden auf diese Weise physiologische Druckverhältnisse im Modell generiert (Abb. 4).

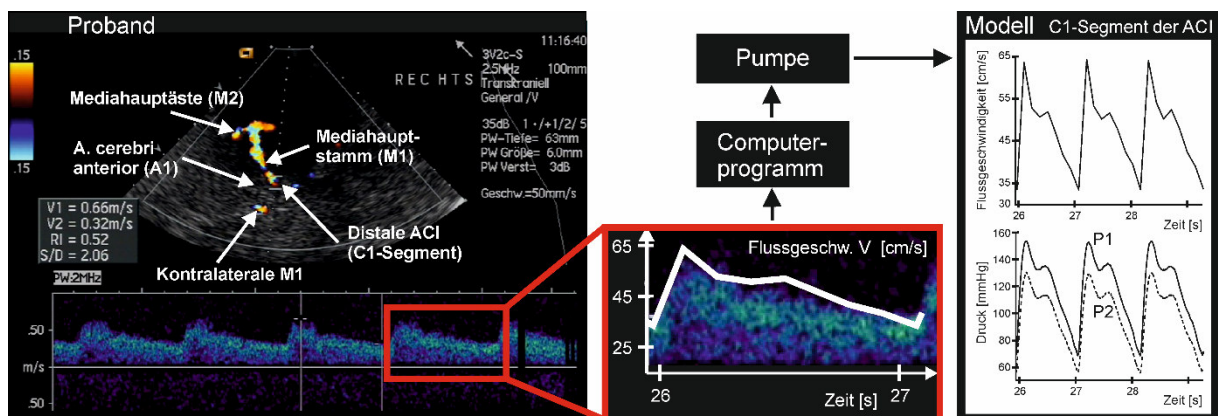


Abbildung 4: Generierung physiologischer Fluss- und Druckverhältnisse

Links ist die farbduplexsonographische Darstellung der A. cerebri media eines gesunden Probanden zusammen mit der Flussgeschwindigkeitskurve im Bereich des C1-Segments der A. carotis interna (ACI) zu sehen. Das Flussgeschwindigkeitsprofil wird mittels Computerprogramm auf die Exzentrerschneckenpumpe übertragen. Innerhalb des Modells wird die Form des Flussgeschwindigkeitsprofils durch die nicht beeinflussbaren physikalischen Eigenschaften des Schlauchsystems verändert. Durch eine Regulierung der hydrodynamisch wirksamen Parameter (Widerstand des Nadelventils und Geschwindigkeitsprofil des Steuerprogramms) erfolgt so lange eine gezielte Korrektur, bis am Laufzeitdifferenzmesser kurz vor dem montierten Thrombuskorb das Flussgeschwindigkeitsprofil wieder dem Geschwindigkeitsprofil des Probanden gleicht. Die Differenz der Druckpulskurven, die vor (P1) und hinter (P2) dem Thrombuskorb gemessen werden, ist dabei abhängig vom hydrodynamischen Widerstand des Thrombuskorbes, der Größe des eingesetzten Thrombus, der eingestellten Flussgeschwindigkeit und vom peripheren Flusswiderstand des Nadelventils. Die Abbildung wurde in modifizierter Form der zweiten Dissertationschrift des Autors [151] entnommen.

2.3.3 Datenerhebung zur Bestimmung der Lyserate

In dem dynamischen Modell kann die Lyserate prinzipiell auf vier Arten ermittelt werden.

1. Über die Messung des Thrombusgewichts vor und nach der Thrombolyse kann die Gewichtsabnahme als Maß für die Thrombolyse bestimmt werden. Damit gewinnt man allerdings nur einen Wert. Eine zeitkontinuierliche Analyse ist nicht möglich.
2. Die kontinuierliche Aufzeichnung der Flussgeschwindigkeiten am Laufzeitdifferenzmesser kann im Gegensatz zur Gewichtsmessung eine zeitliche Auflösung des zu beobachtenden Prozesse gewährleisten. Allerdings lässt sich die Thrombolyse so nur qualitativ erfassen, da aufgrund der komplexen und nichtlinearen Strömungsverhältnisse eine Umrechnung von der Flussgeschwindigkeit auf die Lyserate nicht möglich ist.
3. Die zeitkontinuierliche Darstellung des Flussgeschwindigkeitsprofils am Ort des Thrombus mittels Duplexsonographie käme der klinischen Routine am nächsten. Über den TIBI-Score [152] könnte eine zeitkontinuierliche Bewertung der Lyserate erfolgen. Allerdings differenziert der kategoriale TIBI-Score nur sechs Flusszustände, so dass eine gewisse Unschärfe bei dem Vergleich unterschiedlicher Thrombolyseszenarien entstehen würde. Schließlich würde eine kontinuierliche Ultraschallapplikation bei der Bewertung sonothrombolytischer Therapien eine Störgröße darstellen.
4. Die beste Option bietet die zeitkontinuierliche Erfassung der Druckdifferenz, die über dem Thrombuskorb anliegt. Sie beeinflusst den Ablauf der Thrombolyse nicht und liefert einen kontinuierlichen Parameter, der sich leicht quantifizieren lässt.

Die Stärke des Modells liegt also in der zeitkontinuierlichen und störungsfreien Erfassung der Druckdifferenz. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Form des Thrombuskorbes.

2.3.4 Der Thrombuskorb

Aufgrund der speziellen Form des Thrombuskorbes besteht eine direkte Relation zwischen der gemessenen Druckdifferenz und dem Strömungswiderstand des Thrombus bzw. seinem Volumen.

Der Thrombuskorb (Abb. 5) ist eine zylindrische Röhre aus POM mit einem konzentrischen Hohlraum, in dem der Thrombus platziert wird.

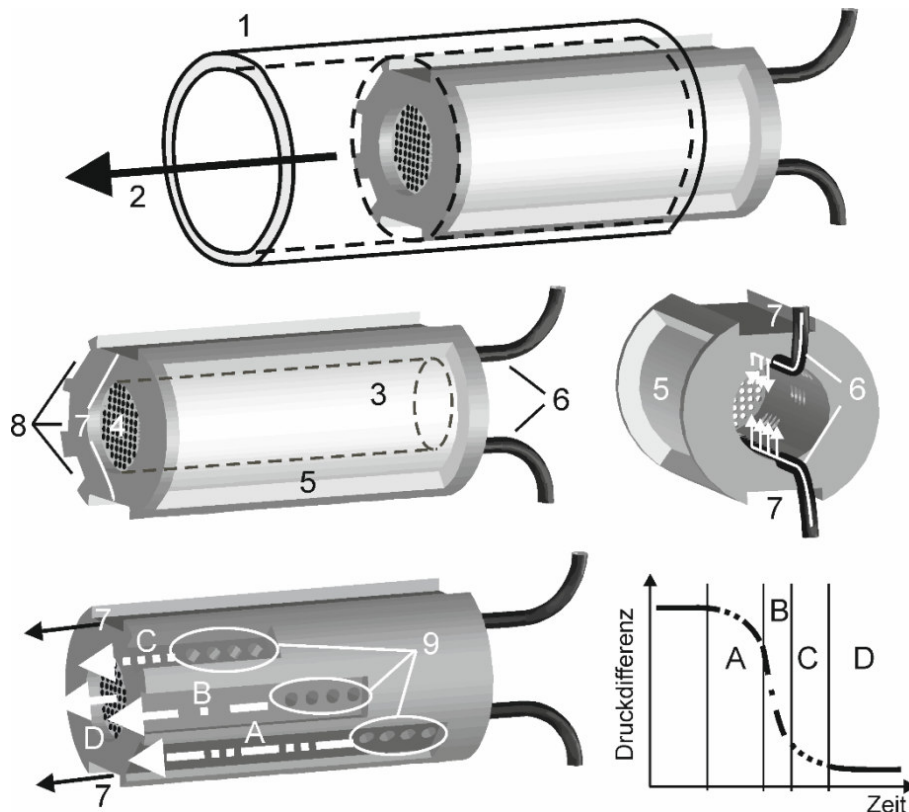


Abbildung 5: Gestalt und Funktionsweise des Thrombuskorbes

Ausschnitt des Schlauchsystems (1), Richtung der strömenden Blutersatzflüssigkeit (2), Hohlraum für den Thrombus (3), Gazeplatte (4), Schallfenster (5), zuführendes Schlauchsystem für thrombolytische Substanzen (6), Bypasskanäle zur Minimierung des Eigenwiderstands des Thrombuskorbes (7). Wird der Thrombus im Inneren des Korbes kürzer, öffnen sich immer mehr Löcher in der Wand des Thrombuskorbes (9), über die die Blutersatzflüssigkeit in Abflusskanäle (8) gelangt (um die Abbildung übersichtlicher zu gestalten, wurden nur drei der vier Abflusskanäle dargestellt). Eine Auflösung des Thrombus führt so zu einem schrittweisen Öffnen der Abflusswege A - D bzw. zu einer kontinuierlichen Zunahme des für die Blutersatzflüssigkeit zur Verfügung stehenden Strömungsquerschnitts. Dadurch reduziert sich der hydrodynamische Widerstand des Thrombuskorbes bzw. die über den Korb abfallende und in den Versuchen gemessene Druckdifferenz. Die Grafik unten rechts zeigt den Zusammenhang zwischen der sukzessiven Öffnung der Abflusskanäle A - D und der messbaren Druckdifferenz. Die Abbildung wurde der zweiten Dissertationsschrift des Autors [151] entnommen.

Bezogen auf die Strömungsrichtung der im Schlauchsystem zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit ist das distale Ende des Hohlraums mit einer Gazeplatte verschlossen, so dass der Thrombus nicht aus dem Korb herausgespült werden kann. Zwei dünne Schläuche, die außerhalb des Schlauchsystems an Perfusoren (Pilot A2, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) angeschlossen sind, ziehen längs des Hohlraums in den Thrombuskorb hinein. Plasma und thrombolytische Substanzen können so über kleine Austrittslöcher am Ende der Schläuche direkt zum Thrombus gelangen. Durch diese kontrollierte und konstante

Applikationsform ist der Thrombus trotz der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit innerhalb des Korbes stets von einem Gemisch aus Plasma und Thrombolytikum umgeben.

Eine Materialausparung an der Außenseite der Röhre dient als Schallfenster für den Ultraschall. Während des Experiments ist sie mit der Blutersatzflüssigkeit gefüllt und verringert so die Dämpfung der eingestrahlten Ultraschallwellen.

Zwei Vertiefungen in der Außenwand des Korbes bilden zusammen mit dem Schlauch, in dem sich der Korb befindet, zwei isolierte Bypasskanäle, in denen die Blutersatzflüssigkeit den Korb auch dann noch passieren kann, wenn dieser durch einen Thrombus komplett ausgefüllt ist. Auf diese Weise wird der Betrieb des Systems bei vollständig gefülltem Thrombuskorb gewährleistet und der hydrodynamische Strömungswiderstand des Korbes reduziert.

Um die Volumenabnahme des Thrombus in eine Reduktion des Strömungswiderstandes zu überführen, befinden sich vier voneinander getrennte, unterschiedlich lange und unterschiedlich tiefe Kanäle in der Außenwand des Korbes. Zusammen mit dem Schlauchstück, das den Korb umschließt, bilden sie Abflussrinnen. Diese vier Abflussrinnen stehen über je vier gleichgroße kleine Löcher, die sich an ihren proximalen Enden befinden, mit dem Hohlraum des Korbes in Verbindung. Die Löcher der Abflussrinnen sind so angeordnet, dass sie gemeinsam die gesamte Länge des Hohlraumes im Inneren des Korbes abdecken. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der Abflussrinnen kommt es dabei zu keiner Überlappung. Nimmt die Masse des Thrombus ab, kommt es durch die anströmende Blutersatzflüssigkeit zu einer Kompression des Restthrombus. Eine Thrombolyse bzw. eine Abnahme des Thrombusvolumens führt also zu einer zunehmenden Verkürzung des Thrombus. Dadurch werden nacheinander die zuvor durch den Thrombus abgedeckten Löcher der Abflusskanäle freigelegt. Zuerst werden die Löcher des längsten Kanals freigelegt, danach die des zweitlängsten Kanals. Verkürzt sich der Thrombus weiter, öffnen sich immer mehr Abflusskanäle bis schließlich die zirkulierende Blutersatzflüssigkeit auch durch die abschließende Gazeplatte hindurchströmen kann. Je kleiner der Thrombus wird, desto größer wird also die Querschnittsfläche, über die die Blutersatzflüssigkeit am Thrombus vorbeifließen kann. Dadurch sinkt der hydrodynamische Widerstand des Thrombuskorbes. Die Widerstandsabnahme ist nach dem Ohm'schen Gesetz direkt proportional zur Abnahme der Druckdifferenz, die über dem Thrombuskorb anliegt. Diese Druckdifferenz lässt sich mit Hilfe

der beiden, vor und hinter dem Thrombuskorb angeschlossenen Drucksensoren zeitkontinuierlich erfassen.

Die komplexe Gestalt des Thrombuskorbes ermöglicht so die kontaktfreie und zeitkontinuierliche Messung der Thrombolyse in Form einer abnehmenden Druckdifferenz.

Das Prinzip der Thrombusfixierung lässt folgenden Vergleich mit den realen Gegebenheiten im zerebralen Blutgefäßsystem des Menschen zu: Kurz vor dem Schlauchstück, in dem sich der thrombusgefüllte Korb befindet, herrschen im Modell Druck- und Flussgeschwindigkeitswerte, wie sie im C1-Segment der A. carotis interna (ACI) zu finden sind. Das Schlauchstück mit dem Thrombuskorb entspricht einer A. cerebri media, die durch einen embolisierten Thrombus verschlossen wurde. Die stets offenen seitlichen Bypasskanäle des Thrombuskorbes finden ihr physiologisches Korrelat in den noch unverschlossenen hirnversorgenden Gefäßen des Circulus arteriosus willisii, wie der A. cerebri anterior oder dem Ramus communicans posterior, über die im Falle eines Verschlusses der A. cerebri media Blut abfließen kann. Durch die spezielle Zuführung des Plasmas und des Thrombolytikums direkt in das Innere des Thrombuskorbes wird der Umstand berücksichtigt, dass der Thrombus in vivo von Blut umgeben ist und das Thrombolytikum bei seiner intravenösen Applikation nicht nur von proximal, sondern auch über Kollateralen von distal an den Thrombus herangespült wird. Die Korbkonstruktion ermöglicht somit trotz der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit die Ausbildung eines physiologischen Mikromilieus innerhalb des Thrombuskorbes.

2.3.5 Auswertung der erfassten Druckdifferenz und Bestimmung der Lyserate

Bei der Auswertung der aufgezeichneten Druckdifferenz muß berücksichtigt werden, dass es auch bei unveränderten hydrodynamischen Rahmenbedingungen zu kleinen Abweichungen zwischen den Startwerten der gemessenen Druckdifferenz kommen kann, da der initiale Füllungszustand des Thrombuskorbes nie ganz identisch sein wird. Damit die Lyseraten unterschiedlicher Messungen trotzdem miteinander verglichen werden können, erfolgt in Analogie zur Bestimmung der relativen Gewichtsabnahme beim statischen Modell (Abschn. 2.2) die Normierung der Druckdifferenzen auf den Startwert. Dies geschieht durch Division der während eines Versuchs aufgezeichneten Zeitreihe durch ihren jeweiligen Startwert. Man erhält so eine dimensionslose Größe, die sogenannte „normierte Druckdifferenz“. Zu Beginn jeder Messung ergibt sich so zwangsläufig für alle Versuche der Wert 1. Mit zunehmender

Thrombolyse nimmt dann der Wert im Verlauf immer weiter ab. Der Wert Null wird jedoch selbst bei einer vollständigen Auflösung des Thrombus nicht erreicht, weil auch der leere Thrombuskorb einen messbaren hydrodynamischen Widerstand hat. Die exemplarische Aufzeichnung eines Thrombolyseversuchs mithilfe der normierten Druckdifferenz ist in der Abbildung 6 zu sehen.

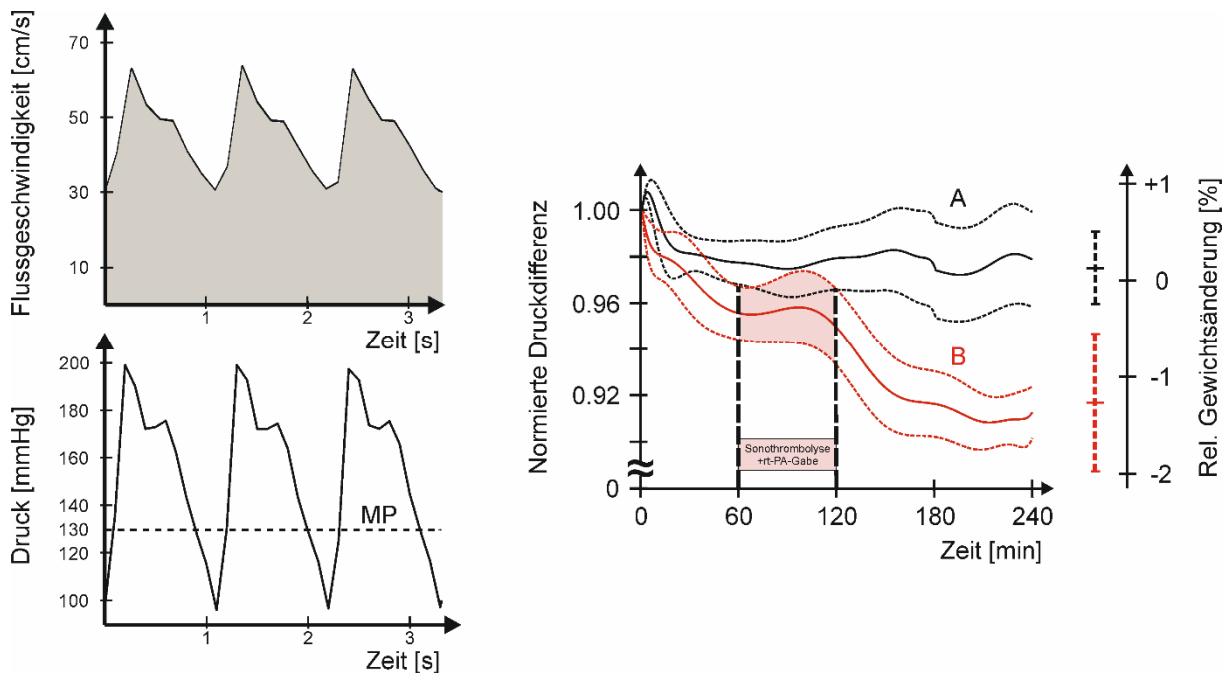


Abbildung 6: Sonothrombolyseversuch unter pulsatilen Strömungsbedingungen

Links sind die hydrodynamischen Rahmenbedingungen des Versuchs zu sehen. Es sind die Flussgeschwindigkeits- und Druckverhältnisse vor dem noch ungefüllten Thrombuskorb (MP = Mittelwert). Sie simulieren die Flussverhältnisse im C1-Segment der A. carotis interna eines Patienten mit arteriellen Hypertonus. Unter diesen Rahmenbedingungen wurde die Thrombolyse zweier Versuchsgruppen verglichen. In Gruppe A waren die Thromben lediglich der pulsatilen Strömung ausgesetzt. In Gruppe B erfolgte zusätzlich eine thrombolytische Behandlung mit transkraniallem, farbkodiertem Ultraschall (Gerät: SONOS 2500 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA); Sendefrequenz: 2 MHz; Leistungsdichte: 179 mW/cm²; Leistung: 100%; Wandfilter: 100 Hz; Aliasschwelle: 25 cm/s) und rt-PA (kontinuierliche Applikation mit 80 ml/h; Endkonzentration: 60 µg/ml). Die Thrombolyse in Gruppe B begann eine Stunde nach Versuchsstart und dauerte eine Stunde lang. Der Abstand zwischen Ultraschallwandler und Thrombus betrug 50 mm und entspricht damit der typischen Eindringtiefe des transkranialen Ultraschalls bei der Darstellung des M1-Segments der A. cerebri media. Das Sample volume des PW-Dopplers wurde in den Thrombus gelegt. Für beide Gruppen wurden jeweils fünf Einzelversuche durchgeführt, in denen die Druckdifferenz über dem Thrombuskorb gemessen wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (durchgezogene Linien) und Standardfehler (gestrichelte Linien) dargestellt. Verglichen mit Gruppe A lässt sich in Gruppe B nach der kombinierten Ultraschall- und rt-PA-Applikation eine Abnahme der normierten Druckdifferenz und eine Reduktion des relativen Thrombusgewichts feststellen. Die Abbildung wurde in modifizierter Form der zweiten Dissertationsschrift des Autors [151] entnommen.

Berechnungen haben gezeigt, dass die normierte Druckdifferenz auch bei erheblichen Flussgeschwindigkeitsunterschieden zum Vergleich von Lyseexperimenten herangezogen werden kann, sofern die auftretenden Lyseraten unter 27% liegen. Der Fehler wird dabei

immer kleiner als 3% sein. Der Fehler resultiert aus der nichtlinearen Beziehung zwischen der gemessenen Druckdifferenz und der eingestellten Flussgeschwindigkeit.

Eine Alternative zur normierten Druckdifferenz stellt die Verwendung der in Abbildung 7 dargestellten Kennlinien dar. Zur Vermeidung von Fehlern, die sich aus dem nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Druckdifferenz und der Flussgeschwindigkeit ergeben, sollten sie zur Anwendung kommen, wenn größere Lyseraten, die unter dem Einfluss stark abweichender Strömungsbedingungen aufgezeichnet wurden, miteinander verglichen werden sollen. Die Kennlinien ergeben sich aus unabhängigen Druckdifferenzmessungen, die für die unterschiedlichen Kombinationen aus Füllungszustand und Flussgeschwindigkeit am Thrombuskorb vorgenommen wurden.

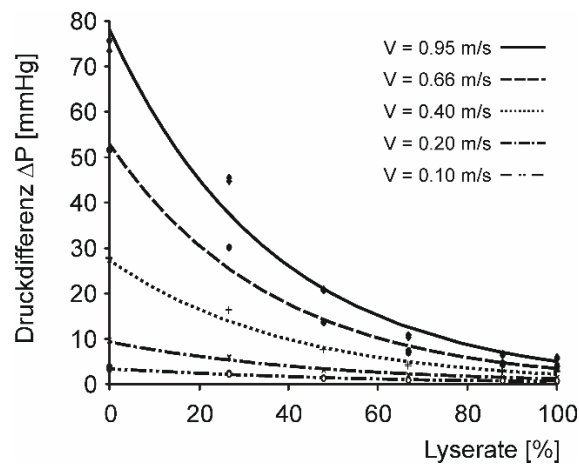


Abbildung 7: Kennlinien des Thrombuskorbes

Mit Hilfe der Kennlinien kann in Abhängigkeit der vorliegenden Flussgeschwindigkeit V für jede gemessene Druckdifferenz ΔP die entsprechende Lyserate ermittelt werden. Dadurch lassen sich auch die Druckdifferenzen, die unter verschiedenen Flussgeschwindigkeiten gemessen wurden, miteinander vergleichen. Die Abbildung wurde der zweiten Dissertationsschrift des Autors [151] entnommen.

Der Abbildung 7 lässt sich entnehmen, dass eine streng monotone Beziehung zwischen der Lyserate (bzw. dem Thrombusvolumen) und der zu messenden Druckdifferenz besteht. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass sich Füllungszustände unter 20%, insbesondere bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten, kaum noch unterscheiden lassen. Dafür besteht eine vergleichsweise hohe messtechnische Auflösung für geringe Lyseraten. Da aufgrund klinischer Erfahrungen eher mit einer inkompletten Auflösung des Thrombus im Zuge der Thrombolyse zu rechnen ist [153], stellt diese hydrodynamische Eigenschaft des Versuchszustandes einen Vorteil dar.

Limitierend für die Verwendung der Kennlinien ist, dass sie streng genommen nur für Versuche mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit verwendet werden dürfen. Im Falle pulsativer Flussgeschwindigkeiten, muss näherungsweise die mittlere Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung der Lyserate herangezogen werden. Zukünftig ließe sich aber mit Hilfe eines Algorithmus eine automatisierte Umrechnung der Druckdifferenz in die besser zu interpretierende Lyserate realisieren, so dass dann auch bei pulsatilen Flüssen zeitkontinuierliche Kurven der Lyserate erstellt werden könnten.

2.4 Das standardisierte Gerinnungsprotokoll

(Roessler FC et al. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2011, 22:407-415;

Roessler FC et al. *Journal of Neuroscience Methods* 2014, 237:26-32)

In diesem Abschnitt wird das Gerinnungsprotokoll vorgestellt, das als Grundlage für alle Thrombolyseexperimente dient, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Hinsichtlich des zu lysierenden Gerinnsels liegen damit innerhalb dieser Arbeit standardisierte Verhältnisse vor. Das Gerinnungsprotokoll sollte vier Anforderungen erfüllen:

- 1) Das Protokoll soll auf physiologischen Überlegungen beruhen.
- 2) Es soll eine ausreichend gute histologische Übereinstimmung zwischen den generierten Thromben und in vivo entstandenen Thromben bestehen.
- 3) Das entstehende Blutgerinnsel soll stabil genug sein, um physiologischen Strömungsverhältnissen standzuhalten. Nur solche Thromben können auch klinisch eine manifeste zerebrale Durchblutungsstörung verursachen.
- 4) Die erzeugten in vitro Thromben sollen auf eine rt-PA-Thrombolyse ausreichend gut ansprechen, damit später in den Thrombolyseversuche signifikante Effekte erkennbar werden können.

2.4.1 Physiologische Überlegungen

Aufgrund des Fahraeus–Lindqvist-Effekts enthält der am Gefäßendothel entlangfließende Teil des strömenden Blutes eine hohe Thrombozytenkonzentration. Im Falle eines Endothelschadens, kommt es zu einer sofortigen Anlagerung von Thrombozyten an das freiliegende subendotheliale Gewebe, insbesondere an Kollagen. Anstatt der verletzten

Gefäßwand können bei in vitro Versuchen auch körperfremde Oberflächen zu einer Anheftung der Thrombozyten führen. Die Adhäsion der Thrombozyten führt zu deren Aktivierung. Thrombozytenadhäsion und -aktivierung werden unter dem Begriff der primären Blutstillung zusammengefasst und bilden den zweiten Schritt der Hämostase. Der erste Schritt der Hämostase, die Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes, wird durch die Mediatoren Serotonin und Thromboxan-A₂ vermittelt, die aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden. Durch die aktivierten Thrombozyten wird Adenosindiphosphat freigesetzt, wodurch es zu einer weiteren Thrombozytenaggregation kommt. Es bildet sich ein Thrombozytenpfropf. Auch im 3. Schritt der Hämostase, der plasmatischen Gerinnung, spielen die aktivierten Thrombozyten eine zentrale Rolle, da sie sowohl über das extrinsische als auch über das intrinsische Gerinnungssystem die Aktivierung des Faktors X unterstützen und somit die gemeinsame Endstrecke der plasmatischen Gerinnungskaskade in Gang setzen, die sie darüber hinaus durch die Freisetzung verschiedener Gerinnungsfaktoren zusätzlich in Gang halten. Schließlich bildet sich ein Fibrinnetz, das an dem GPII/IIIa-Rezeptorkomplex der aktivierten Thrombozyten andockt und sich so zwischen den Thrombozyten aufspannen kann. Die Verbindung zwischen aktivierten Thrombozyten und einem widerstandsfähigen Fibrinnetz ist grundlegend für die Festigkeit des Blutgerinnsels. Durch die kontraktilen Proteine Actin und Myosin, die sich in den Thrombozyten befinden, findet dann noch eine Kontraktion und Retraktion des Blutgerinnsels statt. Das Ergebnis ist ein fester Fibrinthrombus.

Die Thrombozyten spielen also auf allen Ebenen der Hämostase eine zentrale Rolle und sind darüber hinaus unentbehrlich für die Stabilität des Thrombus in Strömungen mit hoher Schergeschwindigkeit [154]. Das zu erstellende Gerinnungsprotokoll soll dies berücksichtigen.

2.4.2 Thrombusherstellung

Der entscheidende Punkt des Gerinnungsmodells ist die Verwendung von plättchenreichem Plasma (PRP) anstelle von Vollblut. Auf diese Weise soll der zentralen Bedeutung und der hohen Konzentration der Thrombozyten in arteriell entstandenen Blutgerinnseln Rechnung getragen werden. Die Anreicherung von Thrombozyten soll den Fahraeus–Lindqvist-Effekt des strömenden Blutes widerspiegeln.

Gesunden Personen, die im Verlauf der letzten zwei Wochen keine blutgerinnungshemmenden Substanzen eingenommen und die gleiche Blutgruppe hatten, wurden nach

Unterzeichnung einer entsprechenden Einverständniserklärung jeweils 8 - 10 ml venöses Blut entnommen. Die Blutabnahme war zuvor durch die Ethikkommission genehmigt worden. Das venöse Vollblut wurde in Citratröhrchen gesammelt (S-Monovette, REF 02.1067.001; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und anschließend gepoolt, um interindividuelle Unterschiede bezüglich der Gerinnungseigenschaften sowie der Zusammensetzung des Blutes zu vermeiden. Nach zehnminütiger Zentrifugation des Citratbluts bei 180 g (Multifuge® 1S-R; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) wurde PRP durch Aspiration des Überstandes gewonnen. Um einen gewissen Erythrozytenanteil innerhalb des Thrombus zu gewährleisten, wurde das PRP mit der Grenzschicht vermischt, die sich zwischen dem Überstand und der Erythrozytenschicht gebildet hatte. Außerdem wurde der Mischung plättchenfreies Plasma (PFP) hinzugefügt, das mittels Aspiration des Überstands einer zehnminütigen Zentrifugation von Citratblut bei 2570 g (EBA 8s; Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland) gewonnen wurde. Da die optimale Zusammensetzung des Gerinnungsgemisches hinsichtlich des histologischen Erscheinungsbildes, der Thrombusstabilität und Lysierbarkeit nicht bekannt war, wurden sechs unterschiedliche Mischungsverhältnisse in Reagenzröhrchen (REF 55.468.001, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) hergestellt, um sie später anhand der oben genannten Kriterien (vgl. S. 37) miteinander vergleichen zu können.

Das Gesamtvolumen lag stets bei 4.0 ml und auch der Anteil der Grenzschicht wurde mit 0.5 ml konstant gehalten. Verändert wurde lediglich der PFP-Anteil, so dass sich folgende PRP/PFP-Mischungsverhältnisse ergaben: 3.5/0.0, 3.0/0.5, 2.5/1.0, 2.0/1.5, 1.5/2.0 und 1.0/2.5. Das Blutzellbild wurde mit einem herkömmlichen Analysegerät kontrolliert (KX-21; Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Bei relativ stabilen Werten für die Erythrozyten, den Hämatokrit und die Leukozyten, wurde auf diese Weise die Thrombozytenkonzentration stufenweise reduziert. Der Vergleich mit dem ursprünglichen Blutgemisch der Spender zeigte eine deutliche Abnahme der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen im Gegensatz zur Thrombozytenzahl. Durch diese Umverteilung der Blutzellkonzentrationen soll im statischen Gerinnungsprozess die hohe Thrombozytendichte am Ort der Thrombusentstehung simuliert werden, die im physiologisch strömenden Blut durch den Fahraeus–Lindqvist-Effekt hervorgerufen wird.

Anschließend wurde die Gerinnung durch eine Rekalzifizierung des Gemischs durch Zugabe von 0.64 ml einer 0.1 molaren CaCl₂-Lösung (CaCl₂-Endkonzentration: 13.8 mmol/l) in sterilen Plastikröhrchen (REF 55.468.001; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgelöst. Schließlich

erfolgt eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Auf diese Weise entstanden Thromben mit einem Durchmesser von rund 4 - 5 mm und einem Gewicht von 250 ± 150 mg. Die Schwankungsbreite des Gewichts ist in erster Linie auf die unterschiedliche Länge der Thromben zurückzuführen.

Die Blutgerinnsel wurden dann über Nacht bei 37 °C in Ringer-Lösung (Ringer-Lösung, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Deutschland) aufbewahrt, um eine vollständige Retraktion zu gewährleisten und eine vermehrte autolytische Zersetzung im Verlauf der bevorstehenden Experimente zu verhindern.

2.4.3 Histologische Beurteilung

Jeweils zehn der sechs unterschiedlichen PRP-Thrombustypen wurden über eine Dauer von 24 Stunden in 4%igem Formaldehyd fixiert, bevor sie in Paraffin eingebettet und von einem Histopathologen untersucht wurden.

Es wurden dazu Hämatoxylin–Eosin- (HE), Ladewig- und immunhistochemische CD61-Färbungen (ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Zur Beurteilung diente ein Axioskop 40 mit einem Plan Neofluar Objektiv und Hellfeld-Kondensator (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg, Deutschland).

Es erfolgte ein verblindeter histologischer Vergleich zwischen den sechs Thrombustypen, Thromben aus spontaneronnenem Vollblut und thrombotischen Emboli, die mittels Thrombektomie aus der A. cerebri media von Schlaganfallpatienten entfernt worden waren (Abb. 8). Den Interventionen war dabei stets eine systemische Thrombolyse mit rt-PA (Actilyse®) in einer Dosierung von 0.9 mg/kgKG vorausgegangen.

Die in vivo entstandenen Thromben zeichneten sich durch ein solides Fibrinnetz mit darin enthaltenen zerfallenen und intakten Erythrozyten und reichlich Thrombozyten aus. Im Gegensatz dazu, bestanden die spontaneronnenen Vollblutthromben fast ausschließlich aus sedimentierten Erythrozyten.

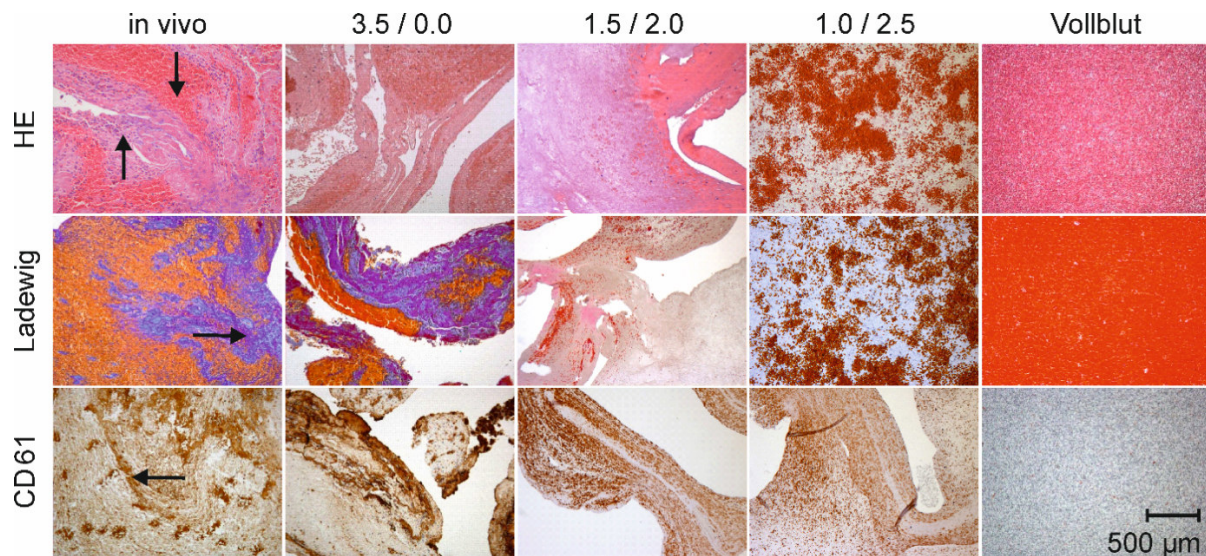


Abbildung 8: Histologischer Vergleich der unterschiedlichen Thromben

Dargestellt sind histologische Proben (100fache Vergrößerung) der unterschiedlichen Thromben in Hämatoxylin-Eosin- (HE), Ladewig- und immunhistochemischer (CD61) Färbung. Von links nach rechts: Thrombotischer Embolus, der mittels Thrombektomie aus der A. cerebri media eines Schlaganfallpatienten geborgen wurde. In vitro Thromben, die nach dem hier beschriebenen Gerinnungsprotokoll mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmen Plasma (PFP) generiert wurden. Spontan geronnener Vollblutthrombus. Fibrinnetz (→); Fibrinnetz mit eingelagerten Proteinen und Leukozyten sowie fragmentierten Erythrozyten (↑); CD61-markierte Thrombozyten (←); sedimentierte Erythrozyten (↓).

Das Fibrinnetz war allenfalls spärlich ausgebildet. Thrombozyten fanden sich nur vereinzelt und zusammenhangslos verstreut. Die Ähnlichkeit zwischen den plättchenreichen Thromben des vorgestellten Gerinnungsmodells und den in vivo Thromben war für hohe PRP-Anteile dagegen auffallend gut, nahm dann aber mit zunehmendem Anteil des PFP ab.

2.4.4 Untersuchung der Thrombusstabilität

Jeweils drei der sechs unterschiedlichen PRP-Thrombustypen und der spontangeronnenen Vollblutthromben wurden in dem dynamischen Flussmodell (Abschn. 2.3) einer pulsatilen Strömung ausgesetzt, die den hydrodynamischen Verhältnissen im C1-Segment der A. carotis interna eines Patienten mit arteriellen Hypertonus entsprechen (Abb. 6).

Vier Stunden lang wurde die normierte Druckdifferenz über den thrombusgefüllten Korb gemessen. Sie dient als Maß für den hydrodynamischen Strömungswiderstand des Thrombus. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse zu sehen.

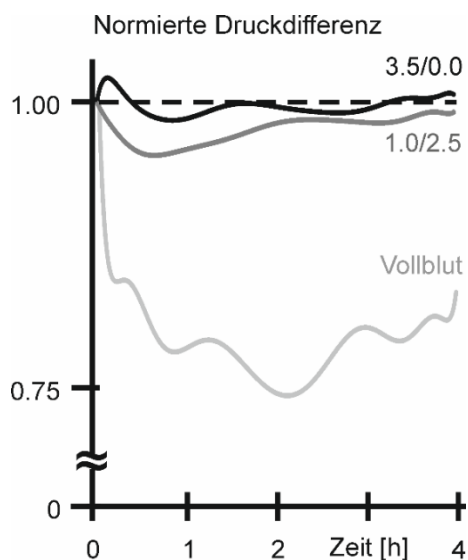


Abbildung 9: Ergebnis der Stabilitätstestung

In dem dynamischen Flussmodell wurde vier Stunden lang die normierte Druckdifferenz unterschiedlicher Thromben zeitkontinuierlich aufgezeichnet. Dargestellt sind die Ergebnisse für in vitro hergestellte PRP-Thromben mit den PRP/PFP-Verhältnissen 3.5/1.0 bzw. 1.0/2.5 sowie für einen spontan geronnenen Vollblutthrombus. Die Ergebnisse der Thromben mit den Mischungsverhältnissen 3.0/0.5, 2.5/1.0, 2.0/1.5 und 1.5/2.0 sind zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Sie lagen erwartungsgemäß überwiegend zwischen den Kurven der beiden anderen PRP-Thrombustypen. Die hämodynamischen Rahmenbedingungen lassen sich der Abbildung 6 entnehmen.

Im Gegensatz zu den PRP-Thromben lösen sich die Vollblutthromben relativ schnell auf.

Die Ursache dafür lässt sich aus den histologischen Untersuchungen ableiten: Den spontaneronnenen Vollblutthromben fehlt das stabilisierende Fibringerüst. Es ist daher anzunehmen, dass solche Thromben zu keinem dauerhaften Gefäßverschluss führen können.

2.4.5 Bestimmung der Thrombolyserate

Zur Bestimmung der Thrombolyserate wurde das in Abschnitt 2.2 vorgestellte statische Modell genutzt. Für die sechs unterschiedlichen PRP-Thrombustypen wurde der relative Gewichtsverlust ermittelt nachdem jeweils zehn von ihnen zwei Stunden lang in reinem Plasma bei 37 °C und einem pH-Wert von 7.4 inkubiert wurden. Die Gewinnung des Plasmas entspricht dem in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Vorgehen zur Herstellung des plättchenfreien Plasmas.

Jeweils weitere zehn Stück der sechs PRP-Thrombustypen wurden unter den gleichen Bedingungen zusätzlich mit rt-PA in einer Konzentration von 60 kU/ml behandelt. Auf diese Weise ließ sich der thrombolytische Effekt des rt-PAs von der spontanen Lyserate differenzieren.

Zur statistischen Auswertung wurden eine Varianzanalyse (ANOVA) sowie ein post-hoc-t-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Faktoren CLOTTYPE (Thromben mit unterschiedlichen PRP/PFP-Verhältnissen) und TREATMENT (spontane versus rt-PA-induzierte

Lyse) zu ermitteln. Dazu wurde das Statistikprogramm SPSS genutzt (Statistical Product and Service Solutions, Version 21.0.1; IBM, New York, USA).

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 10 zu sehen. Sowohl die spontane als auch die rt-PA-induzierte Lyserate steigt erwartungsgemäß mit abnehmendem PRP-Anteil an. Mit zunehmendem PFP-Anteil, d.h. mit abnehmender Thrombozytenkonzentration, werden die Thromben gemäß der in Abschnitt 2.4.1 angestellten physiologischen Überlegungen zunehmend weicher und instabiler. Die zweifaktorielle ANOVA offenbarte signifikante Haupteffekte für die Faktoren CLOTTYPE [$F(5,108) = 36.9, p < 0.001$] und TREATMENT [$F(1,108) = 76.7, p < 0.001$] sowie eine Interaktion zwischen beiden Faktoren [$F(5,108) = 7.3, p < 0.001$]. Der post-hoc-t-Test lieferte signifikante Unterschiede zwischen der rt-PA-induzierten Lyse und der Spontanlyse für PRP/PFP-Verhältnisse kleiner als 2.0/1.5 ($p < 0.005$). Damit eignen sich für zukünftige Thrombolyseversuche nur PRP-Thromben mit einem Mischungsverhältnis von 1.5/2.0 oder 1.0/2.5, da nur unter diesen Voraussetzungen der tatsächliche enzymatische Effekt des rt-PAs von der spontanen Lyse abzugrenzen ist.

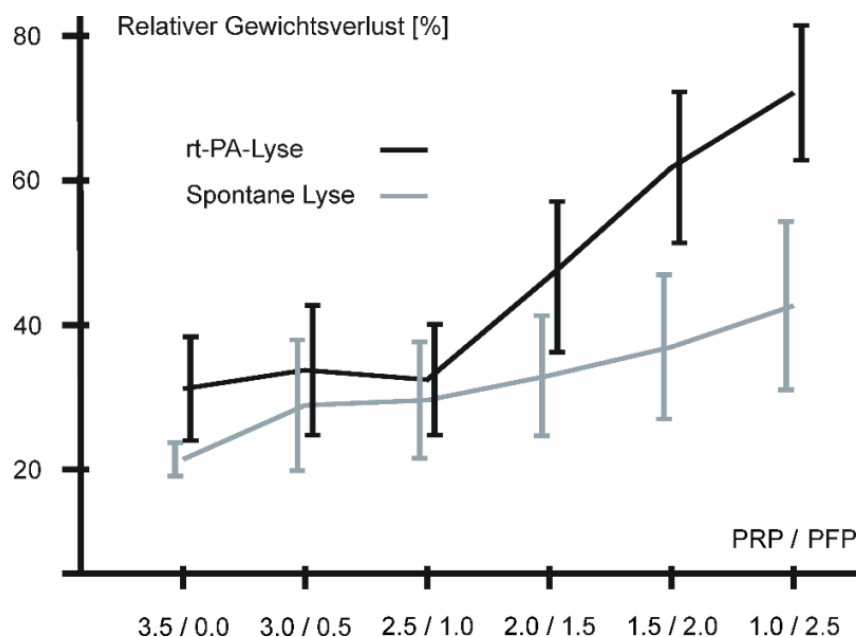


Abbildung 10: Ergebnis der Lyseversuche

Dargestellt ist der relative Gewichtsverluste nach zwei Stunden als Maß für die Lysierbarkeit der in vitro erzeugten PRP-Thromben in Abhängigkeit von deren PRP/PFP-Mischungsverhältnis. Grau dargestellt ist die spontane Lyserate, die sich nach einer Aufbewahrung der Thromben in reinem Plasma bei 37 °C und einem pH-Wert von 7.4 ergab. In Schwarz ist die Lyserate abgebildet, die unter den gleichen Bedingungen und dem Zusatz von rt-PA (60 kU/ml) bestimmt wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (für jede Gruppe: n=10).

2.4.6 Auswahl des geeigneten Gerinnungsprotokolls

Unter Berücksichtigung aller Bewertungskriterien (Abb. 11) wurde schließlich der PRP-Thrombus mit dem PRP/PFP-Mischungsverhältnis 1.5/2.0 ausgewählt.

PRP / PFP	3.5 / 0.0	3.0 / 0.5	2.5 / 1.0	2.0 / 1.5	1.5 / 2.0	1.0 / 2.5
Stabilität	+	+	+	+	+	0
Histologie	+	+	+	0	0	-
Lysierbarkeit	-	-	-	0	+	+

Abbildung 11: Übersicht der Auswahlkriterien

Die qualitative Bewertung der Auswahlkriterien erfolgte mit „gut“ (+), „ausreichend“ (0) und „schlecht“ (-). Unter physiologischen Flussbedingungen zeigten alle PRP-Thrombustypen eine gute oder ausreichende Stabilität. Das histologische Erscheinungsbild wies nur bei höheren PRP-Anteilen die erforderliche Ähnlichkeit mit den in vivo entstandenen Thromben auf. Brauchbare Lyseraten fanden sich dagegen nur bei Thromben mit einem geringeren PRP-Anteil. Die Thromben mit dem PRP/PFP-Mischungsverhältnis 1.5/2.0 scheinen somit am geeignetsten für die zukünftigen Thrombolyseexperimente zu sein.

Nur dieses Gerinnungsprotokoll gewährleistet eine zufriedenstellende Kombination aus Stabilität, Lysierbarkeit und histologischer Ähnlichkeit in Bezug auf in vivo entstandene Thromben. Daher wird dieses Gerinnungsmodell für alle folgenden Experimente genutzt.

2.5 Diskussion

Für die systematische Untersuchung der Wirkungsweise und Effizienz neuer Thrombolysestrategien sind Modelle von großem Nutzen, da sie Versuche unter definierten Rahmenbedingungen ermöglichen. Physiologische Systeme lassen sich allerdings niemals vollständig und exakt modellieren. Das gilt auch für die beiden hier vorgestellten Modelle und das standardisierte Gerinnungsprotokoll.

Die Thrombolysemodelle

Beide Modelle berücksichtigen weder die Interaktion zwischen Thrombus und Gefäßwand noch die wechselseitige Beeinflussung zwischen Gerinnung, Fibrinolyse und entzündlichen Prozessen. Über diese komplizierten Interaktionen ist noch wenig bekannt [155]. Vermutlich

aktiviert ein plötzlicher Gefäßverschluss, vor allem in der Kernzone der Ischämie, eine Entzündungskaskade, bei dem das Komplementsystem, Thrombozyten und Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen [156]. Es ist anzunehmen, dass sich diese Immunantwort über einen Zeitraum von Wochen erstreckt [157] und daher im Rahmen der hier durchgeführten Versuche, bei denen es um die Akutbehandlung von Schlaganfällen geht, vernachlässigt werden kann.

Verglichen mit dem menschlichen Schädel führen das gewählte Material und deren räumliche Anordnung in den Modellen zu veränderten Schallabschwächungen, so dass die Wirksamkeit des Ultraschalls im Versuch nicht genau die klinischen Verhältnisse widerspiegelt. Eine ausführliche Betrachtung findet sich dazu im Abschnitt 3.1.

Im statischen Modell werden die pulsatile Strömungsbedingungen am Ort des Gefäßverschlusses nicht berücksichtigt. Auch erfolgt die Bestimmung der Thrombolysedosis über eine Gewichtsmessung, was zu einer Unterbrechung der enzymatischen Prozesse und zu einer mechanischen Beeinflussung des Thrombus während seiner Überführung aus dem Versuchsstand in das Messvolumen führt. Dafür ermöglicht der sehr einfache Versuchsaufbau gut reproduzierbare Messungen und eignet sich daher zur Beantwortung einfacher Fragestellungen oder Dosisfindungsexperimente.

In Zusammenhang mit den generierten Thromben ist zu erwähnen, dass ihr Ausgangsgewicht vornehmlich aufgrund unterschiedlicher Längen schwankte (Abschn. 2.4.2). Schwerere Thromben hatten somit auch eine größere Oberfläche, was im Zuge unserer Experimente durch die vergrößerte Kontaktfläche des Thrombolytikums zu einer gesteigerten Lyserate schwerer Thromben führte. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurden die Lyseraten als relative Gewichtsverlust angegeben.

Im dynamischen Modell konnte das komplexe Gerinnungssystem des Blutes nicht berücksichtigt werden, da die gerinnungsinduzierenden Kontaktflächen des Modells den Einsatz von humanem Vollblut als zirkulierende Flüssigkeit nicht zulassen [158]. Die Verwendung von antikoaguliertem Blut kam ebenfalls nicht in Frage, weil man dadurch das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem zu stark verändert hätte [159]. Es wurde daher eine Blutersatzlösung verwendet, wobei der Thrombus, durch die direkte Applikation von Plasma in den Korb, allerdings permanent von einem Plasmafilm umgeben war. Dieses Mikromilieu sollte eine physiologische Wechselwirkung zwischen dem Thrombus und den Substraten des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems ermöglichen. Im statischen Modell befanden sich die zu

lysierenden Thromben dagegen in mit Plasma gefüllten Mikroreaktionsgefäßen, so dass hier alle erforderlichen Faktoren der Gerinnung und Fibrinolyse vorhanden waren.

Das Gerinnungsmodell

Kein Gerinnungsprotoll, das in vitro durchgeführt wird, kann den natürlichen Prozess der Blutgerinnung vollständig wiedergeben. Auch lässt sich durch ein einziges Gerinnungsprotokoll niemals das heterogene Spektrum der im Körper entstandenen Blutgerinnsel abbilden. Es lässt sich lediglich ein Standardthrombus generieren, der dafür aber die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Thrombolyseversuche gewährleistet. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurde ein PRP-Thrombus als Standard ausgewählt. Aufgrund seines dichten Fibrinnetzes und seiner hohen Thrombozytenkonzentration, die dem Fahraeus-Lindqvist-Effekt bei der Entstehung eines Gerinnsels in einem arteriellen Blutgefäß Rechnung tragen soll, ließ sich eine gute Übereinstimmung mit in vivo Thromben feststellen, die mittels interventioneller Verfahren aus intrakraniellen Gefäßen von Patienten mit einem akuten Schlaganfall geborgen wurden. Diese in vivo Thromben hielten vor ihrer mechanischen Extraktion einer systemischen Lyse stand und scheinen somit stabiler zu sein, als andere schlaganfallinduzierenden Gerinnsel. Der hier verwendete PRP-Standardthrombus stellt also aufgrund seiner histologischen Struktur und biochemischen Zusammensetzung einen eher schwer zu lysierenden Thrombus dar. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt [160].

Dieser Umstand ist von Vorteil, da es bei unseren Untersuchungen darum geht, individuelle Therapieverfahren für Fälle zu finden, in denen sich ein Thrombus nicht mit der herkömmlichen rt-PA-Lyse suffizient behandeln lässt.

Abschließend muss betont werden, dass die Kriterien, die bei der Auswahl des Standardthrombus herangezogen wurden, keine quantitativen Bezugspunkte aufweisen und dass sich alle hier gewonnenen Ergebnisse nur auf diese speziellen PRP-Thromben beziehen.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung von Thrombolysemodellen beschrieben, die unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen standardisierte oder zumindest gut vergleichbare Untersuchungen ermöglichen, bei denen die Versuchsparameter definiert

verändert werden können. Fragestellungen hinsichtlich der Wirkungsweise sowie der Effizienz alternativer Thrombolysestrategien lassen sich so gezielt untersuchen, sofern sie auf die Möglichkeiten des Modells abgestimmt sind.

Das statische Modell eignet sich insbesondere für Dosisfindungsmessungen, die für den Betrieb des dynamischen Modells erforderlich sind.

Mit dem dynamischen Flussmodell sind hochauflösende und zeitkontinuierliche Messungen unter physiologischen Druck- und Flussverhältnissen möglich, ohne den Versuchsablauf oder den Prozess der Thrombolyse zu stören. In Analogie zu verengten oder verschlossenen Blutgefäßen ist die Hydrodynamik im Bereich des Thrombuskorbes weitgehend nichtlinear. Trotzdem gestattet die Datennachverarbeitung auch den Vergleich zwischen Versuchen, die unter verschiedenen hydrodynamischen Bedingungen durchgeführt werden. Dadurch entsteht ein hohes Maß an Flexibilität hinsichtlich der Versuchsplanung. Aufgrund seiner speziellen Form hat der Thrombuskorb einen geringen Eigenwiderstand und ermöglicht eine gute Differenzierung niedriger Lyseraten, was allerdings durch eine schlechte Auflösung subtotaler Lyseraten erkauft wird. Weiterhin gewährleistet der Korb die adäquate Applikation von Ultraschallwellen und thrombolytischen Substanzen. Das dynamische Modell erlaubt eine direkte Aussage über die Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes, da das Prinzip des Modells auf der Bestimmung des Flusswiderstands des Thrombus beruht. Sofern die Beschallung des Thrombus duplexsonographisch erfolgt, kann diese Aussage zusätzlich mit dem TIBI-Score [152] korreliert werden. Die Messparameter lassen sich also gut auf die klinische Routine übertragen. Allerdings ist die Risikobewertung neuer Therapieansätze mit keinem der beiden Modelle möglich. Nach Auswahl der effizientesten Therapieverfahren müssten daher die Risiken im Rahmen klinischer Studien noch einmal untersucht werden.

Das entwickelte Gerinnungsverfahren produziert plättchenreiche Thromben mit einem starken Fibrinnetz. Die Thromben sind deshalb in der Lage, physiologischen Druck- und Flussverhältnissen standzuhalten. Gleichzeitig zeigen sie eine hohe histologische Übereinstimmung mit in vivo entstandenen Thromben und eine suffiziente Lysierbarkeit. Sie erscheinen für die Untersuchung individueller Therapieverfahren insbesondere an rt-PA-resistenten Thromben geeignet. Daher sollte dieses einfache, gut reproduzierbare und physiologisch sinnvolle Gerinnungsprotokoll als Standardverfahren für solche Untersuchungen verwendet werden, um deren Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können.

3 Untersuchung verschiedener Thrombolysezenarien

Aktuell stellt die Behandlung mit gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rt-PA; Actilyse®) die medikamentöse Standardtherapie der akuten zerebralen Ischämien dar. Mit den Medikamenten Desmodus rotundus Salivary Plasminogen Activator (DSPA; Desmoteplase®) und Tenecteplase (TNK, Metalyse®) stehen jedoch sinnvolle Alternativen in Bezug auf die Wirksamkeit und Sicherheit der Therapie zur Verfügung. Des Weiteren verspricht die zusätzliche Applikation von transkraniell Ultraschall die Effektivität systemischer Thrombolytika zu verbessern.

Gegenstand des vorliegenden Kapitels sind daher Untersuchungen, die die Wirksamkeit solcher alternativen Thrombolyseverfahren mit dem bislang verwendeten Goldstandard vergleichen. Darüber hinaus wird der Einfluss der Acetylsalicylsäure (ASS) auf verschiedene Thrombolysestrategien untersucht.

Bei den hier vorgestellten in vitro Experimenten wird immer das in Abschnitt 2.2 vorgestellte statische Modell sowie das entwickelte standardisierte Gerinnungsprotokoll aus Abschnitt 2.4 verwendet.

3.1 Der Einsatz des Ultraschalls

Im Falle einer Anwendung von Ultraschall wurde stets dasselbe Gerät mit den gleichen Einstellungen verwendet. Mit dem SONOS2500 (Hewlett-Packard, Andover, MA, USA) wurde eine kontinuierliche Beschallung mit gepulsten Ultraschall appliziert. Das Gerät wurde dabei im transkraniellen und farbkodierten Modus (transcranial color-coded mode; TCCS) betrieben. Die -6 dB-Bandbreite des Phased-Array-Ultraschallwandlers (21202A, Hewlett-Packard, Andover, MA01810, USA) betrug 2.0 bis 2.5 MHz. Im zeitlichen Mittel lag die räumliche Spitzenintensität (spatial-peak temporal-average intensity; I_{SPTA}) bei 0,179 W/cm². Die Sendeleistung wurde auf 100%, die Aliasschwelle auf 0.25 m/s und der Wandfilter auf 100 Hz eingestellt. Der mechanische Index (MI onscreen) betrug 0.6.

Damit wurde eine Form der Ultraschallapplikation gewählt, die für gewöhnlich in der klinischen Diagnostik bei der Darstellung intrakranieller Gefäße zur Anwendung kommt.

Während der Beschallung befanden sich die Thromben in Eppendorf™ Mikroreaktionsgefäßen (REF 72.690.001, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), die mit gepuffertem Plasma (pH 7.4)

gefüllt waren und sich in einem 37 °C warmen und entgasten Wasserbad befanden. Der Ultraschallkopf wurde so in das Wasserbad eingetaucht, dass der Abstand zwischen der Schallwandleroberfläche und dem senkrecht darunter befindlichen Thrombus 50 mm betrug, um die Situation einer Beschallung der A. cerebri media eines Patienten zu simulieren. Der Thrombus befand sich innerhalb des Probenvolumens des Ultraschalls, um eine maximale Energieübertragung zu gewährleisten. Die Torlänge des sample volumes wurde auf 0.29 cm eingestellt.

Um die klinische Beschallung eines Thrombus im M1-Segment der A. cerebri media eines Patienten simulieren zu können, sollte die Dämpfung des eingestrahlten Ultraschalls in der richtigen Größenordnung liegen. Um dies zu überprüfen, wurde in dem dynamischen Flussmodell anstelle des Thrombus ein Hydrophon (hergestellt vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, Deutschland) mit einer Mittenfrequenz von 2 MHz und einer Bandbreite von 100% (1 - 3 MHz) in den Hohlraum des in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Thrombuskorbes eingeführt. Der Thrombuskorb selbst befand sich entsprechend dem in Abbildung 3 vorgestellten Versuchsaufbau innerhalb eines Schlauchstücks, das in einem Becken mit entgastem Wasser platziert wurde. Der Abstand zwischen Ultraschallwandler und Hydrophon betrug 50 mm. Unter diesen Bedingungen wurde innerhalb des Thrombuskorbes die Ultraschallintensität I_1 mit dem Hydrophon gemessen und mit Hilfe eines Oszilloskops (HP 54520A, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) angezeigt. Zur Bestimmung des Referenzwertes I_0 wurde der Ultraschall auf das frei im Wasserbad befindliche Hydrophon gerichtet. Der Abstand betrug auch hier 50 mm. Beide Werte wurden fünfmal gemessen und die Dämpfung A nach der folgenden Vorschrift berechnet:

$$A = 10 \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right)$$

Es ergab sich ein Wert von 7.3 ± 0.7 dB, was hinsichtlich der Größenordnung sehr gut mit Literaturwerten übereinstimmt: Laut Aaslid liegt die Dämpfung von 2 MHz-Ultraschallwellen bei ihrem Durchtritt durch den menschlichen Schädel bei 7.0 dB [161]. Pfaffenberger et al. bestimmten die Dämpfung von diagnostischen Ultraschallwellen mit einer Sendefrequenz von 1.8 MHz (Sonos 4500, Philips, Hamburg, Deutschland) für unterschiedlich dicke Schädelkalotten und fanden dabei Werte von 8.8 bis 21.2 dB [141]. Da die Versuche mit unterschiedlichen Ultraschallwandlern durchgeführt wurden, ist allerdings ein direkter Vergleich nicht möglich. Aus den vorliegenden Literaturwerten kann daher nur geschlossen

werden, dass die Dämpfung des Ultraschalls in dem dynamischen Flussmodell in einem plausiblen und physiologischen Bereich liegt. Für entsprechende Messungen am statischen Modell standen die erforderlichen technischen Voraussetzungen nicht mehr zur Verfügung. Im statischen Modell wird jedoch der Thrombus von weniger schalldichtem und zudem dünnerem Material umgeben. Die Dämpfung des Ultraschalls ist also im statischen Modell sicherlich geringer. Die Einwirkung des Ultraschalls wird daher im statischen Modell eher überschätzt.

3.2 Die Durchführung der Dosisfindungsexperimente

Um im Rahmen dieser Arbeit die Wirksamkeit der Thrombolytika miteinander vergleichen zu können, muss sichergestellt sein, dass sie auch ihre maximale Wirksamkeit entfalten können. Es darf daher zu keiner Unterdosierung kommen. Aus diesem Grund wurden Dosisfindungsexperimente für die einzelnen Thrombolytika vorgenommen.

Dazu wurden die Thromben im statischen Modell in gepuffertem Plasma (pH 7.4) schrittweise steigenden Konzentrationen der einzelnen Thrombolytika ausgesetzt. Für jeweils zehn Thromben wurde dann der relative Gewichtsverlust als Maß für die Thrombolyse (Abschn. 2.2) nach einer und nach zwei Stunden bestimmt.

3.3 Die Bestimmung der Fibrinfaserdichte

Um die thrombolytischen Veränderungen am Fibrinnetz elektronenmikroskopisch darzustellen, wurden Thromben nach dem bereits in den Abschnitten 2.4.2 und 2.4.6 beschriebenen standardisierten Gerinnungsprotokoll hergestellt. Da die Erythrozyten aufgrund ihrer Anzahl und Größe das Fibrinnetz verdecken würden, wurde bei der Herstellung dieser Thromben die erythrozytenreiche Grenzschicht nicht hinzugegeben. Nach der jeweiligen thrombolytischen Behandlung erfolgte die Fixierung der Thromben in einer Mischung aus 1.5% Glutaraldehyd und 1.5% Formalin in einem 0.15 molaren HEPES-Puffer. Anschließend wurden sie in eine 20%ige Saccharose-Lösung überführt, um Gefrierartefakte beim darauffolgenden Einfrieren ($T = -26\text{ °C}$) zu vermeiden. Die gefrorenen Proben wurden über Trockeneis aufgebrochen bzw. in kleinere Bruchstücke zerlegt. Die gewonnenen Bruchstücke wurden in einer 1%igen Osmiumtetroxid-Aqua-bidest.-Lösung nachfixiert, mit

halbgesättigtem wässrigem Uranylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) kontrastiert und mit zunehmend höheren Ethanol-Konzentrationen dehydriert sowie schließlich in Eponharz (Agar 100, Agar Scientific Ltd., Stansted, UK) eingebettet. Mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden ultradünne Schnitte angefertigt, die dann in einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 902, Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) untersucht wurden.

Die Bestimmung der Fibrinfaserdichte wurde an jeweils einem repräsentativen 5 x 5 µm großen Ausschnitt der einzelnen TEM-Präparate vorgenommen. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche mit einer digitalen Slow-Scan-2K-CCD-Kamera (TRS, Tröndle, Moorenweis, Deutschland) aufgenommen. Anschließend wurden die Kontraste der Bilder zur besseren Vergleichbarkeit mit einer kommerziellen Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photoshop CS6 Extended) nachbearbeitet, indem die Helligkeitsverteilung normiert wurde (Mittelwert: 1.0; Tonwertumfang: 0 – 255). In den korrigierten Bildern wurden dann die Fibrinfasern automatisch durch eine Software (ImageJ, Java V.1.8.0_77) erfasst und die Fibrinfaserdicht aus dem Verhältnis zwischen der mit Fibrinfasern bedeckten Fläche und der Gesamtfläche des Bildes berechnet.

3.4 Die thrombolytische Wirksamkeit von Desmoteplase

(Roessler FC et al. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2015, 41:3233-3240)

3.4.1 Hintergrund und Fragestellung

Während rt-PA trotz seiner Limitationen (vgl. S. 9 ff.) weiterhin den medikamentösen Goldstandard bei der Behandlung zerebraler Ischämien darstellt, versprechen die besonderen Eigenschaften des DSPA (vgl. S. 10 ff.) einen sicheren und gleichzeitig effizienteren Einsatz in einem erweiterten Behandlungszeitfenster von 3 – 9 Stunden. Der zusätzlichen Anwendung von Ultraschall wird eine unterstützende Wirkung bei der Wiedereröffnung thrombotischer Hirngefäße zugesprochen. Ziel der in diesem Abschnitt vorgestellten Untersuchungen war es daher, die zu vermutende Überlegenheit des DSPA insbesondere auch in Kombination mit der Sonothrombolyse gegenüber der Standardtherapie mit rt-PA zu überprüfen.

3.4.2 Methoden und Ergebnisse

Zunächst wurde über ein Dosisfindungsexperiment (Abschn. 3.2) die Konzentration für DSPA bestimmt, ab der sich die thrombolytische Wirkung des Medikaments nicht mehr steigern ließ. Im Rahmen ein- bzw. zweistündiger Lyseversuche wurden dazu jeweils zehn Thromben zunehmend höheren DSPA-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 10,0 µg/ml ausgesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 graphisch aufgetragen.

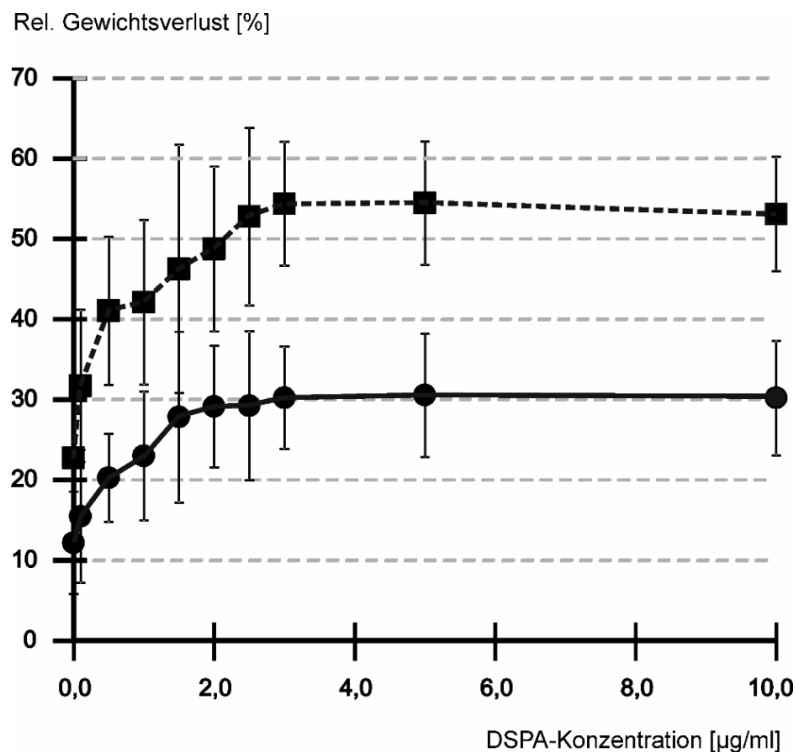


Abbildung 12: Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für Desmotenplase (DSPA)

Nach einer Stunde (Punkte) und nach zwei Stunden (Quadrate) trat für die Thrombolyse eine Sättigung ab einer Konzentration von 2,0 µg/ml bzw. von 3,0 µg/ml auf. Die Messergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung abgebildet (für jeden Messpunkt: n=10).

Nach der einstündigen Behandlung trat der Sättigungseffekt bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml ein, wobei der maximale relative Gewichtsverlust der Thromben bei 30% lag. Nach der zweistündigen Lyse ergab sich ein Sättigungswert von 3,0 µg/ml. Hier betrug der maximale relative Gewichtsverlust 54%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die DSPA-Konzentration für alle zukünftigen Versuche im statischen Modell auf 2,0 µg/ml festgelegt.

Zum Vergleich der thrombolytischen Wirksamkeiten von Desmotenplase und rt-PA sowie zur Untersuchung des Einflusses von diagnostischem Ultraschall im Sinne einer Sonothrombolyse wurden fünf Versuchsgruppen mit jeweils 40 Thromben gebildet, die alle nach dem gleichen

standardisierten Gerinnungsverfahren hergestellt wurden (Abschn. 2.4.2 und 2.4.6). Die Thromben der fünf Gruppen wurden jeweils eine Stunde lang auf unterschiedliche Weise thrombolysiert, bevor ihre relative Gewichtsabnahme bestimmt wurde (Abschn. 2.2).

In der Kontrollgruppe A befanden sich die Thromben lediglich in gepuffertem Plasma (pH 7.4). Die Thromben der Gruppen B und C wurden in eine Lösung aus gepuffertem Plasma und rt-PA gelegt. In Gruppe C wurde zusätzlich Ultraschall appliziert. Die Konzentration des rt-PAs betrug dabei in Anlehnung an Literaturwerte 60 kU/ml bzw. 100 µg/ml [94]. In den Gruppen D und E wurden die Thromben einer Lösung aus gepuffertem Plasma und DSPA mit einer Konzentration von 2.0 µg/ml ausgesetzt. Die Sonothrombolyse wurde in Gruppe E angewendet. Da die Halbwertszeit des rt-PAs aufgrund seiner schnellen Inhibierung durch PAI-1 [162] lediglich 4 bis 9 Minuten beträgt [69] wurde die rt-PA/Plasma-Lösung in den Gruppen B und C alle 15 Minuten erneuert. Die Halbwertszeit des DSPAs ist dagegen mit rund drei Stunden ausgesprochen lang [59, 62], weshalb in den entsprechenden Untersuchungsgruppen die DSPA/Plasma-Lösungen nicht ausgetauscht wurden.

Die statistische Auswertung umfasste eine Varianzanalyse (ANOVA) sowie einen post-hoc-t-Test, um signifikante Unterschiede zwischen den Faktoren MEDICATION (DSPA oder rt-PA) und ULTRASOUND (An- oder Abwesenheit einer Ultraschallapplikation) bezogen auf die relative Gewichtsabnahme zu bestimmen.

Alle Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt (Statistical Product and Service Solutions, Version 21.0.1; IBM, New York, USA). Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 graphisch zusammengestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe A ($18.2 \pm 5.9\%$) steigt die Lyserate in der rt-PA-Gruppe B ($26.5 \pm 7.8\%$) und der DSPA-Gruppe D ($30.5 \pm 6\%$) signifikant an (jeweils $p < 0.001$). Dabei ist die thrombolytische Wirksamkeit des DSPAs größer als die des rt-PAs, sowohl mit ($p = 0.01$) als auch ohne ($p = 0.015$) den unterstützenden Effekt des Ultraschalls. Die supportive Anwendung des Ultraschalls führte sowohl bei den mit DSPA behandelten Thromben der Gruppe E ($32.8 \pm 7.2\%$), als auch bei den mit rt-PA behandelten Thromben der Gruppe C ($28.6 \pm 6.6\%$) lediglich zu einer leichten und nicht signifikanten Steigerung der Thrombolyse (DSPA: $p = 0.127$; rt-PA: $p = 0.206$). Die kombinierte Therapie aus DSPA und diagnostischem Ultraschall induzierte eine signifikante Verbesserung der Thrombolyse verglichen mit der aktuell üblichen rt-PA-Standardtherapie (32.8% vs. 26.5% , $p < 0.001$).

Die zweifaktorielle ANOVA zeigte keine signifikanten Interaktionen zwischen den Faktoren MEDICATION und ULTRASOUND in Bezug auf ihren Haupteffekt, d.h. die Lyserate.

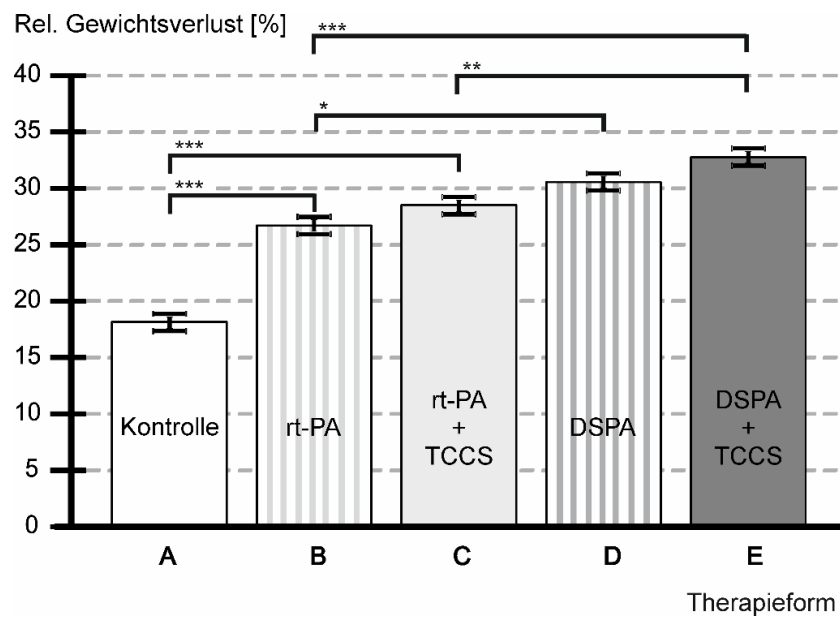


Abbildung 13: Resultate der Thrombolyse mit rt-PA, DSPA und diagnostischem Ultraschall

Bestimmt wurde der relative Gewichtsverlust nach einer einstündigen Behandlung in fünf verschiedenen Untersuchungsgruppen (jeweils n = 40). Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardfehler. Kontrollgruppe A: Die Thromben lagen lediglich in gepuffertem Plasma (pH 7.4). Gruppen B und C: Behandlung der Thromben mit rt-PA (100 µg/ml). In Gruppe C wurde zusätzlich Ultraschall appliziert (TCCS: 2-MHz, 0.179 W/cm²). Gruppen D und E: Behandlung mit DSPA (2.0 µg/ml). In der Gruppe E kam der gleiche Ultraschall wie in Gruppe C zum Einsatz. TCCS: transcranial color coded sonography. DSPA: Desmoteplase. * p=0.015, ** p=0.01, *** p<0.001.

3.4.3 Diskussion

Das Dosisfindungsexperiment für DSPA

Durch das Dosisfindungsexperiment wurde eine DSPA-Konzentration von 2.0 µg/ml für zukünftige einstündige in vitro Lyseexperimente ermittelt. Dieser Wert liegt etwas oberhalb der beiden typischen Dosierungen von 90 µg/kgKG und 125 µg/kgKG, die in Studien untersucht wurden [60–62, 64–66]. Unter Zuhilfenahme der Nadler-Allen-Formel [163] lässt sich für einen gesunden Mann mit einem Körpergewicht von 70 kg und einer Größe von 180 cm ein Blutvolumen von rund 5000 ml abschätzen. Näherungsweise lassen sich so die klinisch angewendeten Dosierungseinheiten in die hier verwendeten Einheiten überführen: 90 µg/kgKG und 125 µg/kgKG entsprechen 1.26 µg/ml bzw. 1.75 µg/ml. Es ist davon auszugehen, dass mit der hier in vitro verwendeten Dosierung von 2.0 µg/ml der thrombolytische Effekt der DSPA nicht unterschätzt wurde.

Die Wirksamkeit des DSPA in den Thrombolyseversuchen

Den gewonnenen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass DSPA eine signifikant größere thrombolytische Wirksamkeit besitzt als rt-PA. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Erkenntnissen anderer in vitro Untersuchungen überein, in denen sich Thromben unter DSPA etwas schneller auflösen ließen als unter rt-PA [164–166]. Die Vergleichbarkeit der in vitro Studien ist allerdings aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Thromben eingeschränkt.

In unseren Versuchen wurden PRP-Thromben mit einem stark ausgebildeten Fibrinnetz lysiert. Die hohe Spezifität der DSPA für fibrin gebundenes Plasminogen ist daher vermutlich ein Grund für die große thrombolytische Wirkung der DSPA in den vorliegenden Experimenten, da größere Mengen von Plasminogen an dem dichten Fibrinnetz des PRP-Thrombus zu Plasmin aktiviert werden können. Gleichzeitig führt diese Fibrinspezifität der DSPA dazu, dass mehr ungebundenes Plasminogen in der Umgebung des Thrombus und damit ein größerer Plasminogennachschub für die Entfaltung seiner thrombolytischen Wirkung an der Thrombusoberfläche erhalten bleibt [167].

Ein weiterer Grund für die gesteigerte Wirksamkeit der DSPA dürfte dessen lange Halbwertszeit sein, die ein tieferes Eindringen des Thrombolytikums in den Thrombus ermöglicht [167, 168]. In Analogie zur klinischen Anwendung, die aus einer einzelnen Bolusgabe besteht, wurde die DSPA-Lösung in den in vitro Experimenten nicht erneuert. Im Gegensatz dazu, wurde das rt-PA/Plasma-Gemisch alle 15 Minuten ausgetauscht, um der kurzen Halbwertszeit des rt-PAs Rechnung zu tragen und die übliche Applikationsform des Medikaments zu simulieren, die aus einer kontinuierlichen Gabe mittels Perfusor besteht. Ein noch häufigerer Austausch oder gar eine kontinuierliche Applikation des rt-PAs war technisch nicht möglich. Allerdings ist es auch fragwürdig, ob dies zu einer Steigerung der Lyserate geführt hätte, da die kurze Halbwertszeit des rt-PAs mit der damit verbundenen geringeren Eindringtiefe letztendlich nur durch eine schnelle und vollständige Auflösung der äußeren Thrombusschichten ausgeglichen werden kann.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Dosierung des rt-PAs in dem vorliegenden Experiment zweimal so hoch war wie die Dosierung, bei der in den von uns durchgeführten Dosisfindungsversuchen (Abschn. 3.5.2) ein Sättigungseffekt auftrat. Der Grund dafür ist, dass vor den Dosisfindungsversuchen für rt-PA die gängigen rt-PA-Dosierungen für in vitro Experiment aus der Literatur herangezogen und aus ihnen der am häufigsten verwendete

Wert ausgewählt wurde, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen herbeiführen zu können. Dieser Literaturwert liegt bei 60 kU/ml, was 100 µg/ml entspricht. Holland et al. [140] sowie die Arbeitsgruppe um Onundarson [169] konnten zeigen, dass das Ausmaß der Thrombolyse mit steigenden rt-PA-Konzentrationen anstieg, bis bei einer Dosierung von 30 kU/ml (50 µg/ml) eine Sättigung einsetzte. Dem zufolge liegt die hier verwendete rt-PA-Konzentration jenseits des Wertes, bei dem das Auftreten eines Ceiling-Effekts zu erwarten ist. Im schlimmsten Fall wird dadurch die Wirksamkeit des rt-PAs in dem vorliegenden Experiment überschätzt. Die Aussage, dass DSPA wirksamer ist als rt-PA, wird dadurch aber nur noch weiter bestärkt.

Der Wirksamkeit der Sonothrombolyse

Die zusätzliche Einwirkung des diagnostischen Ultraschalls führte in den vorliegenden Untersuchungen zu einer weiteren Verbesserung der Thrombolyse unter DSPA. Auch in Kombination mit rt-PA führte der Ultraschall zu einer Steigerung der Lyserate.

Ultraschall ermöglicht eine verstärkte Penetration und Bindungsaffinität thrombolytischer Substanzen in bzw. an das Fibringerüst eines Thrombus [104, 170]. Ursache dafür sind Kavitationseffekte sowie eine reversible Disaggregation der Fibrinfäden, die durch eine mechanische Fragmentierung zustande kommt [108, 109]. Dadurch vergrößert sich die Kontaktfläche für die angewendeten Thrombolytika, die dann zu einer irreversiblen Rarefizierung des Fibringerüsts führen [105]. Vermutet wird auch, dass der Ultraschall den Transport des frei im Plasma befindlichen Plasminogens zur Oberfläche des Thrombus verbessert [167]. Aufgrund der Plasminogen-sparenden Eigenschaft der Fibrin-spezifischen DSPA, sollte es zu einer Verstärkung dieses Prozesses kommen. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen bewirkte die kombinierte Therapie aus Ultraschall und DSPA die höchste Lyserate in den vorliegenden Experimenten.

Letztendlich konnte trotz dieser unterstützenden Wirkmechanismen des Ultraschalls keine signifikante Verbesserung der Lyserate durch den Einsatz der Sonothrombolyse nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich zu diesem Thema widersprüchliche Aussagen. Während einige Arbeitsgruppen eine signifikante Steigerung der rt-PA-induzierten Thrombolyse durch die zusätzliche Ultraschallapplikation nachweisen konnten [140, 143, 160, 171], gelang dies in anderen Experimenten nicht [172, 173]. Vermutlich führen unterschiedliche Versuchsbedingungen zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen. Dabei handelt es sich in erster

Linie um differente Ultraschallparameter, Gerinnungsprotokolle und Analyseverfahren. In den hier vorliegenden Experimenten wird Ultraschall mit niedriger Intensität und hoher Sendefrequenz verwendet. Die übertragbare Ultraschallenergie ist damit am Ort des Thrombus gering. Zugunsten einer hohen Anwendungssicherheit wird die thrombolytische Wirkung dadurch limitiert [143, 171]. Ferner werden in den vorliegenden Experimenten PRP-Thromben und nicht, wie in vielen anderen Untersuchungen, spontan geronnene Vollblutthromben verwendet. Das kräftig ausgebildete Fibrinnetz der PRP-Thromben setzt dem Ultraschall einen größeren Widerstand entgegen als das allenfalls fein strukturierte Fibringerüst der Vollblutthromben [160].

Auch die Ergebnisse der klinischen Studien zeichnen kein eindeutiges Bild. So fand sich in einigen Studien zwar eine signifikant erhöhte Rekanalisationsrate, aber keine signifikante Verbesserung des Behinderungsgrades der Patienten [92, 93]. Im Rahmen der CLOTBUST-Studie zeigte sich lediglich in der Analyse einer Subgruppe, bestehend aus Patienten mit einem initialen NIHSS ≥ 10 und einem proximalen intrakraniellen Gefäßverschluss, dass die kombinierte Behandlung aus Sonothrombolyse und rt-PA gegenüber der Monotherapie mit rt-PA eine signifikante Steigerung dauerhafter Rekanalisationen in Zusammenhang mit der funktionellen Unabhängigkeit der Patienten 90 Tage nach der Behandlung bewirkt [174].

Eine Cochrane-Analyse von fünf Studien mit insgesamt 223 Patienten ergab dagegen, dass die zusätzliche Ultraschallapplikation bei der rt-PA-Behandlung von Schlaganfallpatienten zu einer Steigerung des Rekanalisationserfolgs sowie einer Reduktion der Sterblichkeit und schweren Behinderung nach drei Monaten ohne Anstieg des Behandlungsrisikos führt [123]. Auch eine Meta-Analyse von zehn Phase-II-Studien konnte zeigen, dass für Patienten mit einem intrakraniellen Gefäßverschluss die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Rekanalisation binnen zwei Stunden und eines günstigen klinischen Verlaufs (mRS ≤ 2 nach 90 Tagen) unter einer Behandlung mit Sonothrombolyse und rt-PA (n = 345) im Vergleich zu Patienten, die lediglich einer systemischen rt-PA-Lysetherapie unterzogen wurden (n = 275), mehr als doppelt so hoch ist [127]. Die Aussagekraft dieser Studien wird allerdings durch die geringen Fallzahlen und eine nicht ausreichend verblindete Randomisierung und Weiterverfolgung der Patienten limitiert.

In der doppelt verblindeten, randomisierten, multizentrischen CLOTBUST-ER-Phase-III-Studie, sollte für Patienten mit einem NIHSS ≥ 10 die Effizienz und Sicherheit einer rt-PA-Monotherapie verglichen werden mit einer Kombination aus rt-PA-Therapie und

zweistündiger Sonothrombolyse, bei der eine 2 MHz-Schallsonde an einer Halterung am Kopf des Patienten befestigt wurde. Der Einsatz dieser untersucherunabhängigen Sonothrombolyse erwies sich dabei als sicher, führte aber nicht zu der erhofften Verbesserung des Behinderungsgrades der Patienten nach drei Monaten [175]. Die Studie wurde vorzeitig abgebrochen ohne die vollständige Auswertung der Outcome-Daten abzuwarten. Die insuffiziente Wirksamkeit des Ultraschalls mag in dieser Studie dadurch zustande gekommen sein, dass bei den Studienpatienten kein proximaler intrakranieller Gefäßverschluss nachgewiesen werden musste und zusätzlich die Fixierung der Ultraschallsonde an der Kopfhalterung keine Nachjustierung des Beschallungswinkels zulässt, was zu einer Verringerung der Ultraschallwirkung am Ort des Gefäßverschlusses führen könnte.

Aufgrund dieses ernüchternden Ergebnisses läuft derzeit eine weitere Sonothrombolysestudie (TRUST; NCT03519737). Es handelt sich um eine randomisierte, placebokontrollierte, doppelt verblindeten Phase-III-Studie, in der die Effektivität und Sicherheit der transkraniellen Ultraschallanwendung mit dem Sonolysis Headframe der CLOTBUST-ER-Studie im Form einer zusätzlichen Behandlung zur systemischen rt-PA-Thrombolyse getestet werden soll. Neu dabei ist, dass die Behandlungsgruppe aus Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall besteht, die aufgrund eines nachgewiesenen intrakraniellen proximalen Gefäßverschlusses zur Durchführung einer endovaskulären Behandlung in ein entsprechendes Zentrum verlegt werden müssen.

3.5 Die thrombolytische Wirksamkeit von Tenecteplase (Frühwald T et al. *BMC Neurology* 2019, 19:181-191)

3.5.1 Hintergrund und Fragestellung

Im Vergleich zu rt-PA verfügt Tenecteplase (TNK) über eine erhöhte Spezifität für fibringebundenes Plasminogen, eine vermehrte Widerstandsfähigkeit gegenüber Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und eine verlängerte Halbwertszeit. Dies sollte zu einer stärkeren und schnelleren Auflösung insbesondere von fibrinreichen Thromben führen. Aus diesen Gründen wird TNK bereits zur Behandlung von Myokardinfarkten eingesetzt [176]. In diesem Abschnitt werden in vitro Experimente vorgestellt, in denen TNK mit rt-PA hinsichtlich seiner thrombolytischen Wirksamkeit unter standardisierten Bedingungen

verglichen wird. Wie in dem vorangehenden Abschnitt soll auch hier zusätzlich der Einfluss der Sonothrombolyse untersucht werden. Neben der Gewichtsmessung wird als neues Verfahren die Beurteilung der Fibrinfaserdichte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als Maß der Thrombolyse eingesetzt, um neue Einblicke in die Wirkmechanismen der Thrombolyse zu liefern.

3.5.2 Methoden und Ergebnisse

Anhand der in Abschnitt 3.2 vorgestellten Dosisfindungsexperimente wurden sowohl für rt-PA als auch für TNK die Konzentration ermittelt, bei denen eine Sättigung hinsichtlich der thrombolytischen Wirkung der Medikamente eintrat. Erneut wurden ein- bzw. zweistündige Lyseversuche mit jeweils zehn Thromben pro Konzentrationsstufe durchgeführt. Für rt-PA wurden Konzentrationen zwischen 0 und 100 µg/ml, und für TNK Konzentrationen zwischen 0 und 40 µg/ml untersucht.

Der spontane Gewichtsverlust der Thromben ohne Einwirkung eines Thrombolytikums betrug nach einer Stunde 15.3% und nach zwei Stunden 27.7%. Für das rt-PA wurde das Wirkungsplateau im Konzentrationsbereich zwischen 40 und 50 µg/ml erreicht (Abb. 14).

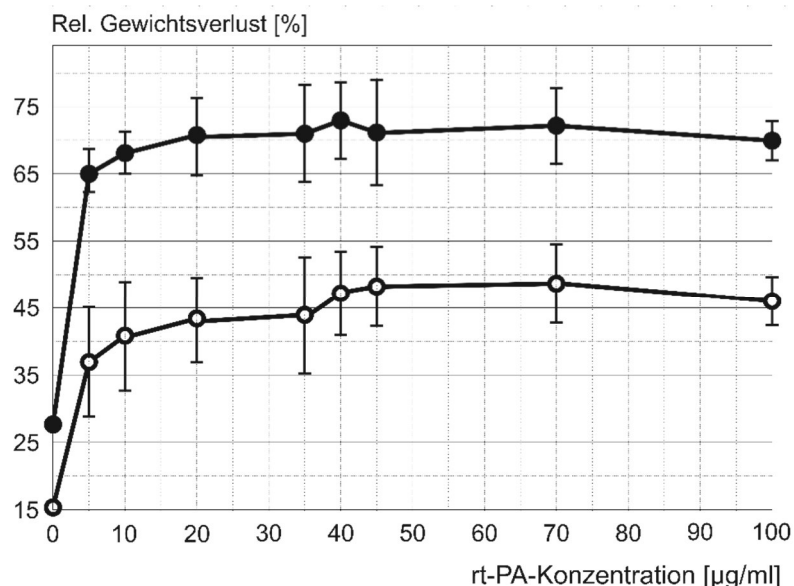


Abbildung 14: Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für rt-PA

Nach einer Stunde (weiße Punkte) und nach zwei Stunden (schwarze Punkte) trat für die Thrombolyse eine Sättigung im Konzentrationsbereich von 40 bis 50 µg/ml auf. Die Messergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die Standardabweichungen der beiden Kontrollgruppen (rt-PA-Konzentration = 0) nicht abgebildet (SD für eine Stunde: 5.7%; SD für zwei Stunden: 7.4%). Anzahl der Versuche pro Messpunkt: n=10.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die folgenden Experimente eine rt-PA-Konzentration von 50 µg/ml gewählt. Für TNK wurde die maximale Lyserate nach einer Stunde für die Konzentration 30 µg/ml (38.3%) und nach zwei Stunden für die Konzentration 25 µg/ml (68.1%) gemessen (Abb. 15). Für die nachfolgenden Experimente wurde daher eine Dosierung von 30 µg/ml verwendet.

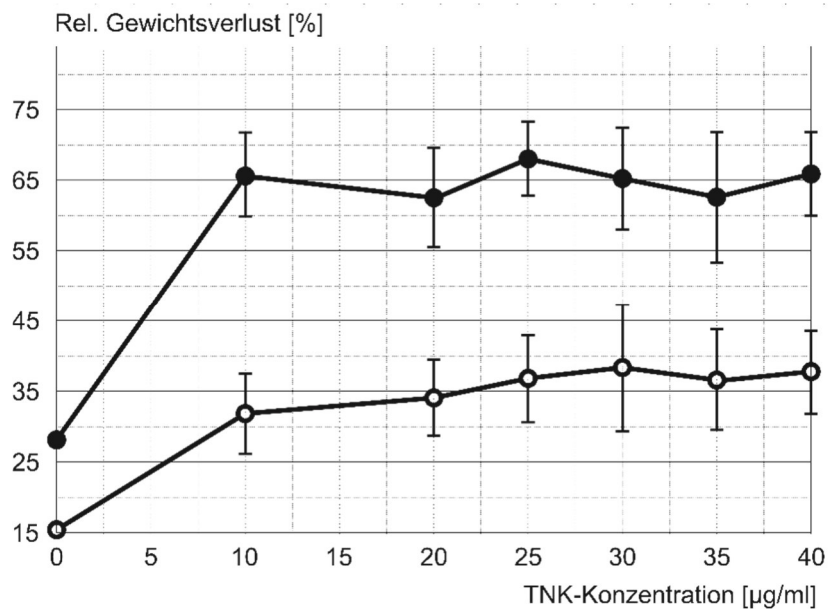


Abbildung 15: Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für Tenecteplase (TNK)

Nach einer Stunde (weiße Punkte) und nach zwei Stunden (schwarze Punkte) trat für die Thrombolyse eine Sättigung im Konzentrationsbereich von 25 bis 30 µg/ml auf. Die Messergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die Standardabweichungen der beiden Kontrollgruppen (rt-PA-Konzentration = 0 µg/ml) nicht abgebildet (SD für 1Stunde: 5.7%; SD für zwei Stunden: 7.4%). Anzahl der Versuche pro Messpunkt: n=10.

Um die thrombolytischen Wirksamkeiten von TNK und rt-PA zu vergleichen und die Auswirkung einer zusätzlichen Sonothrombolyse mit diagnostischem Ultraschall zu erfassen, wurden nach dem gleichen Gerinnungsprotokoll (Abschn. 2.4.2 und 2.4.6) jeweils 60 Thromben für fünf Versuchsgruppen hergestellt. Die fünf Gruppen wurden über die Dauer von einer Stunde jeweils einem anderen Thrombolysezenario unterzogen, bevor die relative Gewichtsabnahme der Thromben gemessen wurde (Abschn. 2.2).

In Analogie zu den im Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Versuchen, befanden sich die Thromben der Kontrollgruppe A in gepuffertem Plasma (pH 7.4). In den Gruppen B und C wurde eine Thrombolyse mit rt-PA (50 µg/ml) vorgenommen, wobei auch hier die rt-PA-Lösung alle 15 Minuten erneuert wurde. Die Thromben der Gruppen C und D wurden mit TNK (30 µg/ml)

behandelt. Die Thromben der Gruppen C und E wurden zusätzlich mit diagnostischem Ultraschall (Abschn. 3.1) beschallt.

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der Fibrinfaserdichte wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.3 für jeden Behandlungsarm fünf erythrozytenfreie Thromben hergestellt, den oben definierten Behandlungsverfahren der Gruppen A – E unterzogen und dann für die TEM-Analyse histologisch präpariert. Von jedem Thrombus wurden fünf ultradünne Schnitte angefertigt. Die Bestimmung der Fibrinfaserdichte erfolgte dann an jeweils einem repräsentativen 5 x 5 µm großen TEM-Ausschnitt pro Thrombus.

Zur statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (Statistical Product and Service Solutions, Version 21.0.1; IBM, New York, USA) verwendet. Für die Bewertung der relativen Gewichtsabnahme und der Fibrinfaserdichte wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) sowie ein post-hoc-t-Test angefertigt, um zwischen den Gruppen A – E Unterschiede hinsichtlich der Faktoren TREATMENT (Durchführung einer Thrombolyse oder nicht), MEDICATION (rt-PA oder TNK) sowie ULTRASOUND (An- oder Abwesenheit einer Ultraschallapplikation) festzustellen. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$.

Die Ergebnisse der Gewichtsmessungen sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

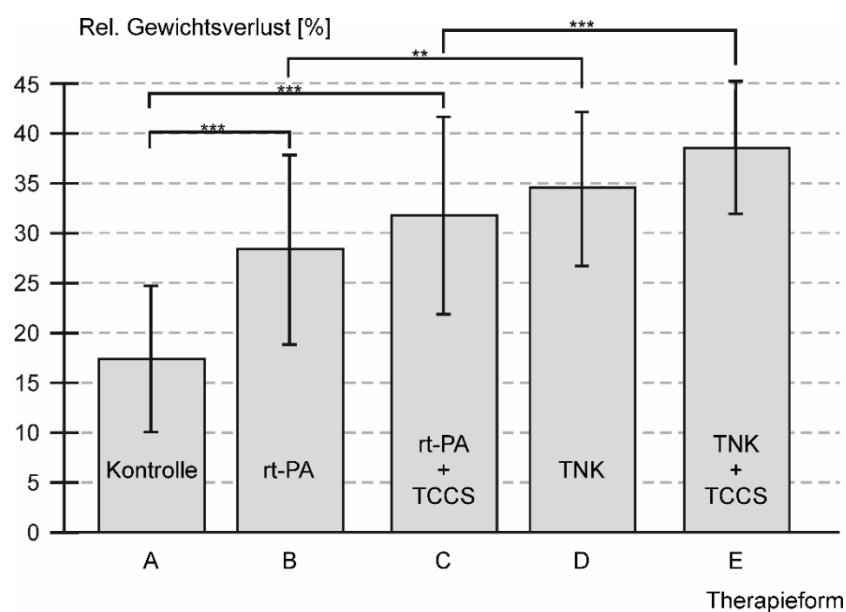


Abbildung 16: Resultate der Thrombolyse mit rt-PA, TNK und diagnostischem Ultraschall

Dargestellt ist der relative Gewichtsverlust der fünf Versuchsgruppen nach einer jeweils einstündigen Behandlung (jeweils $n = 60$). Die Gruppe A fungierte als Kontrollgruppe. Die Thromben befanden sich hier lediglich in einer gepufferten Plasmalösung. In den Gruppen B und C wurde mit rt-PA (50 µg/ml) lysiert, in den D und E mit TNK (30 µg/ml). Die Sonothrombolyse (2 MHz, 179 W/cm², MI = 0.6) kam zusätzlich in den Gruppen C und E zur Anwendung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung abgebildet. *** $p < 0.001$, ** $p = 0.001$.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe A, bei der ein relativer Gewichtsverlust von $17.3 \pm 7.4\%$ zu verzeichnen war, kam es in allen anderen Versuchsgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Lyserate (jeweils $p < 0.001$). Die Behandlung mit TNK führte sowohl mit als auch ohne die Anwendung des Ultraschalls zu einem signifikant größeren Gewichtsverlust der Thromben als in den beiden entsprechenden rt-PA-Gruppen. Ohne Sonothrombolysen betrug der relative Gewichtsverlust für rt-PA $28.3 \pm 9.6\%$ und für TNK $34.5 \pm 8\%$ ($p = 0.001$). Mit Sonothrombolysen wurden für rt-PA $31.6 \pm 10\%$ und für TNK $38.1 \pm 6.7\%$ gemessen ($p < 0.001$). Die zusätzliche Ultraschallapplikation führte sowohl bei der rt-PA- als auch bei der TNK-Thrombolysen zu einer höheren Lyserate, wobei diese Zunahmen statistisch nicht signifikant waren (rt-PA: $+ 3.3\%$, $p = 0.23$; TNK: $+ 3.6\%$, $p = 0.16$).

Die semiquantitative Analyse der TEM-Aufnahmen (Abb. 17) lieferte für die Fibrinfaserdichte Werte zwischen 58% in der Kontrollgruppe und 42.3% in der TNK-Gruppe ohne Sonothrombolysen.

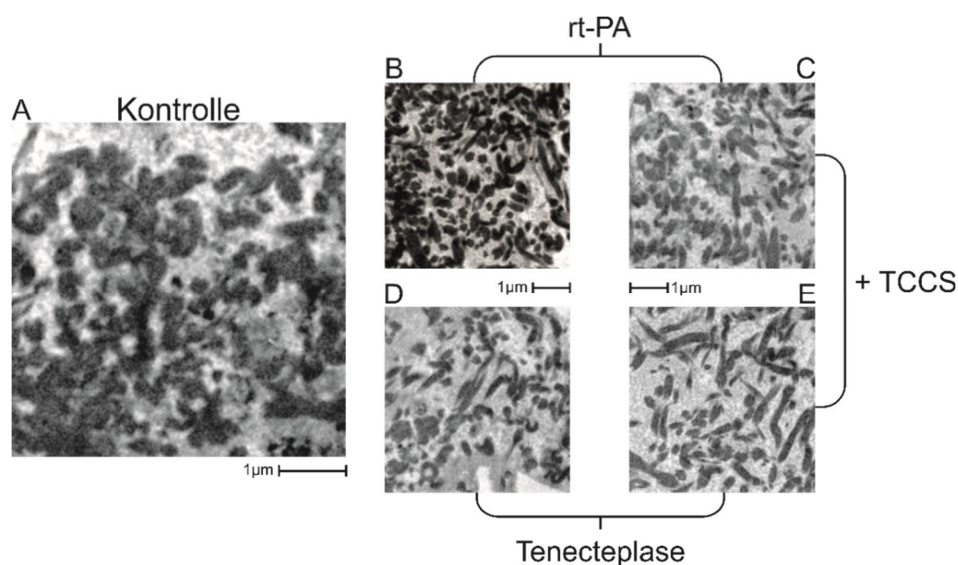


Abbildung 17: Exemplarische TEM-Aufnahmen nach Durchführung der unterschiedlichen (Sono-)thrombolysen
 Zu sehen sind repräsentative Ausschnitte von TEM-Aufnahmen der Fibrinnetze (dunkel gefärbt) der einzelnen Versuchsgruppen nach erfolgter Behandlung. Zum Vergleich der Fibrinfaserdichte wurden jeweils fünf solcher Ausschnitte pro Versuchsgruppe einer semiquantitativen Analyse unterzogen. Kontrollgruppe A: gepufferte Plasmalösung (pH 7.4); Gruppe B: rt-PA in gepuffertem Plasma (50 µg/ml). Gruppe C: Wie Gruppe B mit zusätzlicher Sonothrombolysen; Gruppe D: TNK in gepuffertem Plasma (30 µg/ml), Gruppe E: Wie Gruppe D mit zusätzlicher Sonothrombolysen (2.0 MHz, 0,179 W/cm², MI = 0.6).

Der Vergleich der Fibrinfaserdichte korrelierte mit der Reihenfolge der relativen Gewichtsabnahmen. Eine Ausnahme bildete lediglich die TNK-Sonothrombolysen-Gruppe (45.1%), deren Wert über der TNK-Gruppe lag. Für die Behandlung mit rt-PA allein fand sich eine Fibrinfaserdichte von 54.7% und in Kombination mit Ultraschall von 52.9%.

Eine statistisch signifikante Reduktion der Fibrinfaserdichte ergab sich nur zwischen der Kontrollgruppe und den beiden TNK-Gruppen (TNK allein: $p = 0.001$; TNK und Sonothrombolyse: $p = 0.006$) sowie zwischen der TNK-Gruppe, in der sich die stärkste Auflösung des Fibrinfasernetzes zeigte, und den beiden rt-PA-Gruppen (rt-PA allein: $p = 0.008$; rt-PA und Sonothrombolyse: $p = 0.03$).

3.5.3 Diskussion

Die Dosisfindungsexperimente für rt-PA und TNK

Das Dosisfindungsexperiment lieferte für das rt-PA einen Wert von 50 $\mu\text{g/ml}$, der sehr gut mit Messungen von Holland et al. [140] übereinstimmt. Mit der Nadler-Allen-Formel (vgl. S. 54) ergibt sich näherungsweise eine Dosierung von 3.6 mg/kgKG. In der klinischen Praxis wird dagegen eine Dosierung von lediglich 0.9 mg/kgKG eingesetzt. Der Sättigungswert wurde für TNK bei 30 $\mu\text{g/ml}$ gefunden. Das entspricht nach dem oben erwähnten Umrechnungsverfahren 2.1 mg/kgKG. In Studien wird die höchste noch sichere TNK-Dosierung mit 0.4 mg/kgKG beziffert [67, 73, 177]. Die im Rahmen unserer in vitro Experimente verabreichten Konzentrationen liegen damit für rt-PA um den Faktor 4 und für TNK sogar um den Faktor 5.25 über den üblichen Dosierungen der klinischen Praxis. Dosisabhängige Effekte im Sinne einer Unterdosierung können somit für die vorliegenden Experimente ausgeschlossen werden.

Die Wirksamkeit der TNK in den Thrombolyseversuchen

In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich TNK allein als auch in Kombination mit Ultraschall einer entsprechenden Therapie mit rt-PA hinsichtlich seiner thrombolytischen Wirkung überlegen. Passend dazu weisen auch erste klinische Studien auf eine signifikant höhere Reperfusionrate und eine Verbesserung des Behinderungsgrades bei Schlaganfallpatienten hin, die mit TNK im Vergleich zu rt-PA behandelt wurden [70, 74]. Dies ist vermutlich auf die höhere Fibrinspezifität der TNK zurückzuführen.

Der Wirksamkeit der Sonothrombolyse

Genau wie in den vorangehenden Untersuchungen mit DSPA (Abschn. 3.4.2) lässt sich auch hier, sowohl in Kombination mit rt-PA als auch in Kombination mit TNK, lediglich eine nicht-signifikante Steigerung der Lyserate durch den Einsatz des Ultraschalls feststellen. Die potentiell thrombolytischen Effekte des Ultraschalls und die Ergebnisse anderer in vitro Versuche und klinischer Studien wurden bereits auf Seite 56 ff. erläutert.

Durch Kavitationseffekte und eine Disaggregation der Fibrinfäden verstärkt der Ultraschall reversibel die Penetration thrombolytischer Substanzen. Dadurch vergrößert sich die Kontaktfläche und Bindungsaffinität der Thrombolytika, die dann eine irreversible Auflösung des Fibrinnetzes bewirken. Dieser Mechanismus sollte insbesondere bei Thrombolytika mit einer hohen Fibrinspezifität, wie bei TNK, zum Tragen kommen. Diese Vermutung wird durch die Analyse der Fibrinfaserdichte in den TEM-Aufnahmen bestätigt. Da die Auswirkungen der Ultraschalleinwirkung auf den Thrombus reversibel sind, ist zu vermuten, dass der Ultraschall allein keine signifikante Thrombolyse bewirken kann. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Papadopoulos et al. bestätigt [178]. Auch diese Arbeitsgruppe führten eine in vitro Untersuchung zur Wirksamkeit von TNK und Ultraschall durch. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen nahm die thrombolytische Wirkung der TNK mit steigender Konzentration zu. Die zusätzliche Applikation von Ultraschall führte zu einer weiteren Erhöhung der Lyserate, während die alleinige Ultraschallanwendung keinen signifikanten Anstieg der Lyserate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte. Auch in diesem Fall wird der Vergleich zwischen den Untersuchungen durch Unterschiede des experimentellen Aufbaus und die geringe Probenanzahl in den Experimenten von Papadopoulos et al. ($n = 5$) beeinträchtigt. Entscheidend ist dabei vor allem, dass die Arbeitsgruppe von Papadopoulos offensichtlich einen therapeutischen Ultraschallwandler mit einer mittleren Sendefrequenz von 1 MHz einsetzte, während die Bandbreite unseres diagnostischen Phased-Array-Ultraschallwandlers 2.0. bis 2.5 MHz betrug. Im zeitlichen Mittel lag die räumliche Spitzenintensität (I_{SPTA}) in unseren Experimenten bei $0,179 \text{ W/cm}^2$ und der mechanische Index bei 0.6. Papadopoulos et al. wendeten dagegen eine neunmal höhere Schallleistung von 1.59 W/cm^2 an. Das entspricht einer Leistung von 20 W bei einem runden Schallkopf mit 4 cm Durchmesser. Für diagnostische Untersuchungen sind jedoch maximal 0.72 W/cm^2 zugelassen. Mit Sicherheit ist das auch einer der Gründe, weshalb Papadopoulos et al. im Vergleich zu den vorliegenden Untersuchungen eine deutlich größere Zunahme der

TNK-Thrombolyse unter Zuhilfenahme des Ultraschalls von 25% erzielen konnte. Die entscheidende Aussage, dass der Ultraschall allein zu keiner nennenswerten Thrombolyse führte, wird dadurch noch weiter unterstrichen.

Die Untersuchung der Fibrinfaserdichte mittels TEM

Die Untersuchung der Fibrinfaserdichte lieferte Ergebnisse, die mit den Resultaten der relativen Gewichtsabnahme korrelierten. Lediglich der Wert der TNK-Sonothrombolyse-Gruppe lag mit 45.1% entgegen den Erwartungen über dem der TNK-Gruppe (42.3%), was in diesen Experimenten für eine schlechtere Thrombolyse in der TNK-Sonothrombolyse-Gruppe spricht. Eine mögliche Erklärung dafür ist der geringe Probenumfang der TEM-Untersuchung (jeweils n = 5). Vermutlich wäre bei einer größeren Fallzahl analog zur Gewichtsverlustmessung auch die Abnahme der Fibrinfaserdichte unter der Behandlung mit rt-PA im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geworden.

Entscheidend ist, dass durch die Darstellung der Fibrinfaserdichte die Wirkungsweise thrombolytischer Verfahren nun auch mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens analysiert werden kann. So unterstützen die TEM-Untersuchungen der vorliegenden Experimente die Hypothese, dass Ultraschall durch eine Auflockerung des Fibringerüsts insbesondere die Wirkung fibrinspezifischer Thrombolytika erhöht. Dementsprechend führt die gleichzeitige Einwirkung des Ultraschalls bei der TNK-Behandlung zu einer deutlich geringeren Fibrinfaserdichte (45.1%) als bei rt-PA (52.9%).

3.6 Der Einfluss einer Vormedikation mit Acetylsalicylsäure auf die Thrombolyse

(Roessler FC et al. *Journal of Vascular Research* 2016, 53:128-137)

3.6.1 Hintergrund und Fragestellung

Die Sekundärprophylaxe zerebraler Ischämien und anderer kardiovaskulärer Ereignisse besteht in erster Linie aus der Behandlung modifizierbarer Risikofaktoren und im Falle einer arteriosklerotischen Genese auch aus der Gabe eines Thrombozytenaggregationshemmers. Die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) stellt mit einer wiederholt nachgewiesenen Effektivität [179] hierbei den Goldstandard dar. In verschiedenen Studien lag der Anteil der ASS-Vorbehandlungen bei Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall zwischen 21.6% und

33.6% [180–183]. Auf der anderen Seite ist bei der akuten Behandlung eines zerebralen Gefäßverschlusses die systemische Thrombolyse von entscheidender Bedeutung. Laut der aktuellen Leitlinien der American Heart Association und der European Stroke Organisation stellt die Vorbehandlung mit einem Thrombozytenaggregationshemmer keine Kontraindikation für eine systemische oder arterielle Lyse mit rt-PA dar [90, 184]. Ziel war es daher, den Einfluss einer bereits bestehenden Therapie mit ASS auf unterschiedliche Thrombolysestrategien zu untersuchen. In Abschnitt 3.4 konnte die Überlegenheit der DSPA gegenüber rt-PA im Rahmen einer in vitro Untersuchung demonstriert werden. Durch das folgende Experiment sollte deshalb auch geklärt werden, ob sich diese Überlegenheit vor dem Hintergrund einer Vorbehandlung mit ASS weiterhin nachweisen lässt. Von Interesse war in dieser Konstellation darüber hinaus die Bestimmung der supportiven Wirkung des diagnostischen Ultraschalls. Letztendlich sollten die Untersuchungen auch zum Verständnis klinischer Studien beitragen, in denen sich bessere klinische Verläufe für Patienten fanden, die vor einer systemischen rt-PA-Thrombolyse regelmäßig ASS eingenommen hatten [180, 185].

3.6.2 Methoden und Ergebnisse

Zur Durchführung standardisierter Untersuchungen wurde erneut das statische Thrombolysemodell (Abschn. 2.2) verwendet. Zum Vergleich der Auswirkung einer bestehenden ASS-Einnahme wurden zwei unterschiedliche Thromben hergestellt. Das Gerinnungsprotokoll der Thromben, die ohne die Einwirkung des ASS entstanden (non-ASS-Thromben), entspricht dem entwickelten Gerinnungsprotokoll für PRP-Thromben mit einem PRP/PFP-Mischungsverhältnis von 1.5/2.0 (Abschn. 2.4.2 und 2.4.6).

Zur Schnellaufsättigung wird bei therapienaiven Patienten in der klinischen Routine eine ASS-Dosierung von 250 mg intravenös verabreicht. Entsprechend der Nadler-Allen-Formel (vgl. S. 54) ergibt sich daraus für eine Standardversuchsperson (Geschlecht: männlich, Körpergröße: 180 cm, Gewicht: 70 kg) eine ASS-Konzentration von 0.05 mg/ml im Blut. Dementsprechend wurde bei den Thromben, für die eine vorausgehende Einnahme von ASS berücksichtigt werden sollte (ASS-Thromben), dem gepoolten Vollblut der Spender ASS in einer Konzentration von 0.05 mg/ml hinzugefügt. Anschließend wurde das Gerinnungsprotokoll unverändert weiterverfolgt.

Für die beiden Thrombus-Typen (ASS- und non-ASS-Thromben) wurden dann fünf Versuchsgruppen gebildet (jeweils n = 40). In der Kontrollgruppe befanden sich die Thromben lediglich in gepuffertem Plasma (pH 7.4). In den Gruppen B und C wurde dem gepufferten Plasma rt-PA (100 µg/ml) und in den Gruppen D und E DSPA (2.0 µg/ml) hinzugegeben. Die Dosierungen der beiden Thrombolytika liegen damit oberhalb ihrer jeweiligen Sättigungswerte (vgl. DSPA: S. 52; rt-PA: S. 59). Dosisabhängige Effekte sollten dadurch nicht auftreten. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des rt-PAs (vgl. S. 53) wird das rt-PA-Plasma-Gemisch alle 15 Minuten erneuert. In den Gruppen C und E wurde zusätzlich Ultraschall im Sinne einer sonothrombolytischen Behandlung eingesetzt. Die Parameter des Ultraschalls wurden bereits in Abschnitt 3.1 vorgestellt.

Als Maß für die Thrombolyse wurde nach einer Stunde der relative Gewichtsverlust ermittelt (vgl. S. 27). Mittels der Software SPSS (Statistical Product and Service Solutions, Version 21.0.1; IBM, New York, USA) wurden eine Varianzanalyse (ANOVA) sowie ein post-hoc-t-Test durchgeführt, um statistisch signifikante Änderungen des relativen Gewichtsverlusts bzgl. der

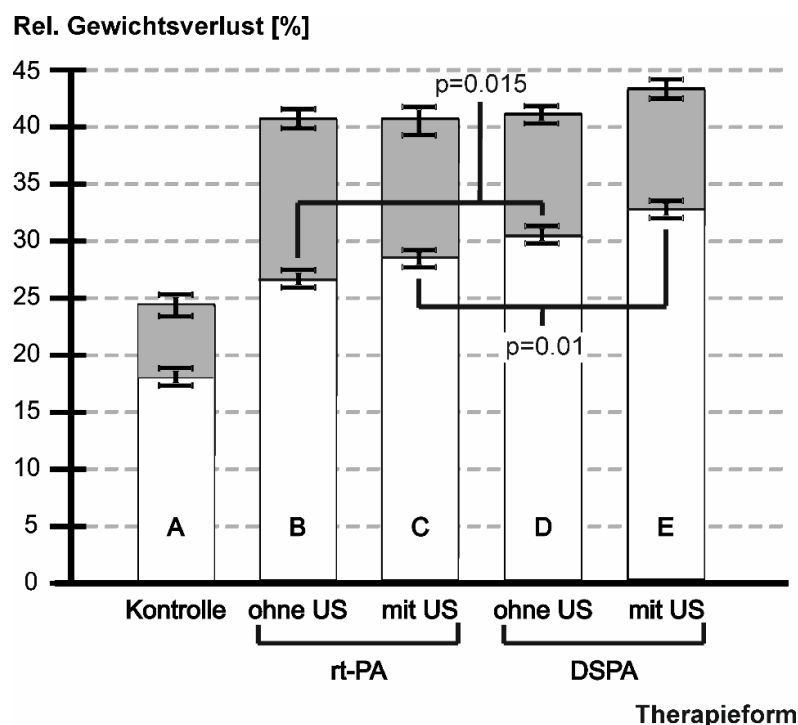


Abbildung 18: (Sono-)thrombolyse bei Thromben, die ohne und mit ASS entstanden waren

Der relative Gewichtsverlust wurde in allen Versuchsgruppen nach einer einstündigen Behandlungsdauer gemessen. Zu sehen sind die Ergebnisse sowohl für die Thromben, die mit (grau) als auch ohne ASS (weiß) hergestellt wurden (jeweils n = 40). Gruppe A: Kontrollgruppe. Die Thromben lagen in einer gepufferten Plasmalösung (pH 7.4). Gruppen B und C: Behandlung mit rt-PA (100 µg/ml). Gruppen D und E: Behandlung DSPA (2 µg/ml). In den Gruppen C und E wurde zusätzlich Ultraschall (US) appliziert (2 MHz, 179 W/cm², MI = 0.6). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler abgebildet

Faktoren CLOTTYPE (ASS- oder non-ASS-Thrombus), TREATMENT (keine oder durchgeführte Thrombolyse), MEDICATION (DSPA oder rt-PA) sowie ULTRASOUND (An- oder Abwesenheit der Sonothrombolyse) zu erfassen. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$. In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Für Thromben, die unter Einwirkung von ASS entstanden waren, zeigten sich für alle Behandlungsformen signifikant gesteigerte Lyseraten im Vergleich zu den non-ASS-Thromben. Dies galt auch für die Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Haupteffekte fanden sich für die Faktoren CLOTTYPE ($F(1,423) = 149.6$, $p < 0.001$) und TREATMENT ($F(4,423) = 45.0$, $p < 0.001$) wobei eine signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren bestand ($F(4,423) = 2.5$, $p = 0.044$).

Eine separate Varianzanalyse für den Faktor CLOTTYPE ergab, dass jedwede Behandlung mit DSPA oder rt-PA, mit oder ohne Ultraschall, sowohl bei den ASS-Thromben als auch bei den non-ASS-Thromben zu einem signifikanten Anstieg des Gewichtsverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe führt [no-ASS-Thromben: $F(4, 190) = 27.0$, $p < 0.001$, post-hoc-Vergleich (Scheffé) zwischen keiner und jedweder Behandlung: jeweils $p < 0.001$; ASS-Thromben: $F(4, 233) = 24.6$, $p < 0.001$, post-hoc-Vergleich (Scheffé) zwischen keiner und jedweder Behandlung: jeweils $p < 0.001$].

Eine dreifaktorielle ANOVA bzgl. der Faktoren CLOTTYPE, MEDICATION und ULTRASOUND lieferte einen signifikanten Haupteffekt für die Faktoren CLOTTYPE ($F(1, 352) = 142.9$, $p < 0.001$) und MEDICATION ($F(1, 352) = 7.6$, $p = 0.006$) aber nicht für ULTRASOUND. Interaktionen fanden sich nicht.

Für die non-ASS-Thromben zeigte die post-hoc-Analyse, dass eine signifikante Steigerung der Lyserate durch die Behandlung mit DSPA im Vergleich zur Behandlung mit rt-PA erzielt werden konnte, und das sowohl ohne ($T(76) = 2.49$, $p = 0.015$) als auch mit einer zusätzlichen Ultraschallapplikation ($T(76) = 2.6$, $p = 0.01$). Innerhalb der beiden medikamentösen Therapieoptionen führte die Ultraschallanwendung jedoch zu keinem signifikanten Anstieg der Thrombolyse (DSPA: $p = 0.127$; rt-PA: $p = 0.206$).

Bei den ASS-Thromben unterschieden sich dagegen die einzelnen Therapiegruppen nicht mehr signifikant voneinander.

Um eine räumliche Vorstellung der Fibrinstruktur der Thromben zu erhalten, wurden rasterelektronenmikroskopische (scanning electron microscopy, SEM) Aufnahmen angefertigt. Für jeden Thrombustyp und jede Behandlungsgruppe wurden jeweils vier Thromben erstellt. In Analogie zur Transmissionsmikroskopie (Abschn. 3.3) wurden auch hier erythrozytenfreie Thromben verwendet. Diese wurden nach Abschluss der Thrombolyseexperimente in einer Mischung aus 1.5% Glutaraldehyd und 1.5% Formalin in einem 0.15 molaren HEPES-Puffer fixiert. Die Thromben wurden dann ebenfalls in eine 20%ige Saccharose-Lösung überführt und bei -26 °C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden über Trockeneis in kleinere Bruchstücke zerlegt. Durch diese Art des Gefrierbruchs konnten Bruchstücke mit weitestgehend nativer räumlicher Struktur hergestellt werden, wie es durch Zerschneiden nicht möglich gewesen wäre. Beim Zerschneiden hätten Schnittartefakte zu einer Verfälschung geführt. Es erfolgte dann eine Nachfixierung der so gewonnenen Bruchstücke in einer 1%igen Osmiumtetroxid-Aqua-bidest.-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Danach wurden die Proben mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Abschließend erfolgte eine überkritische Trocknung mittels Kohlendioxid (Kritisch-Punkt-Trockner CPD 030, BAL-TEC AG, Balzers, Lichtenstein) und eine Goldbeschichtung in einem Sputter-coating Gerät (Polaron E5000 Sputter Coater, Polaron Equipment Ltd., Watford Herts, England). Betrachtet wurden die Proben mit einem Rasterelektronenmikroskop (FEI XL30, Philips GmbH, Hamburg, Deutschland).

Schließlich wurden zur Bestimmung der Fibrinfaserdichte auch noch Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop von jeweils vier Exemplaren eines Thrombustyps und einer Behandlungsgruppe auf die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Weise erstellt. Als statistisches Verfahren wurde aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 4$) und der nicht vorhandenen Normalverteilung für die semi-quantitative Analyse der Fibrinfaserdichte eine nicht-parametrische ANOVA für unabhängige Stichproben (Kruskal-Wallis-Test) sowie ein nicht-parametrischer post-hoc-Gruppenvergleich (Wilcoxon-Rangsummen-Test) gewählt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Product and Service Solutions, Version 21.0.1; IBM, New York, USA). Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$.

Sowohl die raster- als auch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von drei Experten, hinsichtlich der Fibrinfaserdichte, unabhängig voneinander visuell beurteilt, ohne zu wissen, welchem Thrombustyp und welcher Behandlungsgruppe die Bilder

zuzuordnen waren. In dieser rein qualitativen Analyse wurde übereinstimmend eine Auflockerung des Fibrinnetzes für ASS-Thromben in allen Behandlungsgruppen gesehen. Die statistische Analyse mittels post-hoc-Gruppenvergleich bestätigte jedoch nur eine zunehmende Auflockerung des Fibrinnetzes durch ASS in der Kontrollgruppe ($p=0.029$).

Darüberhinaus wurde in der visuellen Analyse durch die drei Experten eine Auflösung des Fibrinnetzes für die mit rt-PA oder DSPA behandelten Thromben sowohl für die ASS- als auch für die non-ASS-Thromben im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe erkannt.

Die stärksten Auflösungserscheinungen fanden sich in dieser qualitativen Auswertung bei ASS-Thromben, die mit der Kombination aus DSPA und diagnostischem Ultraschall behandelt worden waren. Exemplarische SEM- und TEM-Aufnahmen sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.

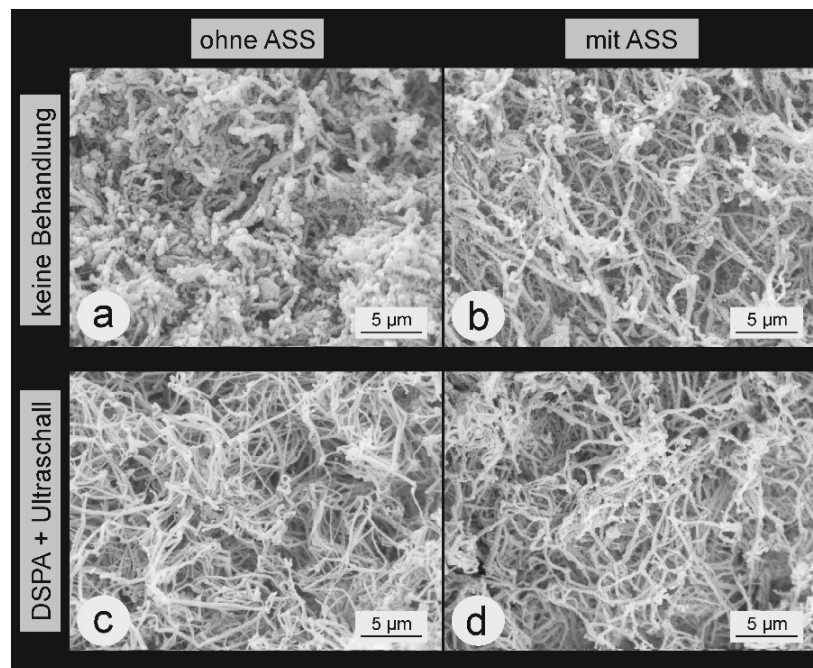


Abbildung 19: Der Einfluss des ASS und der Sonothrombolyse auf das Fibrinnetz

Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Thromben, die keiner Behandlung (a,b) oder einer Kombinationsbehandlung aus DSPA (2 µg/ml) und Ultraschall (2 MH, 0.179 W/cm²) ausgesetzt waren (c,d). Thromben, die unter der Einwirkung von Acetylsalicylsäure (0.05 mg/ml) hergestellt wurden (b,d) weisen ein stärker aufgelockertes Fibrinnetz (helle Fäden) auf, als die ASS-freien Thromben (a,c).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte die semiquantitative Auswertung der TEM-Bilder dagegen nur eine signifikante Abnahme der Fibrinfaserdichte in der Gruppe belegen, die mit DSPA und Ultraschall behandelt worden war. Dies traf sowohl für die ASS-Thromben ($p=0.029$) als auch für die non-ASS-Thromben ($p=0.029$) zu.

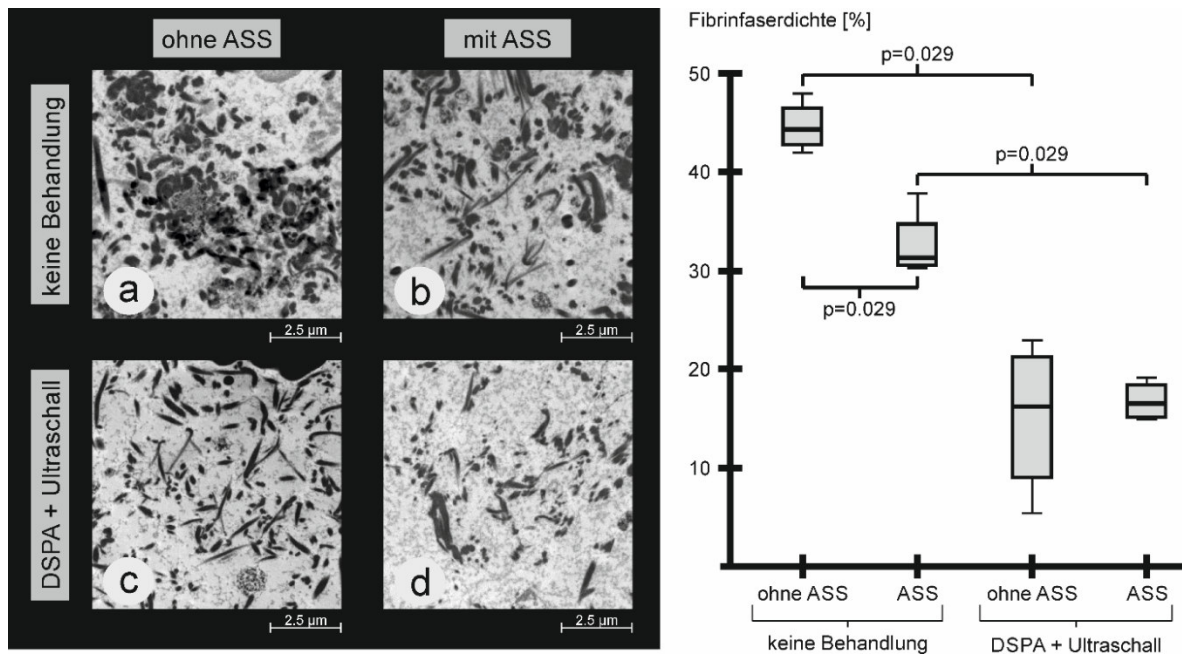


Abbildung 20: Der Einfluss des ASS und der Sonothrombolyse auf die Fibrinfaserdichte

Links sind typische Ausschnitte transmissionselektronenmikroskopischer (TEM) Bilder von Thromben zu sehen, die keiner Behandlung (a,b) oder einer einstündigen Kombinationsbehandlung aus DSPA (2 µg/ml) und Ultraschall (2 MHz, 0.179 W/cm²) unterzogen wurden (c,d). Thromben, die unter der Einwirkung von Acetylsalicylsäure (0.05 mg/ml) entstanden (b,d) weisen eine geringere Fibrinfaserdichte auf als die ASS-freien Thromben (a,c). Das Fibrin ist dunkel kontrastiert. Rechts ist die entsprechende Boxplot-Graphik für die gemessene Fibrinfaserdichte zu sehen. Die semiquantitative Analyse wurde für jeweils vier Thromben einer Gruppe anhand der TEM-Aufnahmen durchgeführt. Die p-Wertberechnung basiert auf einem nicht-parametrischen post-hoc-Gruppenvergleich (Wilcoxon-Test).

3.6.3 Diskussion

Alle hier untersuchten Thrombolysestrategien führten im Vergleich zur Kontrollgruppe für beide Thrombustypen (ASS-Thromben und non-ASS-Thromben) zu einer signifikanten Gewichtsreduktion (jeweils $p < 0.001$). In Abwesenheit von ASS konnte eine signifikant höhere Lyserate von DSPA im Vergleich zu rt-PA verzeichnet werden (vgl. Abb. 18), sowohl mit ($p = 0.01$) als auch ohne die zusätzliche Sonothrombolyse ($p = 0.015$). Ursache dafür dürfte die längere Halbwertszeit und die höhere Spezifität für fibringebundenes Plasminogen des DSPAs sein. Eine ausführliche Diskussion darüber findet sich im Abschnitt 3.4.3.

Der diagnostische Ultraschall konnte zu keiner signifikanten Steigerung der Thrombolyse in der DSAP- oder rt-PA-Behandlungsgruppe beitragen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer in vitro Studien [164–166, 172, 173] und wurde bereits detailliert auf den Seiten 56 ff. besprochen.

Der Zusatz von ASS bei der Generierung der Thromben führte zu einer signifikant erhöhten Gewichtsabnahme in allen Behandlungsgruppen (jeweils $p < 0.001$). Durch die Acetylierung der Cyclooxygenase (insbesondere COX-1) hemmt ASS irreversibel die Interaktion von Thrombozyten. Die Biosynthese von Thromboxan-A₂ wird in den Thrombozyten blockiert. Da Thromboxan-A₂ ein hochaktiver Stimulator der Thrombozytenaktivierung und –aggregation sowie der Thrombusretraktion ist, sind ASS-Thromben größer und instabiler als non-ASS-Thromben [186, 187]. Außerdem führt ASS durch seine Wechselwirkung mit Fibrinogen und dem Faktor XIII zu einer unvollständigen Vernetzung von Fibrin [186, 188–190]. Dabei wird auch eine Zunahme der Fibrinfaserdicke beobachtet [187], die ihrerseits wieder mit der Ausbildung eines lockeren Fibrinnetzes zusammenhängt [191, 192]. ASS erhöht somit die Porosität des Fibrinnetzes [187]. Solche porösen Fibrinnetze sind weniger widerstandsfähig und lassen sich besser lysieren [190].

Die Vermutung liegt nahe, dass Plasminogenaktivatoren wie rt-PA oder DSPA dadurch tiefer in ASS-Thromben eindringen können, damit eine größere Angriffsfläche vorfinden und somit eine größere thrombolytische Wirkung entfalten können (Abb. 21).

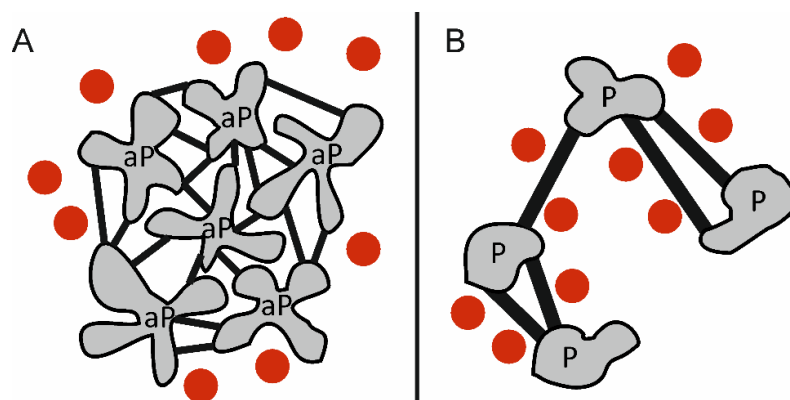


Abbildung 21: Schematische Darstellung der ASS-Wirkung am Thrombus

A: Thrombus ohne Einwirkung von Acetylsalicylsäure (ASS). B: Thrombus, der unter Einfluss von ASS entstand. Die aktivierten (aP) und weniger aktivierten Thrombozyten (P) sind über Fibrinfäden (schwarze Striche) verbunden. ASS hemmt die Cyclooxygenase (COX) und damit die Bildung von Thromboxan A₂. Das führt zu einer geringeren Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten. Der Thrombus wird dadurch instabiler und weicher. ASS bewirkt darüber hinaus die Acetylierung von Lysinresten des Fibrins, wodurch ein inkomplettes und weniger straff vernetztes Fibringerüst mit dickeren Fibrinfäden entsteht. Thrombolytische Substanzen (rote Punkte) können somit tiefer in den porösen ASS-Thrombus eindringen und eine verstärkte Lyse induzieren.

Von diesem Mechanismus sollten insbesondere fibrinspezifischere Substanzen wie DSPA profitieren. Da DSPA selektiv fibrin gebundenes Plasminogen aktiviert, ist das Fibrin für DSPA Substrat und Cofaktor zugleich.

Alternative Erklärungsmodelle für die unter ASS gesteigerten Lyseraten gehen von einer erhöhten Konversion des Plasminogens zu Plasmin oder einer gesteigerten Affinität der acetylierten Fibrinfasern gegenüber Plasminogenaktivatoren oder Plasmin aus [186].

In jedem Fall weisen die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass ASS die Thrombolysefähigkeit der hier getesteten Thrombolytika rt-PA und DSPA in einem solchen Maße steigert, dass ein sog. Ceiling-Effekt für die Faktoren MEDICATION und ULTRASOUND eintritt. Die Lyseraten sind unter der Einwirkung von ASS so groß, dass die unterschiedlichen Effektstärken der einzelnen Thrombolysestrategien egalisiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werden durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt. In vitro [186, 187, 193, 194] aber auch in vivo Studien [180, 182, 185, 195, 196] weisen darauf hin, dass ASS-Thromben eine aufgelockerte Fibrinstruktur besitzen, die eine suffizientere Lyse ermöglicht. Ajjan et al. [186] konnten mittels rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen das gelockerte Fibrinnetz und eine Zunahme der Faserdicke in ASS-Thromben nachweisen.

Bei der Auswertung der vorliegenden Experimente besteht in zwei Punkten eine Diskrepanz zwischen der rein qualitativen optischen Auswertung der SEM- und TEM-Aufnahmen und den statistischen Berechnungen.

1. Im Gegensatz zur visuellen Auswerten der Experten konnte eine signifikante Abnahme der Fibrinfaserdichte unter ASS rechnerisch nur für die Kontrollgruppe nachgewiesen werden.
2. Ein therapeutischer Effekt ließ sich in Bezug auf die Fibrinfaserdichte sowohl für ASS- als auch für non-ASS-Thromben nur für die Kombinationsbehandlung aus DSPA und Ultraschall quantifizieren. Die Ergebnisse der TEM-Auswertung weichen in diesem Punkt auch eindeutig von den Resultaten der Gewichtsmessung ab.

Diese Widersprüche lassen sich vermutlich durch die sehr kleine Fallzahl (pro Gruppe n = 4) der semiquantitativen Analysen erklären. Ausreißer, wie sie in der DSPA-Ultraschall-Gruppe der non-ASS-Thromben zu verzeichnen waren (vgl. Boxplotdarstellung in Abb. 20) führen bei einer so geringen Probenzahl schnell zu einer Verzerrung der Ergebnisse.

Zur adäquaten Beantwortung der Fragestellung mussten, genau wie in den vorangehenden Untersuchungen, dosisabhängige Effekte bei dem Einsatz der Medikamente vermieden werden. Der Einfluss des ASS durfte nicht überschätzt und die Wirkungen der Thrombolytika

nicht unterschätzt werden. Für die Dosierungen des rt-PAs mit 100 µg/ml und der DSPA mit 2.0 µg/ml wurden daher Werte gewählt, die oberhalb des Sättigungspunktes liegen (vgl. rt-PA: Abb. 14; DSPA: Abb. 12).

In Anlehnung an die klinische Routine wurden zur Generierung der ASS-Thromben eine ASS-Konzentration von 0.05 mg/ml verwendet (vgl. S. 66). He et al. konnten in in vitro Experimenten dosisabhängige Effekt von ASS auf die Plasmin-induzierte Thrombolyse in einem Untersuchungsbereich von 0.007 – 0.4 mg/ml feststellen [187]. Die kürzeste Zeit bis zur vollständigen Auflösung des Testthrombus wurde bei einer relativ niedrigen Konzentration von 0.012 mg/ml gemessen. Bei höheren ASS-Konzentrationen wird die Acetylierung von Fibrinogen wieder blockiert und die prothrombolytischen Veränderungen des ASS an dem Fibrinnetz nehmen wieder ab [187]. Überdosierungen sollten also laut dieser Erkenntnis eher zu einer Wirkungsabnahme des ASS führen. He et al. bestimmten auch die ASS-Konzentration im Blut von Probanden wenige Minuten bis zwei Stunden nach oraler Einnahme von 650 mg ASS. Sie fanden einen Wert von 0.02 mg/ml [187]. Die von uns mittels der Nadler-Allen-Formel abgeschätzte und in den Versuchen eingesetzte ASS-Konzentration von 0.05 mg/ml ist somit mehr als zweimal so groß wie die in vivo gemessene ASS-Konzentration und rund viermal so groß wie die ebenfalls durch He et al. in vitro bestimmte maximal wirksame ASS-Konzentration. In Anbetracht des zuvor erwähnten dosisabhängigen Effekts von ASS sollte also keine Überschätzung der ASS-Wirkung vorliegen.

Das in vitro Modell sollte die klinische Standardsituation simulieren, in der Patienten, die in der Notaufnahme wegen eines akuten Schlaganfalls behandelt werden, keine Medikamente seit Beginn der Symptomatik mehr eingenommen haben.

Da die Cyclooxygenase-1 in Thrombozyten, die einmalig mit ASS behandelt wurden, irreversibel deaktiviert ist und nicht erneut synthetisiert werden kann, hält die Wirkung des ASS für die gesamte Lebensdauer eines Thrombozyten, d.h. für rund 5 – 12 Tage, an [197, 198]. Aus diesem Grund wurde zur Generierung der ASS-Thromben dem gepoolten Vollblut der Spender nur einmalig ASS hinzugegeben. Da andererseits die Halbwertszeit von ASS in Plasma lediglich 15 – 20 Minuten beträgt [199], wurde dem Plasma, in dem sich die Thromben während der Thrombolyseexperimente befanden, auch in der Versuchsreihe mit den ASS-Thromben kein weiteres ASS mehr hinzugefügt.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Versuche vorgestellt, in denen die Wirksamkeit der aktuellen medikamentösen Standardtherapie, der intravenösen Applikation von rt-PA, mit der Wirksamkeit alternativer Verfahren verglichen wurde. Die Alternativen bestanden aus einer Therapie mit den Thrombolytika Desmoteplase (DSPA) oder Tenecteplase (TNK). Ihre Effizienz wurde im Rahmen einer Monotherapie oder in Kombination mit der Sonothrombolyse bestimmt.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Acetylsalicylsäure (ASS), die sich bei vielen akuten Schlaganfallpatienten bereits in der Vormedikation findet, auf verschiedene Thrombolysestrategien untersucht.

Zur Durchführung der in vitro Experimente wurde immer auf das in Abschnitt 2.2 vorgestellte statische Modell sowie das standardisierte Gerinnungsprotokoll (Abschn. 2.4.2 bzw. 2.4.6) zurückgegriffen. Die Versuche wurden so konzipiert, dass die maximalen Effekte der unterschiedlichen Thrombolysestrategien miteinander verglichen werden konnten. Eine Analyse möglicher unerwünschter klinischer Nebenwirkungen ist dabei nicht möglich. Insofern lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen keine direkten Empfehlungen für die klinische Praxis ableiten. Sie dienen vielmehr dazu, die Wirkungsweise der verschiedenen Therapieformen besser verstehen und einordnen zu können. Vor diesem Hintergrund lassen sich klinische Studien genauer planen.

Die Vor- und Nachteile, die sich bei der Verwendung der hier genutzten in vitro Modelle ergeben, wurden im Abschnitt 2.5 bereits ausführlich diskutiert. Die wesentlichen Einschränkungen der vorliegenden Untersuchungen sind:

1. Unter in vitro Bedingungen verändern sich die Pharmakodynamik und –kinetik der verwendeten Präparate. Für die vorliegenden Experimente durfte die Wirksamkeit der Medikamente nicht unterschätzt werden. Um dosisabhängige Effekte zu vermeiden, wurden daher Dosisfindungsexperimente durchgeführt. Die daraus resultierenden Dosierungen liegen für rt-PA um den Faktor 4, für DSPA um den Faktor 1.14 und für TNK um den Faktor 5.25 über den in der klinischen Routine verwendeten Dosierungen, wobei die Berechnung der Faktoren selbst nur näherungsweise mit der Nadler-Allen-Formel erfolgen konnte. Die hier vorliegenden Fragen lassen sich damit sicherlich beantworten.

Die applizierten in vitro Dosierungen dürfen aber nicht für die Behandlung von Patienten verwendet werden.

Um der klinischen Applikationsweise und den Halbwertszeiten der Thrombolytika Rechnung zu tragen, wurde das rt-PA-Plasma-Gemisch alle 15 Minuten erneuert, während die entsprechenden DSPA- und TNK-Gemische über die einstündige Dauer des Experiments nicht mehr ausgetauscht wurden. Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, stellt aber letztendlich auch nur eine Näherung dar.

2. Die Bestimmung der Ultraschallabschwächung ließ sich am statischen Modell aus technischen Gründen nicht mehr durchführen. Aus Messungen am dynamischen Modell lässt sich jedoch ableiten, dass die Ultraschallenergie aufgrund der geringeren Abschirmung des Thrombus am statischen Modell eher höher ist als bei der klinischen Anwendung am Patienten. Die Einwirkung des Ultraschalls wird daher im statischen Modell eher überschätzt. Dadurch wird das vorliegende Ergebnis, das dem Ultraschall keine signifikante Wirkung zuschreibt, in Hinblick auf den Effekt der Sonothrombolyse unter klinischen Bedingungen zusätzlich bekräftigt.

Andererseits ist bei den vorliegenden Ultraschallparametern (2MHz, I_{SPTA} : 0.179 W/cm², MI: 0.6) davon auszugehen, dass weder Kavitation noch thermische Effekte für die nicht signifikant gesteigerten Lyseraten verantwortlich sind [147, 200]. Die sichere Anwendbarkeit der Sonothrombolyse wird darüber hinaus durch die Tatsache belegt, dass die hier gewählte Applikationsform bereits seit langem regelhaft zur Darstellung intrakranieller Gefäße komplikationsfrei angewendet wird.

3. Die Aussagekraft der semiquantitativen TEM-Analyse wird durch die noch zu geringen Fallzahlen, die subjektive Auswahl repräsentativer Bildausschnitte und die erforderliche Nachverarbeitung der Bilder eingeschränkt.

Im Rahmen des in vitro Modells, der hier verwendeten PRP-Thromben sowie unter Beachtung der vorangehenden Limitationen konnten die folgenden Aussagen erarbeitet werden:

Desmoteplase (DSPA) hat eine signifikant größere thrombolytische Wirkung als rt-PA. Grund dafür ist die hohe Spezifität für fibrin gebundenes Plasminogen und die längere Halbwertszeit des DSPA.

Tenecteplase (TNK) hat eine signifikant größere thrombolytische Wirkung als rt-PA. Dies ist vermutlich auf die höhere Fibrinspezifität der TNK zurückzuführen.

Die gleichzeitige Anwendung der Sonothrombolyse in Form des diagnostischen transkraniellen Ultraschalls führt zu einer nicht signifikanten Steigerung der Lyserate aller Thrombolytika (rt-PA, DSPA und TNK). Ursache dafür ist eine reversible Disaggregation der Fibrinfäden, wodurch die Thrombolytika tiefer in den Thrombus eindringen und diesen irreversibel auflösen können. Ohne Beteiligung thrombolytischer Substanzen scheint der Ultraschall am Thrombus jedoch keine dauerhaften Veränderungen zu bewirken.

Thromben, die unter dem Einfluss von Acetylsalicylsäure (ASS) entstanden, zeigen signifikant erhöhte Lyseraten für alle getesteten Thrombolysezenarien (rt-PA oder DSPA jeweils mit und ohne adjuvante Sonothrombolyse). Dabei kommt es zu einem Ceiling-Effekt, durch den die Überlegenheit des DSPA gegenüber rt-PA wieder aufgehoben wird. Die Wirkung von ASS beruht auf der Acetylierung der Cyclooxygenase in Thrombozyten und von Lysinresten an Fibrinogen, wodurch sich ein schwächeres und inkomplett vernetztes Fibringerüst bildet, das den Thrombolytika eine größere Angriffsfläche bietet. Diese Erkenntnis ist das Bindeglied zwischen in vitro Untersuchungen, die unter ASS eine Veränderung der Thrombusstruktur nachwiesen und klinischen Studien, die gesteigerte Lyseraten unter ASS feststellten.

Raster- (SEM) als auch die transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen lassen sich zur Beurteilung thrombolytischer Effekte nutzen. Die semiquantitative TEM-Analyse der Fibrinfaserdichte korrelierte mit den gewichtsbasierten Bestimmungen der Lyseraten. Gleichzeitig lassen sich mit diesem bildgebenden Verfahren auch die strukturellen Auswirkungen verschiedener Thrombolysezenarien auf das Fibrinnetz beurteilen. So ließ sich erkennen, dass Ultraschall durch eine Auflockerung des Fibringerüsts die Wirksamkeit der Thrombolytika steigert.

B Klinische Untersuchungen

4 Die THROMBEX-Studie

(Roessler FC et al. *Scientific Reports* 2021, 11:8433)

Pathophysiologische Überlegungen und klinische Studien weisen darauf hin, dass anhand der histologischen Beschaffenheit eines Schlaganfallauslösenden Embolus Rückschlüsse auf die Thrombogenese und somit auf die Schlaganfallätiologie gezogen werden können [201–205]. Die Entwicklung einer histologischen Klassifikation zur Bestimmung der Thrombogenese von zerebralen Emboli akuter Schlaganfallpatienten könnte so eine raschere und passgenauere Sekundärprophylaxe ermöglichen und damit das Schlaganfallrezidivrisiko für Patienten mit einem ESUS („embolic stroke of unknown source“) deutlich reduzieren.

In diesem Kapitel werden die ersten Ergebnisse der THROMBEX-Studie vorgestellt, die sich auf die Entwicklung und Validierung einer solchen Klassifikation beziehen. Die Klassifikation soll die beiden Hauptursachen akuter embolischer Verschlüsse proximaler Hirngefäße anhand der histologischen Beurteilung des Embolus differenzieren, d.h. sie soll kardiale und arterioarterielle thrombotische Emboli unterscheiden können.

4.1 Hintergrund

Schlaganfälle führen oft zu Behinderungen, die nicht nur für den Betroffenen und seine Angehörigen, sondern auch in gesundheitsökonomischer Hinsicht schwerwiegende Auswirkungen haben. Zu besonders schwerwiegenden Verläufen führen Schlaganfälle mit proximalen Gefäßverschlüssen, die in der Regel durch kardiale oder arterioarterielle Emboli entstehen [13]. Diese embolisierenden Thromben bilden sich im linken Vorhof oder linken Ventrikel bzw. im Bereich einer Stenose einer hirnversorgenden Arterie, insbesondere in der A. carotis interna.

Ogleich diese Pathomechanismen bekannt sind, kann in vielen Fällen trotz einer umfassenden Diagnostik, die ein multimodales CCT oder ein cMRT mit zerebraler Gefäßdarstellung, eine Duplexsonographie der hirnversorgenden Arterien sowie eine Echokardiographie und ein Langzeit-EKG umfasst, kein Hinweis für die zugrunde liegende Ursache des Schlaganfalls gefunden werden [13, 206]. Auch lässt sich bei einem Nachweis

konkurrierender Ursachen die tatsächliche Schlaganfallätiologie nicht immer aufdecken. Solche Schlaganfälle werden als ESUS („embolic stroke of unknown source“) bezeichnet und stellen die behandelnden Ärzte vor große Probleme bei der Auswahl der optimalen Sekundärprophylaxe. In solchen Fällen ist die Verabreichung von Acetylsalicylsäure üblich, da der undifferenzierte Einsatz direkter oraler Antikoagulantien (DOAK) bei ESUS-Patienten zu keiner signifikanten Abnahme erneuter Schlaganfälle in randomisierten Studien führte [207, 208]. Trotz Durchführung einer medikamentösen Sekundärprophylaxe erleiden derzeit 6.2% der Schlaganfallpatienten innerhalb eines Jahres weitere Schlaganfälle [209]. Bei Patienten mit ungeklärter Schlaganfallätiologie ist die Rezidivrate vermutlich noch höher [209].

Zur Senkung der Schlaganfallmortalität und –morbidity ist daher eine verbesserte Aufklärung der Schlaganfallätiologie unabdingbar. Dies gilt insbesondere für Patienten mit embolischen Schlaganfällen ungeklärter Ursache.

Vor diesem Hintergrund kommt dem Verfahren der Thrombektomie eine besondere Bedeutung zu. Diese neuroradiologische Akutintervention führt nicht nur zu einer signifikanten Verringerung neurologischer Defizite bei Patienten mit akuten proximalen Gefäßverschlüssen [210], sondern ermöglicht auch eine histologische Untersuchung des extrahierten Embolus. Es gibt mittlerweile eine Reihe von klinischen Studien, die darauf hindeuten, dass die histologische Zusammensetzung eines Embolus Hinweise auf den Ort bzw. die Art und Weise seiner Entstehung liefert [205, 211–219]. Die Methodik der unterschiedlichen Studien variiert jedoch stark und ein allgemein anerkanntes histologisches Auswertungsverfahren konnte bislang noch nicht entwickelt werden [214].

Weiterhin ist zu vermuten, dass die histologische Zusammensetzung eines Embolus Einfluss auf den therapeutischen Effekt der systemischen Thrombolyse sowie auf die Rekanalisationsrate mechanischer Thrombektomien und damit auch auf den klinischen Verlauf des Patienten hat [201, 202, 213, 220–224]. In Kenntnis klinischer wie auch anamnestischer Prädiktoren für die Beschaffenheit des Embolus könnten möglicherweise unterschiedliche Therapieverfahren im Sinne einer individualisierten Schlaganfallakuttherapie zum Einsatz kommen.

Die in Lübeck und Gießen laufende prospektive, teilverblindete THROMBEX-Studie beschäftigt sich mit den wechselseitigen Beziehungen zwischen der Embolushistologie, der Schlaganfallursache und der Wirkungsweise der Akuttherapie sowie der Sekundärprophylaxe.

Dazu wird die histologische Zusammensetzung von Emboli akuter Schlaganfallpatienten, die mittels einer Thrombektomie geborgen wurden, untersucht. Das histologische Erscheinungsbild der Emboli wird mit anamnestischen und klinischen Daten sowie mit Parametern der bildgebenden Verfahren und des periprozeduralen Managements und schließlich mit dem langfristigen Behinderungsgrad der Patienten verglichen. Mit Hilfe der so gewonnenen Korrelationen soll bereits in der Akutphase der Schlaganfallbehandlung auf die Beschaffenheit des verursachenden Embolus geschlossen werden, um eine möglichst optimale Therapie beginnen zu können. Für die weiterführende Behandlung soll eine histologische Embolusklassifikation zur Klärung der Genese embolischer Gefäßverschlüsse und damit zur frühzeitigen Festlegung der passenden Sekundärprophylaxe beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Entwicklung der histologischen Klassifikation beschrieben, die zwischen kardialen und arterioarteriellen Embolien unterscheiden soll. Dabei wurden folgende pathophysiologische Zusammenhänge berücksichtigt:

Bereits während der ersten Minuten der Blutgerinnselbildung wandern neutrophile Granulozyten in den Thrombus ein, so dass die Konzentration intakter Zellen bereits nach wenigen Stunden ihr Maximum erreicht. Danach setzt ein zunehmender Untergang der im Thrombus befindlichen Zellen ein. Die weitere Einwanderung intakter Zellen wird durch die bereits hohe Zelldichte und das feste Fibrinnetz behindert. Der Anteil intakter neutrophiler Granulozyten und intakter Erythrozyten nimmt somit mit zunehmendem Alter des Blutgerinnsels ab [225, 226]. Des Weiteren nimmt die Stabilität und Festigkeit von Thromben umso mehr zu, je großflächiger und dichter ihr Fibrinnetz [202, 227–229] und die Verteilung ihrer Thrombozyten [230] ist.

Abscheidungsthromben bilden sich in der Regel an einem geschädigten Gefäßendothel [224, 231–235]. Diese Gerinnsel werden aufgrund ihres geringen Erythrozytengehalts auch als “weiße Thromben” bezeichnet. Sie enthalten ein dichtes und stark ausgebildetes Fibrinnetz, viele gleichmäßig verteilte Thrombozyten und einen hohen Anteil untergegangener neutrophiler Granulozyten und Erythrozyten [224, 231, 233, 235, 236]. Histologisch zeichnen sie sich durch ein stabiles Fibrinnetz und durch eine kompakte und bereits organisierte Zellstruktur aus, was auf ein höheres Alter dieser Gerinnsel hindeutet. Derzeit finden sich zunehmend Hinweise dafür, dass Endokardläsionen die vorrangige Ursache für die Bildung intrakavitärer Thromben und damit kardialer Emboli sind [237, 238]. An der Entstehung der

kardialen Blutgerinnsel sind neben der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten auch inflammatorische Prozesse sowie strukturelle und funktionelle Umbauvorgänge des Myokards beteiligt, wohingegen dem Vorhofflimmern und den hämodynamischen Veränderungen auf Vorhofebene nur noch die Rolle von Begleiterscheinungen zugewiesen wird [239–242].

Gerinnungsthromben entstehen dagegen üblicherweise in Gefäßbereichen mit einer erniedrigten Blutflussgeschwindigkeit, insbesondere im venösen Gefäßsystem [243, 244]. Histologisch weisen sie eine lockere und wenig organisierte Struktur auf. Makroskopisch erscheinen sie weich und aufgrund ihres hohen Erythrozytenanteils dunkelrot. Diese sogenannten „roten Thromben“ sind durch eine lokal begrenzte Ansammlung weniger Thrombozyten, dafür aber mehr intakte neutrophile Granulozyten und Erythrozyten gekennzeichnet. Ihr zartes Fibrinnetz ist nur schwach entwickelt. Solche Gerinnungsthromben können auch an Orten mit hohen Blutströmungsgeschwindigkeiten entstehen, und zwar als Schwanzteil eines gemischten Thrombus. Der Kopfteil des gemischten Thrombus besteht in solchen Fällen aus einem Abscheidungsthrombus, der fest mit der geschädigten Gefäßinnenwand eines arteriellen Blutgefäßes verbunden ist [204, 226, 231, 245].

Zusammengefasst deuten viele Ergebnisse vorangehender Studien und pathophysiologischer Untersuchungen darauf hin, dass kardiale Emboli aus Abscheidungsthromben hervorgehen, während es sich bei arterioarteriellen Emboli eher um Gerinnungsthromben handelt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zur Entwicklung der histologischen Klassifikation zwei grundlegende Hypothesen formuliert:

1. Kardiale Emboli sind Abscheidungsthromben, die durch eine endotheliale Dysfunktion des Herzens verursacht werden. Aufgrund des assoziierten Vorhofflimmerns und einer reduzierten Blutflussgeschwindigkeit werden diese Gerinnsel weniger leicht fortgespült. So kommt es zu einer längeren Verweildauer der Thromben in situ mit zunehmender Organisation, fortschreitendem Zelluntergang, vermehrter Aktivierung von lokalem Thrombin, Anhäufung von Fibrin und gesteigerter Vernetzungsreaktion. Die entstehenden „weißen Thromben“ enthalten ein dichtes Fibrinnetz, viele Thrombozyten aber nur noch wenige intakte neutrophile Granulozyten und Erythrozyten. Makroskopisch sind sie hart und widerstandsfähig.

2. Arterioarterielle Emboli gehen aus Gerinnungsthromben hervor, die sich entweder im Windschatten einer Gefäßstenose oder als Schwanzteil eines gemischten Thrombus bilden, der am geschädigten Endothel einer hirnversorgenden Arterie seinen Ursprung nahm. Solche "roten Thromben" enthalten lediglich schwach ausgebildete Fibrinnetze, wenige und lokal begrenzt vorkommende Thrombozyten, dafür aber massenhaft intakte Erythrozyten und neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz zu den kardialen Thromben werden sie vergleichsweise rasch infolge der lokalen Strömungsturbulenzen vom schnell strömenden Blut fortgespült. Makroskopisch erscheinen sie weich und instabil.

Die histologische Klassifikation soll auf diesen Überlegungen basieren. Darüber hinaus soll sie an Referenzthromben adjustiert werden. Ihre Bewertungskriterien sollen eine ausreichende Reproduzierbarkeit und ihre Differenzierung zwischen kardialen und arterioarteriellen Emboli eine zufriedenstellende Validität aufweisen. Schließlich sollte das Klassifikationsverfahren im Rahmen der klinischen Routine auch noch einfach durchführbar sein.

Eine solche Klassifikation könnte dann einen wichtigen Beitrag bei der Wahl der geeigneten Sekundärprophylaxe für thrombektomierte Patienten mit kryptogenen embolischen Schlaganfällen leisten.

4.2 Methoden

Die THROMBEX-Studie wurde durch die Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultäten der Universität zu Lübeck (Referenznummer: 11-257) und der Justus-Liebig-Universität Gießen (Referenznummer: 281/13) genehmigt. Alle Probanden gaben vor Einschluss in die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Die Gewinnung von thrombotischen Emboli und die Bestimmung der Schlaganfallätiologie

Es wurden 125 thrombotische Emboli mit Hilfe einer mechanischen Thrombektomie (Trepo XP, 4x20mm or 6x25mm, Stryker, Fremont, USA) von Patienten mit einem akuten proximalen Gefäßverschluss und der Symptomatik eines ischämischen Schlaganfalls asserviert. 105 Emboli stammten aus dem vorderen und 20 aus dem hinteren Stromgebiet. Die zugrundeliegende Schlaganfallätiologie wurde durch drei unabhängige Schlaganfallexperten

anhand der ESUS-Kriterien der Cryptogenic Stroke/ESUS International Working Group [206, 246] bestimmt (Abb. 22).

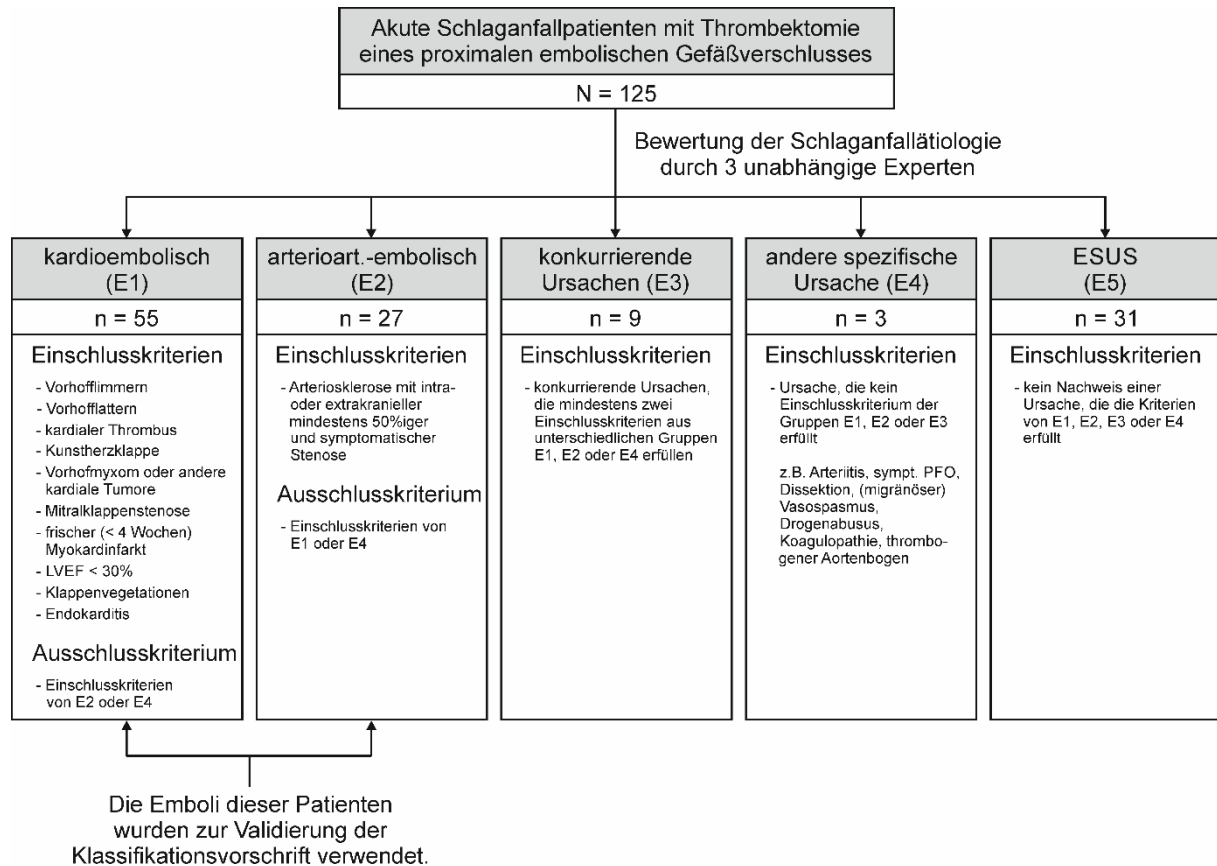


Abbildung 22: Auswahl geeigneter Emboli zur Validierung der THROMBEX-Klassifikation

Anhand aller vorliegenden Patientendaten, der Anamnese sowie der diagnostischen Befunde wurde die Schlaganfallätiologie von 125 Thrombektomie-Patienten durch drei unabhängige Experten nach den ESUS-Kriterien der Cryptogenic Stroke/ESUS International Working Group bewertet. Eine Zuordnung in die Gruppen E1 bis E4 wurde nur dann zugelassen, wenn die Bewertungen aller drei Experten übereinstimmten. Kam es zu keiner einheitlichen Beurteilung oder konnte mindestens ein Experte keine Schlaganfallursache benennen, wurde der Fall als ESUS (Schlaganfall ungeklärter Ursache; E5) gewertet. Zur Validierung der neuen Klassifikation wurden nur die Emboli der Gruppen E1 und E2 herangezogen.

Als Voraussetzung dafür mussten eine detaillierte Anamnese sowie die Ergebnisse einer vollständigen Schlaganfalldiagnostik vorliegen. Gefordert waren ein CCT oder cMRT, eine Untersuchung der extra- und intrakraniellen hirnversorgenden Arterien mittels CTA, MRA, DSA oder Duplexsonographie, ein 12-Kanal- sowie ein 24-Stunden-EKG und eine transthorakale oder transösophageale Echokardiographie. Für Patienten, die jünger als 55 Jahre waren, mussten darüber hinaus eine umfassende Gerinnungsanalyse und eine Vaskulitisserologie vorliegen. Für die Bestimmung der Validität der entwickelten histologischen Klassifikation wurden nur solche Emboli verwendet, deren Entstehung durch alle drei unabhängigen Schlaganfallexperten einstimmig einer kardialen oder

arterioarteriellen Genese zugeschrieben wurde. Auf diese Weise standen für die weiteren Untersuchungen laut Evaluation der Experten 55 Emboli mit einer kardialen Genese und 27 mit einer arterioarteriellen Genese zur Verfügung. Die Basischarakteristika der beiden Gruppen sind in Tabelle 1 zu sehen.

	Kardioembolisch (E1) N=55	Arterioarteriell embolisch (E2) N=27
Alter [Median (min; max)]	72 (44; 88)	67,5 (45; 81)
Weiblich [%]	50,9	48,1
Kardiovaskuläre Risikofaktoren		
Arterielle Hypertonie [%]	76,4	81,5
Diabetes mellitus [%]	25,5	29,6
Koronare Gefäßerkrankung [%]	25,5	22,2
Vorhofflimmern [%]	87,3	3,7
Hyperlipoproteinämie [%]	20,0	22,2
Nikotinkonsum [%]	16,4	51,9
Zustand bei Aufnahme [Median (Minimum; Maximum)]		
Body-Mass-Index [kg/m ²]	25,7 (19,1; 53,6) n=52	27,7 (20,5; 36,1) n=26
Systolischer Blutdruck [mmHg]	144 (97; 240)	165 (119; 190)
Blutzuckerwert [mg/dl]	114 (68; 180)	113,5 (97; 196)
NIHSS	14 (4; 37) n=53	14,5 (4; 37)
Klinische Labordaten bei Aufnahme [Median (Minimum; Maximum)]		
Thrombozytenzahl [/nl]	218 (98; 373)	245 (142; 430)
Hämatokrit [%]	39 (21; 46)	42 (33; 49)
Vormedikation		
Thrombozytenaggregationshemmer [%]	49,1	29,6
Antikoagulation [%]	20,0	3,7
Verschlusslokalisation		
Rechts: ACI, ACM, Carotis-T [%]	47,3	48,1
Links: ACI, ACM, Carotis-T [%]	38,2	44,4
Arteria basilaris [%]	14,5	7,4
Thrombolyse		
Keine [%]	21,8	22,2
Bridging mit Abciximab [%]	29,1	25,9
Systemische Gabe von rt-PA [%]	49,1	51,9
Lokal (intraarterielle) Gabe von rt-PA [%]	10,9	7,4
Verlauf der Thrombektomie [Median (Minimum; Maximum)]		
Dauer von Symptombeginn bis Rekanalisation [min]	204 (87; 625) n=47	229,5 (135; 575) n=16
Rekanalisationszeit [min]	52 (9; 169) n=53	48,5 (17; 153)

Tabelle 1: Basischarakteristika der Patienten, deren Emboli zur Validierung der THROMBEX-Klassifikation verwendet wurden

Für alle kontinuierlich erfassbaren Charakteristika wurden der Median sowie die Minima und Maxima ermittelt. Für nominale Größen wurden deren prozentualen Anteile an der Grundgesamtheit bestimmt. Bei unvollständigen Datensätzen wird die Anzahl der zur Verfügung stehenden Daten explizit erwähnt. NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale. ACI: A. carotis interna; ACM: A. cerebri media.

Die Gewinnung von Referenzthromben

Als Referenzthromben wurden 11 Blutgerinnsel mit einer gesicherten Thrombogenese verwendet. Fünf von ihnen wurden im Rahmen einer kardiochirurgischen Operation aus der linken Herzhälfte entnommen und als potentiell kardiale Emboli definiert. Ein Thrombus stammte aus dem linken Herzohr, die anderen aus dem linken Ventrikel. Sechs Blutgerinnsel, die im Zuge einer Koronarangiographie aus arteriosklerotisch stenosierten Herzkranzgefäßen entfernt wurden, sollten arterioarterielle Emboli darstellen.

Die histologische Beurteilung

Die Blutgerinnsel wurden in einer gepufferten 4%igen Formalinlösung (BÜFA, Hude, Deutschland) fixiert und in Paraffin (FFPE, Paraffin, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingebettet. Anschließend wurden 2 µm dicke Mikrotom-Schnitte auf Super Frost Glasobjektträgern (Menzel, Braunschweig, Deutschland) fixiert, bevor Hämatoxylin-Eosin- (HE) und Elastica-van-Gieson- (EvG) Färbungen (beide Merck, Darmstadt, Deutschland) angerfertigt wurden. Für die Immunhistochemie wurden ein PostBlock HRP-Polymer und ein ZytoChem Plus Kit (beide Zytomed, Berlin, Deutschland) verwendet. CD61-Antikörper (Zytomed, Berlin, Deutschland) wurden in einem Verhältnis von 1:250 verdünnt und mit einem Bedampfer vorbehandelt. Schließlich erfolgte eine Färbung von Serienschnitten, die dann auf einem einzigen Objektträger zusammengestellt wurden. Auf diese Weise wurden große Bereiche des Gerinnsels überprüft, bevor für die abschließende Beurteilung ein repräsentativer Ausschnitt ausgewählt wurde.

Um eine möglichst standardisierte Auswertung zu gewährleisten, durchliefen beide Histopathologen zunächst gemeinsam eine Trainingsphase, in der sie sich anhand von 15 zufällig ausgewählten Präparaten auf die entsprechende Nomenklatur und die Anwendung der Bewertungskriterien verständigten.

Danach beurteilten die beiden Histopathologen (A und B) alle HE-, EvG- und CD61-Färbungen unabhängig voneinander mittels eines Olympus BX50 Mikroskops oder eines Carl Zeiss Axioskops 40, die jeweils mit Fluoritobjektiven und einer Flächenkorrektur ausgestattet waren. Beide Untersucher waren verblindet bezüglich der Gesamtzahl und der Ätiologie der Gerinnsel sowie bezüglich der demographischen Daten, der klinischen Diagnose und der erfolgten Behandlung der Schlaganfallpatienten.

Die immunhistochemische Untersuchung mit CD61-Antikörpern diente der Beurteilung der Thrombozyten. Ihr Verteilungsmuster wurde in Analogie zur Klassifikation von Wolkenformationen durch die Merkmale "Stratus", "Cirrus" und "Cumulus" beschrieben (Abb. 23).

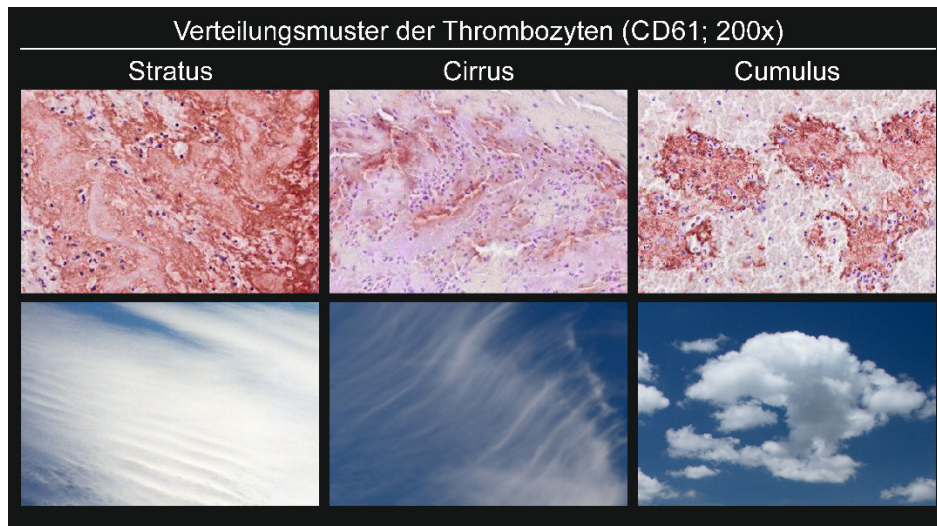


Abbildung 23: Klassifikation der Thrombozytenverteilung

Nach einer immunhistochemischen Färbung (CD61) erfolgt die Beschreibung des Verteilungsmusters der Thrombozyten in Analogie zur Klassifikation von Wolkenformationen durch die charakteristischen Merkmale "Stratus", "Cirrus" und "Cumulus". Basierend auf den entsprechenden Definitionen der Weltorganisation für Meteorologie liegt bei einer Stratus-Verteilung eine gleichförmige Ansammlung von Thrombozyten in Form ineinander verschmolzener oder zerfaserter Flecken vor. Bei der Cirrus-Verteilung liegen die Thrombozyten als separate, feine Fasern oder schmale Bänder vor, die ihnen das Aussehen von Haaren verleiht. Cumulus-artig verteilte Thrombozyten bilden isolierte Cluster mit scharfer Randbegrenzung. Das Ausmaß, in dem sich diese drei Verteilungsmuster in einem Thrombus wiederfinden lassen, wird kontinuierlich in Prozent angegeben. Die Beurteilung erfolgt bei 200facher Vergrößerung. Die Wolkenbilder wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Stephan Borrman vom Institut für Physik der Atmosphäre der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz zur Verfügung gestellt.

Entsprechend der Nomenklatur der Weltorganisation für Meteorologie und der Darstellungen im International Cloud Atlas [247] beschreibt die Stratus-Verteilung eine gleichförmige Ansammlung von Thrombozyten in Form ineinander verschmolzener oder zerfaserter Flecken. Die Cirrus-Formation ist charakterisiert durch separate, feine Fasern oder schmale Bänder, die der Thrombozytenverteilung das Aussehen von Haaren verleiht. Thrombozyten in der Cumulus-Formation liegen dagegen als isolierte Cluster mit scharfer Randbegrenzung vor. Der Anteil dieser drei Kategorien an dem gesamten Verteilungsmuster der Thrombozyten wurde kontinuierlich in Prozent angegeben.

Die Abbildung 24 liefert eine Übersicht der übrigen histologischen Kriterien. Mittels der immunhistochemischen CD61-Färbung wurde die Anzahl der Thrombozyten durch die kategorialen Begriffe "wenig", "mäßig" und "viele" klassifiziert.

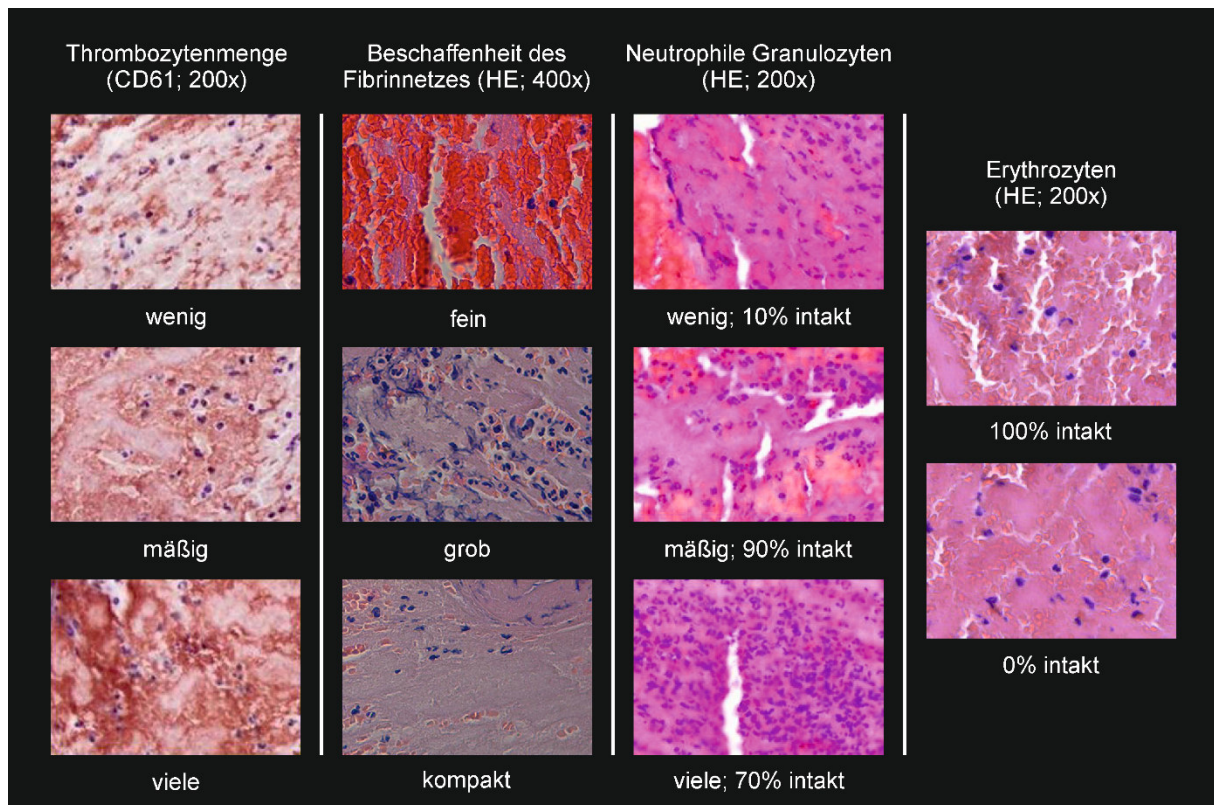


Abbildung 24: Synopsis histologischer Kriterien und ihrer Ausprägungsformen

Die Thrombozytenmenge wird durch eine immunhistochemische Färbung (CD61) abgeschätzt. Die Eigenschaft des Fibrinnetzes wird anhand von Hämatoxylin-Eosin- (HE) und Elastica- van-Gieson-Färbungen (EvG) bestimmt. Mit Hilfe der HE-Färbungen wird sowohl die Anzahl der neutrophilen Granulozyten als auch das Verhältnis zwischen intakten neutrophilen Granulozyten und intakten Erythrozyten zur Gesamtzellzahl des jeweiligen Zelltyps ermittelt. Die Menge an Thrombozyten und an neutrophilen Granulozyten wird durch die Merkmale „wenig“, „mäßig“ und „viele“ auf einer Ordinalskala angegeben. Das Verhältnis zwischen intakten Zellen und der Gesamtzellzahl bei den neutrophilen Granulozyten bzw. bei den Erythrozyten wird ebenso wie die Beschreibung des Fibrinnetzes (als „fein“, „grob“ oder „kompakt“) auf einer kontinuierlichen Prozentzahlenskala aufgetragen. Beurteilt werden die Thromben bei 200facher Vergrößerung. Für die Untersuchung des Fibrinnetzes wird eine 400fache Vergrößerung gewählt.

Anhand der HE- und EvG-Färbungen erfolgte die histologische Beurteilung des Fibrinnetzes, dessen Aussehen mit einer prozentualen Gewichtung der drei Ausprägungsformen „fein“, „grob“ und „kompakt“ beschrieben wurde. Basierend auf der HE-Färbung wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten den Kategorien „wenig“, „mäßig“ und „viele“ zugeordnet. Die Anzahl intakter neutrophiler Granulozyten und Erythrozyten im Verhältnis zu der jeweiligen Gesamtzellzahl wurde kontinuierlich in Prozent abgeschätzt.

Die Überprüfung der Reliabilität der einzelnen histologischen Kriterien

Für die Qualität der zu entwickelnden Klassifikation ist die Reliabilität seiner einzelnen Kriterien von entscheidender Bedeutung. Es sollten nur solche Kriterien in die Klassifikation

aufgenommen werden, die eine ausreichend gute Intra- sowie Interraterreliabilität aufweisen. Die entsprechenden Werte wurden daher für alle Kriterien und ihre Ausprägungsformen bestimmt.

Zur Berechnung der Interraterreliabilität wurden alle zur Verfügung stehenden Gerinnsel-Präparate, also die Referenzthromben (N=11) und die Emboli der thrombektomierten Schlaganfallpatienten (N=125), herangezogen. Dabei hatte der Histologe B technisch bedingt nur zu acht der insgesamt 11 Referenzthromben Zugang. Außerdem konnten an wenigen Präparaten aufgrund schlecht erhaltener Färbungen nicht mehr alle Kriterien von beiden Histopathologen beurteilt werden. Daher schwankt die Fallzahl für die Interraterreliabilität der einzelnen Kriterien zwischen 127 und 132.

Zur Bestimmung der Intraraterreliabilität wurden beide Histopathologen nach sechs Monaten aufgefordert, einige zufällig ausgewählte Präparate erneut auszuwerten, wobei den beiden Untersuchern nicht verraten wurde, dass sie diese bereits zuvor untersucht hatten. Histologe A wertete auf diese Weise 14 Gerinnsel im Abstand von sechs Monaten ein zweites Mal aus, bei dem Histologen B waren es 23. Aufgrund insuffizienter Färbungen konnte der Untersucher B die Verteilung der Thrombozyten nur noch in 22 und deren Anzahl nur noch in 21 Fällen bestimmen.

Die Festlegung der Cut-off-Werte der einzelnen Klassifikationskriterien

Für die dichotome Klassifizierung zwischen kardialen und arterioarteriellen Emboli ist für jedes Klassifikationskriterium ein Grenzwert erforderlich. Die Festlegung dieser Grenzwerte erfolgte durch ein Optimierungsverfahren, bei dem die Grenzwerte so lange verändert wurden, bis die Anzahl der durch die Klassifikation richtig beurteilten Referenzthromben ein Maximum erreichte. Die Klassifikation wurde auf diese Weise an die Referenzthromben adjustiert.

Die Reliabilitätsbestimmung der entwickelten Klassifikation

Zur Bestimmung der Reliabilität der fertigen Klassifikation wurden lediglich die Emboli der thrombektomierten Schlaganfallpatienten (N=125) herangezogen, da die Referenzthromben bereits zur Adjustierung der Klassifikation verwendet worden waren.

Aufgrund unvollständiger Schnittmaterialien gelang die Bestimmung der Interraterreliabilität nur mit 123 der 125 Emboli.

Die Intraraterreliabilität kam durch eine erneute Beurteilung von Emboli durch die Histopathologen A (N=14) und B (N=22) zustande. Genau wie bei der Intraraterreliabilitätstestung der einzelnen Klassifikationskriterien betrug der zeitliche Abstand zwischen der wiederholten Beurteilung sechs Monate. Beiden Histopathologen wurde verschwiegen, dass es sich um bereits untersuchte Präparate handelte.

Die abschließende Validierung der entwickelten Klassifikation

Für die Evaluation der Klassifikation wurden sinnvollerweise nur die Emboli verwendet, die durch die drei Schlaganfallexperten einer kardioembolisch (N=55) oder arterioarteriell embolischen (N=27) Genese zugeordnet worden waren (vgl. S. 83 ff.). Anhand der entwickelten Klassifikation erfolgte durch die beiden Histopathologen nun die Zuweisung dieser Emboli zu den beiden möglichen Ätiologien kardioembolisch bzw. arterioarteriell embolisch. Auch hier arbeiteten die zwei verblindeten Histopathologen unabhängig voneinander. Von den insgesamt 82 zur Verfügung stehenden Emboli konnte Untersucher A aus technischen Gründen lediglich in 81 Fällen eine abschließende Klassifizierung vornehmen.

Die statistischen Auswertungsverfahren

Die Intra- und Interraterreliabilität für kategoriale Variablen erfolgte anhand des Cohens Kappa Wertes (κ) mit einem 95%-Konfidenzintervall. Für kontinuierlich skalierte Variablen wurde Cronbachs Alpha (α) verwendet. Zur besseren Darstellung der Übereinstimmung zwischen den beiden Histopathologen bzw. zwischen wiederholten Untersuchungen eines Histopathologen wurden Bland-Altman-Diagramme angefertigt. Für die mittlere Abweichung wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt. Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Software R (Version 3.5.0) und den Tools *psych* (Version 1.7.2) sowie *BlandAltmanLeh* (Version 0.3.1) [248]. Für die Validitätsprüfung wurden die Übereinstimmungen zwischen der Klassifikation durch die beiden Histopathologen und der Ätiologiebestimmung durch die drei Schlaganfallexperten errechnet und das 95%-Konfidenzintervall bestimmt. Auch hier wurde die Software R in der Version 3.5.0 zusammen mit dem Tool *epitools* (Version 0.5) verwendet [248].

4.3 Ergebnisse

Die Durchführbarkeit der Klassifikation in der klinischen Routine

Die entwickelte Klassifikation basiert auf weit verbreiteten histologischen Färbemethoden und Auswertungsmaterialien. Für die vollständige Beurteilung eines Blutgerinnsels benötigten die Histopathologen im Durchschnitt drei Minuten. Die Präparationskosten beliefen sich auf lediglich 35 € pro Probe.

Die Reliabilität der einzelnen histologischen Kriterien

Die Tabelle 2 fasst alle Werte der Intra- und Interraterreliabilitäten zusammen. Als Grenzwert für eine akzeptable Reproduzierbarkeit wurde in Anlehnung an Publikationen anderer Arbeitsgruppen für Cohens Kappa der Wert 0.5 und für Cronbachs Alpha der Wert 0.6 gewählt. Diese Grenzwerte wurden durch die meisten hier berechneten Werte überschritten. In der Tabelle wurden sie zur besseren Übersicht grau unterlegt.

Die Abbildungen 25 – 27 zeigen die Bland-Altman-Diagramme aller histologischen Kategorien, für die eine kontinuierliche Bewertung in Prozent erfolgte. Sowohl bei der Intra- als auch bei der Interraterreliabilität ergibt sich in allen Fällen für den Mittelwert der Differenz zweier Bewertungen eine horizontale Linie, die dicht neben der Nulllinie verläuft. Das systemische Bias der Bewertungen ist demnach gering und zudem auch noch unabhängig vom Mittelwert der bestimmten Werte. Eine Bewertungsdrift ließ sich nicht nachvollziehen. Allerdings ergeben sich aufgrund der geringen Fallzahlen große Standardabweichungen.

Zur weiteren Entwicklung der Klassifikation wurden lediglich Kriterien zugelassen, für deren Kategorien möglichst viele ausreichend hohen Reproduzierbarkeitswerte nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich dabei um das Verteilungsmuster der Thrombozyten, die Beschaffenheit des Fibrinnetzes und den Anteil intakter neutrophiler Granulozyten und Erythrozyten bezogen auf die jeweilige Gesamtzellzahl.

Thrombozytenmenge κ [95% CI]			
Histologe (N)	wenig	mäßig	viele
A (14)	-0.12 [-0.31 – 0.07]	0.39 [-0.08 – 0.87]	0.58 [0.05 – 1.00]
B (21)	0.7 [0.31 – 1.00]	0.52 [0.16 – 0.87]	0.7 [0.4 – 1.00]
A-B (130)	0.51 [0.32 – 0.7]	0.23 [0.10 – 0.36]	0.19 [0.04 – 0.34]
Verteilungsmuster der Thrombozyten: α [mean diff.; limit: lower – upper]			
Histologe (N)	Stratus	Cirrus	Cumulus
A (14)	0.89 [0.19; -0.18 – 0.55]	0.56 [-0.19; -0.75 – 0.36]	0.79 [0.01; -0.44 – 0.46]
B (22)	0.87 [-0.02; -0.46 – 0.42]	0.81 [0.06; -0.41 – 0.53]	0.84 [-0.04; -0.47 – 0.39]
A-B (127)	0.62 [-0.07; -0.69 – 0.55]	0.56 [-0.01; -0.59 – 0.56]	0.62 [0.08; -0.52 – 0.68]
Beschaffenheit des Fibrinnetzes: α [mean diff.; limit: lower – upper]			
Histologe (N)	fein	groß	kompakt
A (14)	0.91 [0.01; -0.25 – 0.27]	0.80 [-0.01; -0.33 – 0.30]	0.92 [0.01; -0.28 – 0.30]
B (23)	0.66 [-0.14; -0.59 – 0.31]	0.57 [0.15; -0.35 – 0.65]	0.73 [-0.01; -0.50 – 0.47]
A-B (131)	0.73 [0.07; -0.36 – 0.51]	0.45 [-0.01; -0.49 – 0.47]	0.8 [-0.07; -0.46 – 0.33]
Menge neutrophiler Granulozyten: κ [95% CI]			
Histologe (N)	wenig	mäßig	viele
A (14)	0.66 [0.25 – 1.00]	0.29 [-0.21 – 0.78]	0.43 [-0.10 – 0.96]
B (23)	0.38 [0.03 – 0.72]	0.47 [0.13 – 0.81]	0.64 [0.27 – 1.00]
A-B (132)	0.38 [0.20 – 0.56]	0.22 [0.06 – 0.39]	0.35 [0.18 – 0.52]
Anteil intakter neutrophiler Granulozyten: α [mean diff.; limit: lower – upper]			
A (14)	0.71 [0.03; -0.28 – 0.34]		
B (23)	0.43 [0.02; -0.65 – 0.68]		
A-B (132)	0.65 [-0.03; -0.47 – 0.41]		
Anteil intakter Erythrozyten: α [mean diff.; limit: lower – upper]			
A (14)	0.94 [0; -0.23 – 0.22]		
B (23)	1.00 [0; -0.04 – 0.04]		
A-B (132)	0.64 [0.06; -0.48 – 0.60]		

Tabelle 2: Ergebnisse der Intra- und Interraterreliabilitäten der einzelnen histologischen Kriterien

A: Intraraterreliabilität des ersten Histopathologen. B: Intraraterreliabilität des zweiten Histopathologen. A-B: Interraterreliabilität. Die Anzahl der ausgewerteten Fälle ist in runden Klammern angegeben. Für ordinalskalierte Kriterien wurde der gewichtete Cohens Kappa (κ) berechnet. CI = Konfidenzintervall. Zur statistischen Auswertung kontinuierlich erfassbarer Kriterien wurde Cronbachs Alpha (α) verwendet. Die entsprechenden Bland-Altman-Diagramme sind in den Abbildungen 25 - 27 zu sehen. Werte, die auf eine ausreichende Reliabilität ($\kappa \geq 0.5$; $\alpha \geq 0.6$) hinweisen sind grau unterlegt. Graduierung der Übereinstimmung: $\kappa < 0$ = schlecht, $0 \leq \kappa \leq 0,2$ = etwas, $0,2 < \kappa \leq 0,4$ = ausreichend, $0,4 < \kappa \leq 0,6$ = moderat, $0,6 < \kappa \leq 0,8$ = beachtlich, $0,8 < \kappa \leq 1$ = (fast) vollkommen. $\alpha < 0,5$ = inakzeptabel, $0,5 \leq \alpha < 0,6$ = schlecht, $0,6 \leq \alpha < 0,7$ = fragwürdig, $0,7 \leq \alpha < 0,8$ = akzeptabel, $0,8 \leq \alpha < 0,9$ = gut, $0,9 \leq \alpha$ = exzellent.

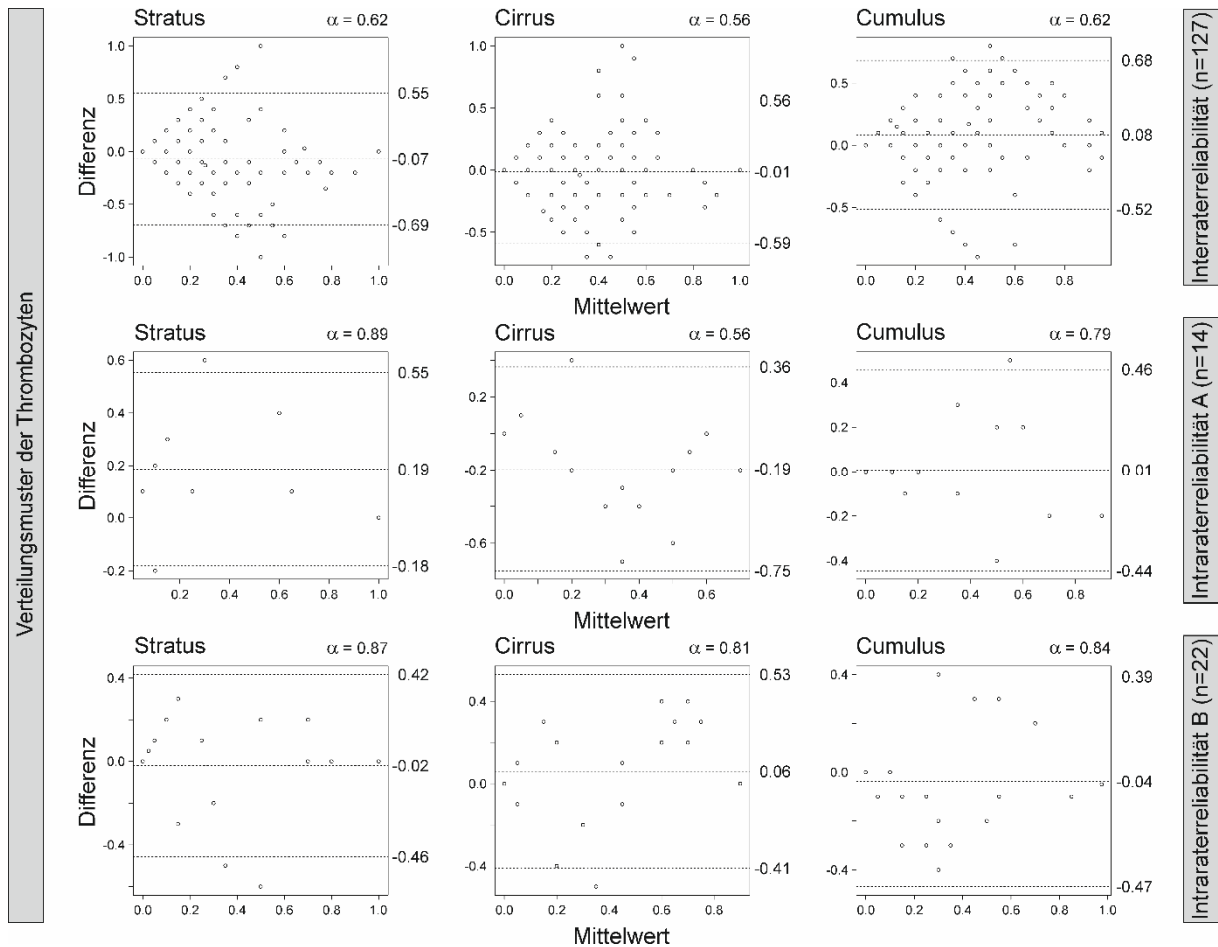


Abbildung 25: Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung des Verteilungsmusters der Thrombozyten

Für alle drei charakteristischen Merkmale der Thrombozytenverteilung ("Stratus", "Cirrus" und "Cumulus") wurden sowohl die Intra- als auch die Interraterreliabilitäten zweier unabhängiger Histopathologen (A und B) bestimmt. In dem Diagramm werden die Differenzen zweier in Prozent angegebener Einschätzungen (X_1 und X_2) als Funktion des Mittelwerts dieser Einschätzungen ($1/2(X_1 + X_2)$) dargestellt. Im Falle der Intraraterreliabilität handelt es sich bei X_1 und X_2 um zwei unabhängige Bewertungen eines einzelnen Histopathologen (A oder B). Im Falle der Interraterreliabilität entsprechen X_1 und X_2 jeweils einer Bewertung der beiden unabhängigen Histopathologen (A und B). Die mittlere horizontale Linie gibt den Mittelwert der Differenz ($X_1 - X_2$) an und ist ein Maß für das systematische Bias der Bewertung. Die beiden anderen horizontalen Linien markieren den Mittelwert ± 1.96 Standardabweichungen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt die Varianz der beiden histologischen Bewertungen X_1 und X_2 in diesem Intervall. α = Cronbachs Alpha.

Die Formulierung der Klassifikation

Ausgangspunkt für die Klassifikation sind die pathophysiologisch gut zu begründenden Hypothesen (vgl. S. 82 und 83), dass 1. kardiale Emboli harte und widerstandsfähige Abscheidungsthromben mit einem dichten Fibrinnetz, vielen Thrombozyten aber einem geringen Anteil intakter neutrophiler Granulozyten und Erythrozyten sind, und dass 2. arterioarterielle Emboli eher weiche und instabile Gerinnungsthromben mit einem schwach

entwickelten Fibrinnetz, wenigen und lokal begrenzt vorkommenden Thrombozyten, aber massenhaft intakten Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten sind.

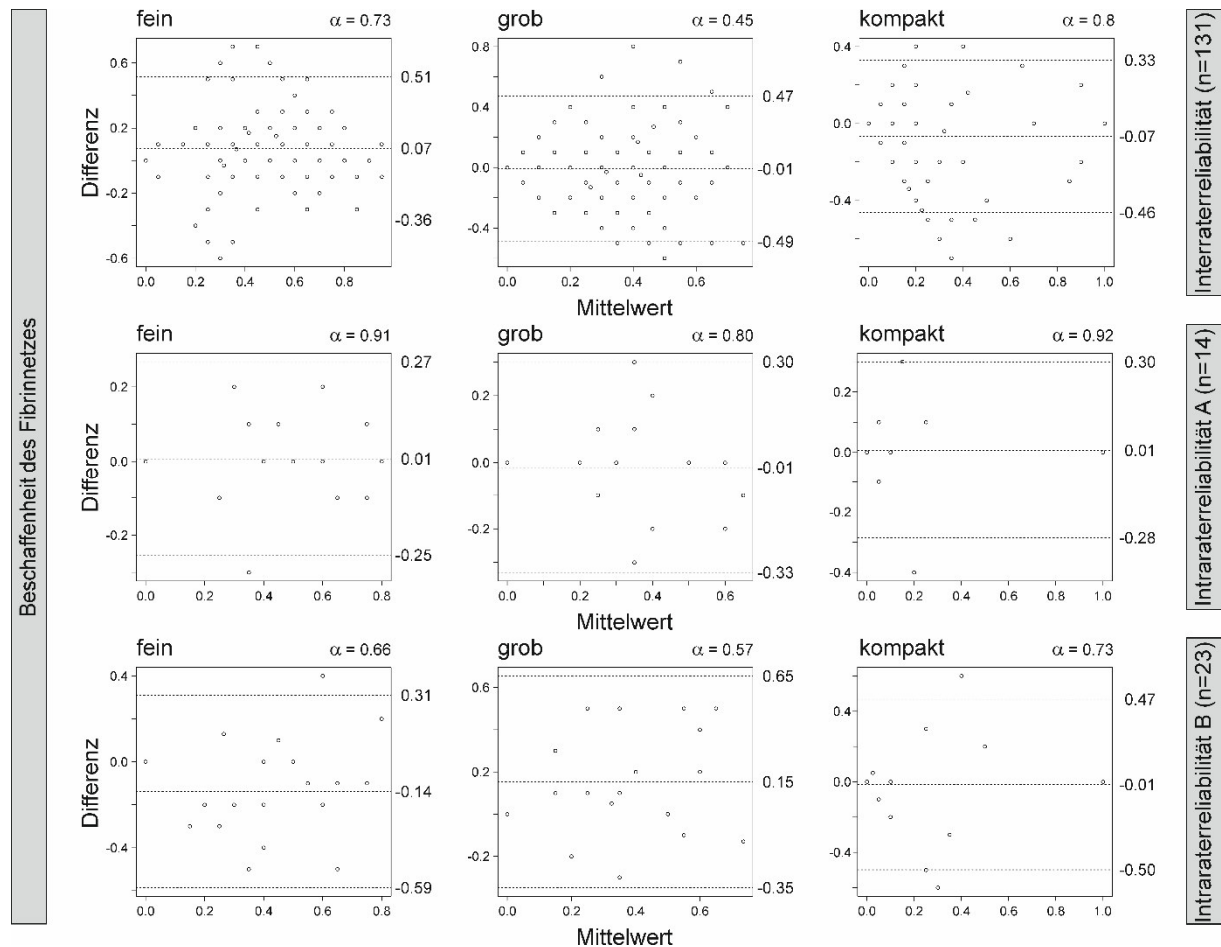


Abbildung 26: Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung der Beschaffenheit des Fibrinnetzes

Die Darstellung der Werte erfolgt in Analogie zu Abbildung 25.

Aus der Verknüpfung dieser Hypothesen und der reliablen Kriterien leitet sich die folgende Klassifikation ab:

Die histologische Struktur eines Embolus weist auf einen arterioarteriellen Entstehungsprozess hin, wenn zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sind:

1. Das Fibrinnetz ist lediglich fein, allenfalls grob entwickelt.
2. Die Thrombozytenverteilung ähnelt einer Cumulus-Formation.
3. Es finden sich viele intakte neutrophile Granulozyten und Erythrozyten.

Andernfalls spricht die histologische Struktur des Embolus für eine kardioembolische Genese.

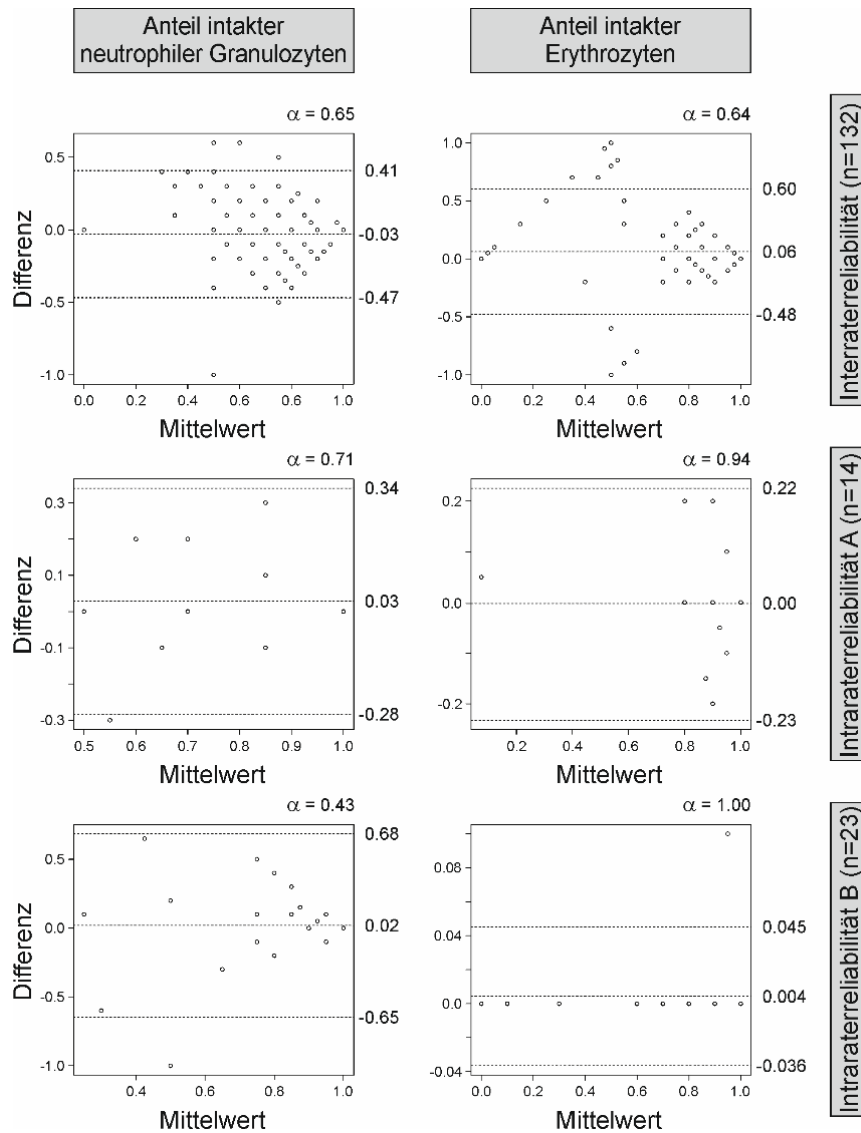


Abbildung 27: Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung des Anteils intakter neutrophiler Granulozyten und intakter Erythrozyten
 Die Darstellung der Werte erfolgt in Analogie zu Abbildung 25.

Die Cut-off-Werte

Durch die Adjustierung dieser Klassifikation an die 11 Referenzthromben ließ sich eine gute Übereinstimmung zwischen der histologischen Beurteilung und der tatsächlichen Genese der Blutgerinnsel erzielen (Tab. 3). Aufgrund der geringen Fallzahl ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz.

Referenzthromben A (N=11) / B (N=8)		Histologische Beurteilung	
		CARDIO	ARTERIO
Sichere Thrombogenese	kardiogen	4 / 3	1 / 0
	arteriosklerotisch	2 / 1	4 / 4
Intraraterreliabilität [%, (95% CI)]			
kardiogen:	A (N=5) / B (N=3)	80 (28,4 – 99,5) / 100 (29,2 – 95,0)	
arteriosklerotisch:	A (N=6) / B (N=5)	66,7 (22,3 – 95,7) / 80 (28,4 – 99,5)	
alle:	A (N=11) / B (N=8)	72,7 / 87,5	
Interraterreliabilität (N=8)			
Übereinstimmung [%]		87,5	
κ (95% CI)		0,75 (0,31 - 1)	

Tabelle 3: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Referenzthromben

A = Erster Histopathologe. B = Zweiter Histopathologe. κ = Cohens Kappa. CI = Konfidenzintervall

Die auf Seite 94 formulierte Klassifikation lautet nun unter Berücksichtigung der gefundenen Cut-off-Werte abschließend:

Die histologische Struktur eines Embolus weist auf einen arterioarteriellen Entstehungsprozess hin, wenn zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sind:

- 1. Anteil des dicht ausgebildeten Fibrinnetzes \leq 30%.**
- 2. Anteil der Thrombozytenverteilung, die einer Cumulus-Formation ähnelt \geq 90%.**
- 3. Anteil intakter neutrophiler Granulozyten und Erythrozyten \geq 80%.**

Dieser histologischen Klassifizierung wird dann der Begriff „ARTERIO“ zugeordnet. Andernfalls deutet die histologische Struktur des Embolus auf eine kardioembolische Genese hin. Die entsprechende histologische Zuordnung nennt sich dann „CARDIO“.

Die Abbildung 28 verdeutlicht diese histologische Klassifikation graphisch. In Abbildung 29 sind typische Proben eines kardialen und eines arterioarteriellen Embolus zu sehen, die sich anhand der Klassifikation korrekt differenzieren ließen.

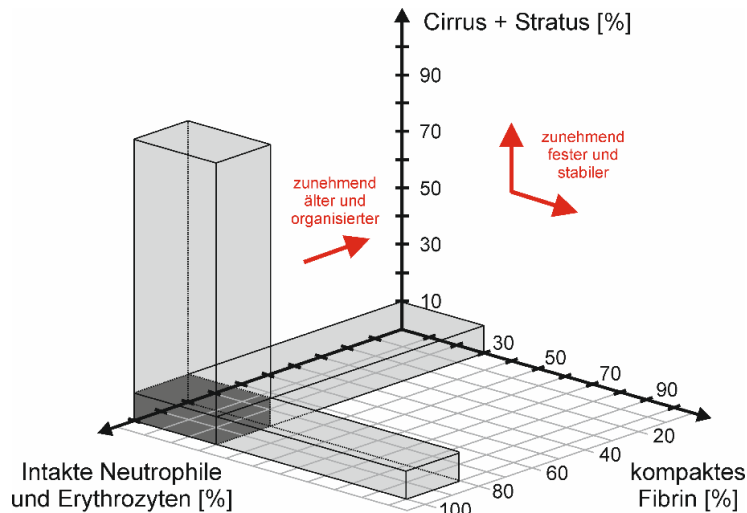


Abbildung 28: Der dreidimensionale Parameterraum der THROMBEX-Klassifikation

Liegen die Werte der charakteristischen Eigenschaften eines Embolus innerhalb des grau schraffierten Parameterraums, wird der Embolus durch die neu entwickelte Klassifikation der Gruppe "ARTERIO" zugeordnet. Aufgrund der histologischen Untersuchung wird damit eine arterioembolische Genese des Embolus postuliert. Andernfalls erfolgt die Zuordnung in die "CARDIO"-Gruppe, was rein histologisch für einen kardioembolischen Entstehungsprozess sprechen würde.

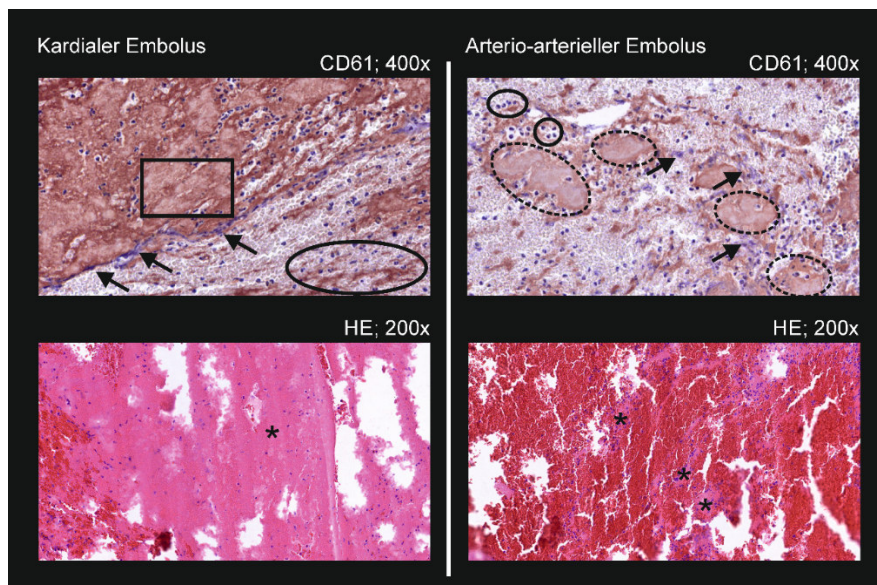


Abbildung 29: Typische kardial und arterioarteriell entstandene Emboli

Zu sehen sind die Hämatoxylin-Eosin- (HE) und immunhistochemischen (CD61) Färbungen zweier Emboli von Patienten mit einer eindeutigen Schlaganfallgenese. Der linke Embolus ging aus einem kardialen Thrombus, der rechte Embolus aus einem poststenotischen Thrombus der A. carotis interna hervor. Der kardiale Embolus ist durch eine große Anzahl von Thrombozyten charakterisiert, deren Verteilung an Stratus- (Rechteck) oder Cirrus- (Oval) Wolkenformationen erinnert. Des Weiteren finden sich hier viele zerfallene neutrophile Granulozyten (Pfeile). Das Fibrinnetz (Stern) ist dicht. Es handelt sich um einen weißen Abscheidungsthrombus. Im Gegensatz dazu finden sich beim arterioarteriellen Embolus vergleichsweise wenige Thrombozyten, die sich zu vereinzelt Clustern zusammenlagern und damit einer Cumulus-Wolkenformation ähneln (gepunktete Ovale). Neben einigen zerfallenen neutrophilen Granulozyten (Pfeile) sind auch viele intakte neutrophile Granulozyten zu erkennen (Kreise). Das Fibrinnetz (Sterne) präsentiert sich überwiegend fein, allenfalls grob. Dies entspricht dem histologischen Erscheinungsbild eines roten Gerinnungsthrombus, der vermutlich das Schwanzteil eines gemischten Thrombus bildete bevor er vom strömenden Blut fortgerissen wurde. 200x = 200fache Vergrößerung; 400x = 400fache Vergrößerung.

Die Reliabilität der Klassifikation

In Tabelle 4 finden sich die Reliabilitätswerte der entwickelten Klassifikation in Bezug auf die Beurteilung von Emboli thrombektomierter Patienten. Die Intraraterreliabilitäten der beiden Histopathologen (A und B) erreichten Werte von 92.9% bzw. 68.2%. Die Interraterreliabilität betrug 69.9%. Die Konfidenzintervalle der entsprechenden Kappa-Werte sind aufgrund der niedrigen Fallzahlen groß.

Emboli von Schlaganfallpatienten	
Intraraterreliabilität [% / κ (95% CI)]	
A (N=14)	92,9 / 0,81 (0,46 – 1)
B (N=22)	68,2 / 0,36 (-0,02 – 0,75)
Interraterreliabilität (N=123)	
Übereinstimmung [%]	69,9
κ (95% CI)	0,39 (0,23 – 0,55)

Tabelle 4: Reliabilitätswerte der histologischen Beurteilung der Emboli von Schlaganfallpatienten

A = Erster Histopathologe. B = Zweiter Histopathologe. κ = Cohens Kappa. CI = Konfidenzintervall

Die Validierung der Klassifikation

Für die 125 thrombektomierten Patienten lieferte die Auswertung der Schlaganfallätiologie überwiegend kardioembolische (n=55; 44%) und arterioarteriell embolische (n=27; 21.6%) Genesen der proximalen Gefäßverschlüsse. Ebenfalls häufig waren kryptogene Verläufe (ESUS: n=31; 24.8%). Erwartungsgemäß gab es nur wenige Fälle mit konkurrierenden (n=9; 7.2%) oder anderen spezifischen Ursachen (n=3; 2.4%). Zur Validierung der Klassifikation wurden von den 125 Emboli nur diejenigen verwendet, bei denen eine kardiale oder arterioarterielle Entstehung angenommen wurde. In Tabelle 1 sind die Basischarakteristika der zugehörigen Patienten zu sehen.

In der Gruppe der arterioarteriellen Emboli, also der Patienten mit einer Makroangiopathie, traten kardiovaskuläre Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Adipositas, Nikotinkonsum) häufiger auf, während die Gruppe mit kardialen Embolien deutlich stärker mit Vorhofflimmern assoziiert war (87.3% vs. 3.7%).

In Bezug auf die Verschlusslokalisation war der Anteil der Basilarisembolien in der Patientengruppe mit kardioembolischen Schlaganfällen fast doppelt so hoch wie in der

Gruppe mit arterioarteriell entstandenen Emboli (14.5% vs. 7.4%). Dagegen ließen sich keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der betroffenen Hemisphäre bei Schlaganfällen im vorderen Stromgebiet feststellen. Auch die Schwere des Schlaganfalls, gemessen durch den NIHSS, war in den beiden Gruppen nahezu identisch. Patienten mit kardioembolischen Schlaganfällen erhielten im Rahmen ihrer Vormedikation wesentlich häufiger orale Antikoagulantien. Auch kam in dieser Gruppe die lokale Lysetherapie mit rt-PA vermehrt zur Anwendung (10.9% vs. 7.4%). Bridging-Verfahren wurden in beiden Gruppen mit jeweils rund 78% durchgeführt. In der Gruppe der kardioembolischen Embolien verstrich ab Symptombeginn durchschnittlich weniger Zeit bis zur Rekanalisation (204 vs. 229.5 Minuten), wobei die dazu erforderliche Rekanalisationszeit etwas länger war (52 vs. 48.5 Minuten). Zur Validierung der Klassifikation wurde die Emboliklassifikation der beiden Histopathologen (A und B) mit der durch die drei Schlaganfallexperten festgelegten Schlaganfallätiologie verglichen. Für beide Histopathologen ergaben sich signifikante Übereinstimmungen (Tab. 5). Nur bei der Bewertung der arterioarteriellen Emboli erzielte der Histopathologe A ein Ergebnis, bei dem das 95%-Konfidenzintervall die 50%-Marke einer Münzwurf-Entscheidung unterschritt. Im Vergleich erreichte der Histopathologe B etwas bessere Übereinstimmungswerte als sein Kollege A. Bezogen auf die histologische Zuordnung aller zur Verfügung stehenden Emboli ergaben sich für die beiden Pathologen A und B Übereinstimmungswerte von 71.6% bzw. 76.8%. Beide Histopathologen konnten im Vergleich zu den arterioarteriellen Emboli die kardialen Emboli besser identifizieren.

Histologen: A (N=81) / B (N=82)		Histologische Bewertung	
		CARDIO	ARTERIO
Schlaganfallätiologie	kardioembolisch (E1)	39 / 43	15 / 12
	arterioarteriell embolisch (E2)	8 / 7	19 / 20
Übereinstimmung für E1 [%, (95% CI)] A: N=54 / B: N=55		72,2 (58,4 – 83,5) / 78,2 (65,0 – 88,2)	
Übereinstimmung für E2 [%, (95% CI)] A: N=27 / B: N=27		70,4 (49,8 – 86,3) / 74,1 (53,7 – 88,9)	
Übereinstimmung für E1 + E2 [%, (95% CI)] A: N=81 / B: N=82		71,6 (60,5 – 81,1) / 76,8 (66,2 – 85,4)	

Tabelle 5: Vierfeldertafel der Validierungsdaten

Die Schlaganfallätiologie wurde durch eine übereinstimmende Beurteilung dreier unabhängiger Schlaganfallexperten ermittelt. Vorausgesetzt wurden dazu eine umfassende Anamnese sowie eine vollständige Diagnostik hinsichtlich möglicher Schlaganfallursachen. Die histologische Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Histopathologen, die hinsichtlich der bestimmten Schlaganfallätiologie sowie der Patientenhistorie verblindet waren. Die statistischen Werte für den Histologen A stehen vor, die für den Histologen B hinter dem Schrägstrich. CI = Konfidenzintervall.

4.4 Diskussion

Die Entwicklung der histologischen Klassifikation erfolgte in vier Schritten. Zunächst wurden anhand von pathophysiologischen Überlegungen und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zwei Hypothesen in Bezug auf die histologische Beschaffenheit kardialer und arterioarterieller Emboli aufgestellt. Im zweiten Schritt wurden aus den zur Verfügung stehenden histologischen Bewertungskriterien diejenigen mit der höchsten Reliabilität ausgewählt und dann in Übereinstimmung mit den zuvor formulierten Hypothesen zu einer Bewertungsvorschrift kombiniert. Im dritten Schritt wurden Cut-off-Werte durch eine Adjustierung der Klassifikation an Referenzthromben bestimmt. Abschließend wurde die fertige Klassifikation im vierten Entwicklungsschritt in Bezug auf ihre Reliabilität untersucht und einem Validierungsverfahren unterzogen. Diese vier Schritte werden im Folgenden einzeln analysiert.

Die Hypothesen

Die beiden Hypothesen, die besagen, dass kardiale Emboli aus Abscheidungsthromben und arterioarterielle Emboli aus Gerinnungsthromben hervorgehen, basieren auf pathophysiologischen Überlegungen und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Abschn. 4.1). Unterstützt wird die Hypothese zur Beschaffenheit kardialer Emboli insbesondere durch Wysokinski et al., die in ihren Untersuchungen zeigten, dass kardial entstandene Thromben hauptsächlich aus Fibrin, Thrombozyten und Zelltrümmern bestehen [235] und dass die embolisierenden Anteile dieser Gerinnsel rund doppelt so viele thrombozytenreiche Bereiche ausweisen wie die nicht-embolisierenden Thrombusteile. Die Abbildung 30 zeigt duplexsonographische und computertomographische Darstellungen eines Thrombus im Bereich einer stenosierten A. carotis interna (ACI), der zu mehreren embolischen Infarkten führte. Der Thrombus wurde mittels Thrombendarteriektomie (TEA) geborgen und durch die hier entwickelte Klassifikation als typischer Gerinnungsthrombus differenziert, was exemplarisch für die aufgestellten Hypothesen spricht. Andererseits widersprechen unsere Hypothesen der klassischen Annahme, dass frische rote Gerinnsel vornehmlich in Bereichen mit niedrigen Flussgeschwindigkeiten [249] und weiße fibrin- und plättchenreiche Thromben in erster Linie in Gefäßen mit hohen Blutflussgeschwindigkeiten entstehen [243, 244].

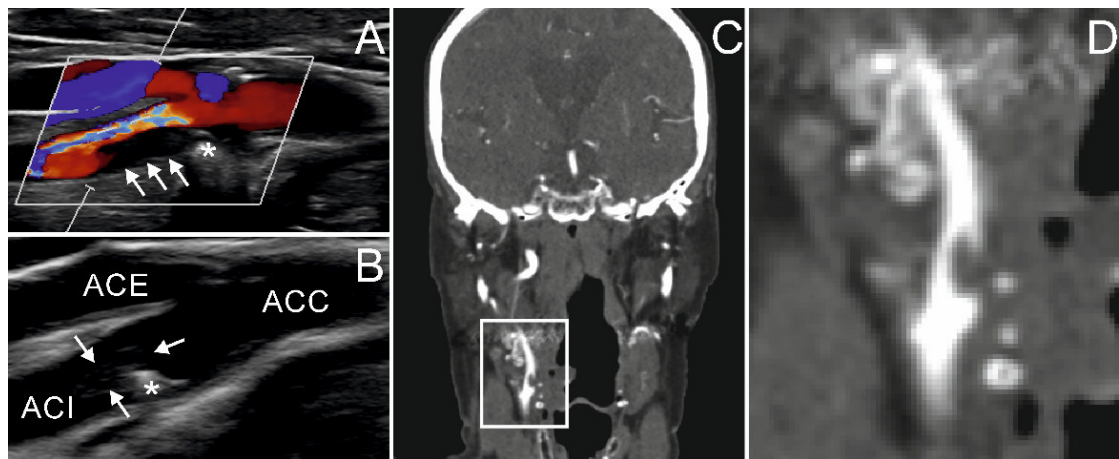


Abbildung 30: Gerinnungsthrombus in der A. carotis interna

Untersucht wurde eine 90jährige Patientin, die zuvor multiple embolische Infarkte im rechten Mediastromgebiet erlitt. A: In der duplexsonographischen Darstellung der ipsilateralen Karotisbifurkation ist eine Stenose (*) in der rechten A. carotis interna (ACI) zu sehen, an der eine Struktur mit geringerer Echogenität hängt (Pfeile). B: Duplexsonographische Verlaufskontrollen belegen, dass sich diese Struktur bewegt und ihre Position im Gefäßlumen verändert hat. C: In der korrespondierenden CT-Angiographie erscheinen die Stenose und die adhäsive Struktur als Kontrastmittelaussparung. D: Vergrößerung des eingerahmten Bildausschnitts in C. Die Patientin unterzog sich einer Thrombendarteriektomie, bei der ein Thrombus geborgen wurde, der sich durch die hier vorgestellte Klassifikation einem Gerinnungsthrombus zuordnen ließ. ACC: A. carotis communis. ACE: A. carotis externa. ACI: A. carotis interna.

Die Entwicklung der Klassifikation aus reliablen histologischen Kriterien

Für die Klassifikation wurden nur solche Kriterien verwendet, die zuvor eine zufriedenstellende Reliabilität aufwiesen. Die Genauigkeit einer histologischen Untersuchung ist allerdings im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden naturgemäß limitiert. Dafür sind im Wesentlichen drei Gruppen von Ursachen zu nennen:

1. Untersucherabhängige Ursachen: Bei einem thrombektomierten Embolus handelt es sich um ein komplexes, heterogenes und anisotropes Material. Bei der histologischen Beurteilung kann niemals das gesamte Blutgerinnsel vollständig untersucht werden, sondern immer nur ein Ausschnitt, der von dem Histopathologen als repräsentativ angesehen wird. Um diesen untersucherabhängigen Fehler so klein wie möglich zu halten, wurden Serienschnitte angefertigt und auf einem Objektträger fixiert. Auf diese Weise konnten beide Histopathologen weite Bereiche der Blutgerinnsel durchmustern, bevor sie ihre histologische Bewertung trafen.

Die Resultate der histologischen Bewertung bleiben aber weiterhin abhängig von der Erfahrung der Histopathologen. Zu Beginn unserer Studie verfügte Untersucher A bereits über eine umfassende Expertise, während sich der Untersucher B erst in das Verfahren einarbeiten musste. Dementsprechend fällt die Intraraterreliabilität des Histopathologen B

schlechter aus als die seines Kollegen. Der Untersucher B durchlief im Rahmen der Studie einen Lernprozess. Danach lag die Übereinstimmung zwischen den beiden Histopathologen bei der Klassifikation der Emboli von Schlaganfallpatienten bei fast 70% (Tab. 4).

2. Methodische Ursachen: Klassifikationen können nur dann eine hohe Reliabilität erzielen, wenn die zugrundeliegenden Begriffe und Definitionen eindeutig, präzise und gleichzeitig möglichst einfach zu verstehen sind. In den Bland-Altman-Diagrammen (Abb. 25 - 27) ist zu sehen, dass die Beurteilung der Ausprägungsformen aller kontinuierlich skalierten Kriterien im mittleren Bereich am schwierigsten ist. Uneindeutige Fälle bereiten also auch dem professionellen Untersucher Probleme. Da sowohl Über- als auch Unterschätzungen im Rahmen der hier vorliegenden dichotomen Klassifikation leicht zu einem völlig anderen Ergebnis führen, ist die histologische Beurteilung in diesem Bereich besonders fehleranfällig. Möglicherweise ist es sinnvoll, solche Grenzfälle zukünftig als "uneindeutig" zu bewerten. In jedem Fall sollten aber die histologischen Kriterien weiter optimiert und verfeinert werden. Für die Intraraterreliabilität spielt der Abstand zwischen den beiden Untersuchungen eine entscheidende Rolle. In dieser Studie wurde ein Intervall von sechs Monaten gewählt.
3. Probenabhängige Ursachen: Zu kleine Gerinnsel, unzureichende Färbungen oder Präparationsartefakte sind hier als wesentliche Fehlerquellen zu nennen. Auch in der vorliegenden Studie war in einigen Fällen die Qualität der histologischen Präparate so schlecht, dass eine erneute Beurteilung nicht mehr durchgeführt werden konnte. Der Großteil der Proben konnte jedoch auch noch nach sechs Monaten für eine zweite Untersuchung verwendet werden, was für die Praktikabilität des Verfahrens spricht.

Die Festlegung der Cut-off-Werte und abschließende Formulierung der Klassifikation

Die erfolgreiche Adjustierung der Klassifikation an Referenzthromben liefert die benötigten Cut-off-Werte der dichotomen Beurteilung und spricht gleichzeitig für die zugrundeliegenden Hypothesen. Allerdings müssen dabei folgende Limitationen berücksichtigt werden:

1. Die Anzahl der Referenzthromben (N=11) ist zu gering, um eine signifikante Korrelation zwischen der histologischen Beurteilung und der Ätiologie der Referenzthromben nachzuweisen (Tab. 3). Außerdem hätten die Cut-off-Werte mit einem größeren Probenumfang genauer bestimmt werden können.

2. Bei den Referenzthromben handelt es sich nicht um zerebrale Emboli. Nur bei einer eindeutigen ätiologischen Zuordnung zerebraler Emboli wären diese als Referenzthromben in Frage gekommen. Dies ist jedoch nicht möglich. Bei den hier verwendeten Referenzthromben können lediglich die kardialen Thromben in ein Hirngefäß embolisieren. Die Gerinnsel aus den Koronararterien müssen dagegen nicht zwangsläufig Thromben gleichen, die im Rahmen einer Arteriosklerose in einer stenosierten hirnversorgenden Arterie entstehen. Allerdings fanden Silvain et al. bei koronaren Thromben den gleichschichtförmigen Aufbau eines gemischten Thrombus, so wie er bei größeren arteriellen Gefäßen und somit auch für die extrakraniellen Hirngefäße vorgefunden wird [226]. Die Annahme, dass sich Thromben aus arteriosklerotisch veränderten Koronararterien und arterioarterielle Emboli der ACI ähneln, wird außerdem durch die bereits anerkannte Theorie unterstützt, dass der Übergang von einer stabilen zu einer instabilen Plaque in beiden Fällen durch Einblutungen in die Plaque induziert wird [231, 250].
3. Die histologische Beschaffenheit der Referenzthromben wird durch viele Faktoren beeinflusst. Dazu zählt neben der An- oder Abwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren insbesondere die medikamentöse Vorbehandlung des Patienten. Diese Einflussnahme hat vermutlich auch Einfluss auf die adjustierten Cut-off-Werte, nicht aber auf die Reproduzierbarkeitsdaten der Klassifikation.
4. Die Klassifikation beruht auf einer Kombination aus drei histologischen Kriterien, die durch Cut-off-Werte eine dichotome Zuordnung der Proben zu den beiden Gruppen "kardiale Emboli" und "arterioarterielle Emboli" erlauben. Diese Konstruktion lässt sich zwar pathophysiologisch begründen, ist aber letztendlich willkürlich. Alternativ hätte man die Kriterien hinsichtlich ihrer Bedeutung auch gewichten können. Um eine Optimierung der Klassifikation zu erzielen, bedarf es einer deutlich höheren Anzahl geeigneter Referenzthromben. Aktuell spannen die gleichberechtigten Kriterien einen dreidimensionalen Parameterraum auf (Abb. 28). Mit Sicherheit entspricht dieses Artefakt nicht der wesentlich komplexeren Wirklichkeit.
5. Die Klassifikation berücksichtigt lediglich zwei Embolustypen. Dies entspricht natürlich nicht der pathophysiologischen Realität. Allerdings war es auch nicht das Ziel, alle Gerinnselarten zu differenzieren, sondern nur die beiden mehrheitlich auftretenden Embolusarten, die zu proximalen Gefäßverschlüssen führen, also die kardialen und die arterioarteriellen Emboli.

Die Reliabilität und Validität der Klassifikation

In Tabelle 4 finden sich die Reliabilitätswerte der beiden Histopathologen für ihre abschließenden Beurteilungen eines Embolus. Die Werte sind ein Maß dafür, wie konsistent die Bewertung der Embolusgenese mithilfe der entwickelten Klassifikation ist. Es wurde bereits erwähnt, dass der Untersucher B erst im Laufe der Studie Erfahrungen mit der histologischen Bewertung von Blutgerinnseln sammeln konnte. Dementsprechend niedrig fallen seine Intraraterreliabilität (68.2%) bzw. der errechnete Kappa-Wert (0.36; "ausreichend") aus. Im Gegensatz dazu war der Untersucher A bereits Experte auf diesem Gebiet, änderte daher im Verlauf der Studie seine Aussagen wesentlich seltener und erreichte eine Intraraterreliabilität von 92.9% bzw. einen Kappa-Wert von 0.81 ("gut"). Am Ende der Studie lag die Interraterreliabilität bei rund 70%. Einschränkend muss erwähnt werden, dass diese Zahlen aufgrund der niedrigen Fallzahl große Konfidenzintervalle haben. Sie weisen jedoch auch darauf hin, dass gut ausgebildete Histopathologen verlässliche Aussagen liefern und dass bei gleichem Ausbildungsstand auch übereinstimmende Beurteilungen unabhängiger Untersucher zu erwarten sind. Damit erscheint die Methode geeignet zu sein, um sie in der klinischen Routine an verschiedenen Standorten einsetzen zu können. Unerfahrene Histopathologen sollten allerdings eine entsprechende Schulung durchlaufen.

Zur Validierung der Klassifikation musste zunächst die Ätiologie der histologisch begutachteten Emboli so sicher wie möglich bestimmt werden. Drei Schlaganfallexperten wurden dazu für jeden Fall die umfassende Anamnese sowie alle Befunde der kompletten Schlaganfalldiagnostik vorgelegt, bevor sie unabhängig voneinander die Schlaganfallätiologie nach den ESUS-Kriterien bestimmen sollten. Die Ätiologie wurde nur dann als sicher gewertet, wenn die Einschätzung aller Experten übereinstimmte. Andernfalls wurde der Fall als ESUS klassifiziert. Die so bestimmte Schlaganfallätiologie diente dann als Referenz zur Validierung der histologischen Ätiologiebestimmung der Emboli. Die Häufigkeitsverteilung der durch die Experten ermittelten Schlaganfallätiologien (vgl. S. 98) entspricht den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen [13, 251]. Die Ätiologiebestimmung der Schlaganfallexperten scheint also sinnvoll gewesen zu sein. Eine fehlerfreie Ätiologiebestimmung ist mit diesem Verfahren allerdings nicht garantiert. Für eine weitgehend korrekte Bestimmung sprechen jedoch die Basischarakteristika der Patienten, deren Emboli zur Validierung herangezogen wurden (Tab. 1). Sie spiegeln bereits bekannte Erkenntnisse über Prädiktoren kardio- und arterioarteriell embolischer Schlaganfälle wider.

So finden sich in der Gruppe der kardioembolischen Schlaganfälle erwartungsgemäß weit mehr Patienten mit einem Vorhofflimmern oder einer oralen Antikoagulation in der Vormedikation, da das Vorhofflimmern die häufigste Ursache kardial bedingter Ischämien ist [252–255] oder auf eine endotheliale Dysfunktion hinweist, die für die Thrombusentstehung zunehmend verantwortlich gemacht wird [237]. In der Gruppe der arterioarteriell embolischen Schlaganfälle weisen dafür die Patienten ein größeres kardiovaskuläres Risikoprofil und insbesondere einen deutlich höheren Nikotinkonsum auf, was bekanntlich die Entstehung einer Arteriosklerose und damit von Stenosen begünstigt [256–258]. Auch das häufigere Auftreten von Basilarisverschlüssen im Rahmen einer kardioembolischen Infarktgenese entspricht den Ergebnissen anderer Studien [259–261]. Laut der Basischarakteristika unserer Studie ist die Rekanalisationszeit kardialer Embolien etwas länger als bei arterioarteriellen Embolien. Auch dies wird durch Daten anderer Forschungsgruppen bestätigt [201]. Sporns et al. fanden verlängerte Interventionszeiten in Zusammenhang mit fibrinreichen Emboli [262], die laut unserer Klassifikation mit einer kardialen Genese assoziiert wären. Diese Gerinnsel erweisen sich als solide, zäh und klebrig und erschweren daher die mechanische Rekanalisation [202, 224, 263]. Umgekehrt fanden viele Arbeitsgruppen, dass erythrozytenreiche Emboli, denen durch die entwickelte Klassifikation vermutlich eine arterioarterielle Genese zugeschrieben worden wäre, mit einer höheren Rekanalisationsrate verknüpft sind [201, 202, 213, 214, 218, 219, 224, 262, 264]. Offensichtlich wirken sich die genannten Basischarakteristika, möglicherweise im Sinne von Prädiktoren, auf die histologische Zusammensetzung der Emboli aus. Die Tatsache, dass die Klassifikation erfolgreich validiert werden konnte (vgl. Tab. 5), wird dadurch aber nicht beeinträchtigt.

Bei der Validierung unterschritt das Konfidenzintervall lediglich bei der Zuordnung der arterioarteriellen Emboli durch Untersucher A knapp die 50%-Schwelle. Ansonsten lagen die Vorhersagegenauigkeiten der Klassifikation für beide Histopathologen zwischen 70 und 78%. Demnach erscheint diese Form der histologischen Beurteilung geeignet für eine Differenzierung zwischen kardialen und arterioarteriellen Emboli. Beiden Untersuchern fiel die Klassifizierung kardialer Emboli leichter. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Cut-off-Werte den dreidimensionalen Parameterraum zugunsten der kardialen Emboli in ungleichgroße Bereiche aufteilen (Abb. 28).

Trotz der erwähnten Einschränkungen kann die entwickelte Klassifikation als erster Schritt in Richtung einer histologischen Entscheidungshilfe bei der Differenzierung kardialer und arterioarterieller zerebraler Emboli verstanden werden.

Beurteilung der Klassifikation vor dem Hintergrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen

Im Jahr 2017 veröffentlichten Brinjikji et al. eine Meta-Analyse über die Korrelation zwischen Embolushistologie und Schlaganfallätiologie [214]. Aus allen zu diesem Thema zwischen Januar 2005 und Dezember 2015 publizierten Studien wurden neun Studien ausgewählt. Die Meta-Analyse umfasst damit insgesamt 302 Patienten, die einen proximalen embolisch bedingten Gefäßverschluss erlitten und infolge dessen thrombektomiert wurden. In der Untersuchung wurde nur zwischen einer kardialen und einer arterioarteriellen Genese der Emboli unterschieden. In fünf Studien ließ sich keine Korrelation zwischen der Embolushistologie und der Schlaganfallätiologie nachweisen [245, 265–268]. Zwei Studien fanden eine Assoziation zwischen kardialen Emboli und einer erhöhten Erythrozytenzahl bei gleichzeitig geringerem Fibrinanteil [203, 236]. Im Gegensatz dazu kam in der Untersuchung von Niesten et al. heraus, dass in arterioarteriellen Emboli ein höherer Erythrozytenanteil zu finden ist [204]. Die Arbeitsgruppe von Boeckh-Behrens zeigte schließlich, dass kardiale Emboli mehr Leukozyten enthalten und durch ein höheres Maß an Organisation charakterisiert sind [201]. Die Meta-Analyse kam zu dem Schluss, dass aufgrund der zu geringen Fallzahl und der inkonsistenten Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen keine Korrelation zwischen Embolushistologie und Schlaganfallätiologie belegt werden kann. Allerdings wurde darauf hingewiesen, dass die meisten Studien ohne immunhistochemische Färbungen durchgeführt worden waren und damit nicht so aussagekräftig seien. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass drei [203, 204, 236] der vier Studien, die eine Korrelation zwischen Histologie und Ätiologie aufzeigen konnten, immunhistochemische Verfahren einsetzten.

Die hier entwickelte Klassifikation bedient sich der CD61-Antikörperfärbung zur Beurteilung der Thrombozyten und erfüllt damit die Anforderungen, die von den Autoren der Meta-Analyse an eine ausreichende histologische Aufarbeitung der Blutgerinnsel gestellt werden. Die erfolgreiche Validierung unserer Klassifikation steht in Einklang mit den Erkenntnissen der in der Meta-Analyse integrierten Studien von Boeckh-Behrens und Niesten [201, 204]. Darüber hinaus entspricht die entwickelte Klassifikation den Ergebnissen zweier neuer

Studien, in denen kardiale Emboli signifikant höhere Anteile an Fibrin, Thrombozyten und Leukozyten bei gleichzeitig verminderter Erythrozytenzahl aufwiesen [205, 212, 213]. Diese Ergebnisse werden durch zwei weitere Arbeiten unterstützt, bei denen eine signifikant höhere Erythrozytendichte in arterioarteriellen Emboli und größere Fibrinansammlungen in kardialen Emboli gefunden wurden, wobei die zuletzt genannten Gerinnsel auch noch einen höheren Grad der Organisation zeigten [211, 218].

Allerdings finden sich in der Literatur auch Untersuchungen, bei denen in kardialen Emboli ein höherer Anteil an Erythrozyten [217, 219] und ein schwächer ausgebildetes Fibrinnetz gefunden wurde [217]. Fitzgerald et al. berichten von signifikant größeren Thrombozytenanteilen in Emboli, die im Zuge einer Arteriosklerose entstanden [216].

Die Aussagen der bislang zu diesem Thema durchgeführten Studien sind also widersprüchlich. Allerdings stimmen mittlerweile nicht nur die meisten [201, 204, 205, 211–213, 215, 218], sondern auch die beiden Studien mit den größten Fallzahlen [205, 213] mit unserer Klassifikation bzw. mit deren erfolgreichen Validierung überein. Innerhalb der Studiengruppe, in der immunhistochemische Verfahren verwendet wurden, spricht ebenfalls die Mehrzahl (drei von vier) für die hier validierte Korrelationsvorschrift [204, 205, 211]. Von den insgesamt fünf Studien, die unserem Ansatz widersprechen [203, 216, 217, 219, 236] wurden die meisten (vier von fünf) mit asiatischen Patienten durchgeführt. Weiterhin finden sich fünf Studien, die keinerlei Korrelation zwischen der Embolushistologie und der Schlaganfallätiologie nachweisen konnten [245, 265–268]. Nur in einer dieser Studien wurde eine immunhistochemische Färbung verwendet [267]. In Tabelle 6 sind die hier erwähnten Studien und deren wesentliche Merkmale übersichtlich zusammengestellt.

Allen bislang durchgeführten Studien ist gemeinsam, dass sie auf deskriptiven Gruppenvergleichen beruhen. Emboli mit einer bereits gesicherten kardialen oder arterioarteriellen Genese wurden histologisch verglichen, um signifikante Unterschiede zu detektieren. Im Gegensatz dazu wurde die hier präsentierte Klassifikation entwickelt, um im Rahmen der stationären Behandlung thrombektomierter Patienten im individuellen Fall eine frühzeitige Festlegung der Sekundärprophylaxe auf histologischem Wege zu ermöglichen. Zielgruppe wären dabei Patienten mit proximalen embolischen Gefäßverschlüssen, deren Ursache trotz vollständiger Diagnostik unklar bleibt. Wie unsere eigene Ätiologieanalyse belegt, sind solche Patienten mit einem ESUS häufig (vgl. S. 98). Es ist bekannt, dass gerade in dieser Patientengruppe das Risiko erneuter Schlaganfälle hoch ist [269].

Erstautor, Publikationsjahr	Probenanzahl	Histologische Verfahren	Ergebnis
Marder*, 2006 [245]	25 (15 / 4)	HE	0
Liebeskind*, 2011 [265]	50	HE	0
Sato*, 2012 [236]	17 (11 / 6)	HE, GPIIb/IIIa, Glycophorin A und Fibrin	NEIN
Niessen*, 2014 [204]	22 (6 / 8)	HE, Mallorys phosphotungstische Säure-Hämatoxylin, Glycophorin A, CD31	JA
Singh*, 2014 [268]	49	HE	0
Kim*, 2015 [203]	37 (22 / 8)	HE, GPIIIa, CD61	NEIN
Sallustio*, 2015 [266]	28 (11 / 17)	HE, Mallorys phosphotungstische Säure-Hämatoxylin	0
Simons*, 2015 [267]	40 (21 / 19)	HE, CD34	0
Ahn, 2016 [211]	36 (22 / 8)	HE, Martius Scarlet Blue, CD42b	JA
Boeckh-Behrens*, 2016a [201]	34 (16 / 3)	HE, EvG	JA
Boeckh-Behrens, 2016b [213]	136 (67 / 22)	HE	JA
Sporns, 2017 [205]	187 (77 / 35)	HE, EvG, Preußischblau, CD3, CD20, CD68/KiM1P	JA
Berndt, 2018 [212]	32 (19 / 4)	HE	JA
Maekawa, 2018 [218]	43 (30 / 5)	HE	JA
Shin, 2018 [219]	37 (22 / 7)	HE	NEIN
Duffy, 2019 [215]	60	HE, Martius Scarlet Blue	JA
Fitzgerald, 2019 [216]	105	HE, Martius Scarlet Blue	NEIN
Gong, 2019 [217]	45 (36 / 9)	HE	NEIN

Tabelle 6: Studien zur Korrelation zwischen Embolushistologie und Schlaganfallätiologie seit Januar 2005

Studien, die in die Meta-Analyse von Brinjikji et al. [214] aufgenommen wurden, sind mit einem Stern markiert. Probenanzahl: Angegeben ist die Gesamtzahl aller histologisch untersuchten Gerinnsel. Sofern es den entsprechenden Veröffentlichungen zu entnehmen war, steht innerhalb der runden Klammer die Anzahl der kardialen Emboli vor und die der arterioarteriellen Emboli hinter dem Schrägstrich. Histologische Färbetechniken: HE = Hämatoxylin-Eosin; GPIIb/IIIa = Plättchenglykoprotein IIb/IIIa; Glycophorin A = Membranprotein von Erythrozyten; Fibrin = Fibrin-Antikörper; EvG = Elastica-van-Gieson; CD3, CD20, CD31, CD34, CD42b, CD61, CD68/KiM1P = Verschiedene Membranproteine. Ergebnis: Mit einem „JA“ sind Studien gekennzeichnet, deren Ergebnisse die Hypothesen unterstützen, auf denen die hier vorgestellte Klassifikation beruht. Andernfalls wurden die Studien mit einem „NEIN“ versehen. Die „0“ markiert Studien, die überhaupt keine Korrelation nachweisen konnten.

Der Informationsgehalt der hier zitierten Studien wird dadurch limitiert, dass es sich um monozentrische Studien mit begrenzten Fallzahlen, insbesondere in Bezug auf arterioarterielle Emboli, handelt. Darüber hinaus lassen sich immer nur solche Emboli untersuchen, die sich einerseits nicht systemisch lysieren, sich aber andererseits mechanisch thrombektomieren ließen. Dadurch beinhalten alle Studien eine Selektionsverzerrung. Des Weiteren ist zu bedenken, dass der extrahierte und histologisch untersuchbare Gerinnselteil nicht zwangsläufig repräsentativ für die Zusammensetzung des gesamten gefäßverschließenden Embolus sein muss. Auch wird die histologische Beschaffenheit der Emboli selbst innerhalb einer ätiologischen Gruppe heterogen sein, da diese von zu vielen Faktoren abhängig ist. Dazu zählen u.a. die Vormedikation, die angewandte Akuttherapie und das Alter des Gerinnsels sowie vermutlich auch die Anzahl der erforderlichen Thrombektomiemanöver [215]. Schließlich bleibt immer unklar, ob das extrahierte Gerinnsel

tatsächlich aus der Verschlussstelle oder aus einem proximal oder weiter distal davon gelegenen Gefäßbereich stammt.

Der Vergleich der Studienergebnisse wird schließlich dadurch erschwert, dass die Fallzahlen stark variieren, die Patienten verschiedenen Ethnien angehören, unterschiedliche interventionelle sowie histologische Techniken angewandt und die histologischen Präparate abschließend auch noch uneinheitlich ausgewertet wurden. Hilfreich wäre in diesem Zusammenhang ein durch Experten festgelegtes Standardverfahren mit einer einheitlichen Nomenklatur um anschließend eine multizentrische Studie initiieren zu können.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung einer histologischen Klassifikation vorgestellt, die der Differenzierung kardial und arterioarteriell verursachter zerebraler Emboli dienen soll. Die Klassifikation beruht auf den pathophysiologisch gut begründbaren Hypothesen, dass kardiale Emboli aus Abscheidungsthromben und arterioarterielle Emboli aus Gerinnungsthromben hervorgehen. Die Klassifikationskriterien erwiesen sich als ausreichend reproduzierbar. Die zur dichotomen Differenzierung erforderlichen Cut-off-Werte wurden durch eine Adjustierung an Referenzthromben bestimmt. Die Reproduzierbarkeit und Validität der Klassifikation wurde anhand von Emboli thrombektomierter Patienten erfolgreich überprüft. Die Methode ist schnell und einfach durchzuführen und im Vergleich zu anderen apparativen Diagnoseverfahren günstig. Es ist das erste publizierte Klassifikationsverfahren, das bei individuellen Patienten mit einem embolischen Verschluss eines proximalen Hirngefäßes Hinweise für die Schlaganfallätiologie liefert, wobei nur zwei – allerdings die mit Abstand häufigsten – Ursachen berücksichtigt werden, nämlich die kardiale und die arterioarterielle Genese thrombotischer Emboli. Die Übereinstimmung zwischen der Klassifikation der Embolushistologie und der durch Schlaganfallexperten festgelegten Schlaganfallätiologie liegt im Bereich von 70 – 78%. Damit könnte die Sekundärprophylaxe insbesondere bei Patienten mit einem ESUS früher und mit größerer Sicherheit festgelegt werden. Die Aussagen der Klassifikation befinden sich in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der bislang zu diesem Thema veröffentlichten deskriptiven Studien.

Limitiert wird das entwickelte Klassifikationsverfahren durch die naturgemäß niedrige Reliabilität histologischer Verfahren, die nicht standardisierte Probengewinnung und eine

gleichzeitig nicht zu vermeidende Selektionsverzerrung. Zukünftig sollten sowohl die Qualität als auch die Quantität der Referenzthromben gesteigert werden, um die Cut-off-Werte und damit auch die Klassifikation zu optimieren.

Schließlich sollte über eine Konsentsentscheidung von Experten ein Standardverfahren bzgl. der Gewinnung, der histologischen Aufarbeitung und der Bewertung zerebraler Emboli entwickelt werden. Auf dieser Basis könnte mit Hilfe einer multizentrischen, prospektiven Studie und anhand entsprechend hoher Fallzahlen das histologische Klassifikationsverfahren auch in Hinblick auf ESUS-Patienten validiert werden. Die Patienten müssten dann so lange nachverfolgt und diagnostiziert werden, bis sich die tatsächliche Schlaganfallätiologie bestimmen lässt. Aktuell konnte die Klassifikation nur für Patienten mit einem gesicherten kardialen oder arterioarteriellen Embolus validiert werden.

Auch ließen sich über eine solche multizentrische Studie klinische, laborchemische oder bildgebungstechnische Prädiktoren für die unterschiedlichen Schlaganfallätiologien bestimmen, die in der aktuellen Studie derzeit nur mögliche Kovarianten hinsichtlich der histologischen Beschaffenheit des Embolus darstellen.

5 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 2006 – 2015 geplant und durchgeführt. Zu dieser Zeit stellte die intravenöse Behandlung mit rt-PA die einzige durch die FDA zugelassene Therapieform des akuten ischämischen Schlaganfalls dar. Für den Einsatz des rt-PAs gab es eine Vielzahl von Kontraindikationen, die zum Teil lediglich auf den in den Zulassungsstudien definierten Ausschlusskriterien beruhten und für die es ansonsten keine weitere Evidenz gab.

Im Verlauf der letzten Jahre lässt sich eine zunehmende Individualisierung in der Akuttherapie ischämischer Schlaganfälle feststellen. Durch eine Verknüpfung der klinischen Untersuchung mit der Anamnese sowie den Ergebnissen der multimodalen Bildgebung wird derzeit die Behandlungsstrategie für jeden Patienten individuell unter Einhaltung von Richtlinien festgelegt. Auf diese Weise können auch Patienten mit einem überschrittenen oder unklaren Zeitfenster von einer systemischen rt-PA-Therapie profitieren [270–272]. Allerdings ist die Wirksamkeit des rt-PAs limitiert und im Falle maligner Grunderkrankungen, der Einnahme von Antikoagulantien oder eines therapierefraktären entgleisten Hypertonus ist dessen Anwendung kontraindiziert.

Die Thrombektomie mittels Stent-Retriever stellt mittlerweile den Gold-Standard für die Behandlung proximaler Gefäßverschlüsse dar. Sie kann auch dann eingesetzt werden, wenn für die systemische Lyse eine absolute Kontraindikation vorliegt. Trotz ihrer zunehmenden Verbreitung kann die Thrombektomie aber nur in Kliniken mit einer entsprechenden Ausrüstung und dem entsprechenden Fachpersonal sowie bei Nachweis eines proximalen Gefäßverschlusses durchgeführt werden.

Für viele klinische Konstellationen gibt es somit nach wie vor keine zufriedenstellende Behandlungsoption. Deshalb hat die Suche nach alternativen oder supportiven Verfahren zur akuten Therapie und zur frühzeitigen Festlegung der passenden Sekundärprophylaxe des ischämischen Schlaganfalls weiterhin große Bedeutung. Die vorliegende Arbeit widmete sich diesen Themen und rückte dabei den Thrombus in den Fokus der Untersuchungen.

Erstes Ziel der präklinischen Experimente dieser Arbeit war die Bewertung neuer Thrombolyseverfahren im Vergleich zur rt-PA-Standardtherapie anhand der Lysierbarkeit des

Thrombus. Dazu wurden aufwendige Versuchsmodelle und ein spezielles Gerinnungsprotokoll zur Standardisierung der Untersuchungsbedingungen entwickelt.

Das Gerinnungsverfahren generiert plättchenreiche Thromben mit einem starken Fibrinnetz, wodurch die Thromben physiologischen Druck- und Flussverhältnissen standhalten und eine hohe histologische Übereinstimmung mit in vivo entstandenen Thromben aufweisen, die mittels Thrombektomie gewonnen wurden. Das entwickelte Gerinnungsprotokoll eignet sich damit insbesondere für Untersuchungen individueller Therapieverfahren an rt-PA-resistenten Thromben.

Zur Beurteilung der thrombolytischen Wirksamkeit der einzelnen Verfahren wurden sowohl die Gewichtsabnahme des Thrombus als auch seine histologische Beschaffenheit analysiert, wobei unterschiedliche Färbungen und die Transmissionselektronenmikroskopie zur Visualisierung der Fibrinstruktur verwendet wurden. Dadurch ließen sich neue Einblicke in die Wirkungsweise der Thrombolyseverfahren, insbesondere in die des Ultraschalls, gewinnen. Als weitere innovative Messmethode gestattet das dynamische Flussmodell eine direkte Beurteilung des Rekanalisationserfolgs sowohl durch die Bestimmung des Flusswiderstands des Thrombus als auch durch die duplexsonographische Ermittlung des TIBI-Scores. Das Flussmodell liefert somit, unter physiologischen Druck- und Flussverhältnissen, zeitkontinuierliche Informationen über die Thrombolyse, die sich direkt auf die klinische Anwendung übertragen lassen.

Während in den vorliegenden Experimenten zunächst nur in vitro generierte Thromben zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Lysestrategien verwendet wurden, soll zukünftig auch die Lysierbarkeit von in vivo entstandenen Blutgerinnseln untersucht werden, die mittels Thrombektomie aus verschlossenen Gefäßen akuter Schlaganfallpatienten entfernt wurden. Die entsprechenden Modifikationen am Versuchsstand wurden bereits realisiert. Damit lässt sich die Effektivität neuartiger Thrombolyseverfahren an klinisch gewonnenen Thromben unter standardisierten Bedingungen untersuchen. Besonders vielversprechend erscheinen in diesem Zusammenhang Lyseexperimente mit einer Kombination aus rt-PA und DNase-I [273, 274]. Solche Experimente könnten die Grundlage für weiterführende klinische Studien schaffen.

2015 waren weder Desmoteplase (DSPA) noch Tenecteplase (TNK) und auch nicht die Sonothrombolyse zur Akuttherapie des Schlaganfalls zugelassen. Als dieser Text im Februar

2021 verfasst wurde, stammten die aktuellsten Leitlinien zur Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls von der American Heart Association und der American Stroke Association [275]. Im Gegensatz zum Jahr 2015 wird in diesen Leitlinien zum alternativen Einsatz von TNK als Einmalbolus (0.25 mg/kgKG, maximal 25 mg) im Rahmen einer Bridging-Therapie vor einer mechanischen Thrombektomie geraten. Diese Klasse-IIb-Empfehlung basiert auf den Ergebnissen der EXTEND-IA-Studie [74] (vgl. S. 14). Darüber hinaus wird die Einzelbolusgabe von TNK in einer Dosierung von 0.4 mg/kgKG als Alternative zu rt-PA auch bei akuten Schlaganfallpatienten mit einem geringen funktionellen Defizit (NIHSS \leq 4) und gleichzeitig fehlendem Nachweis für einen intrakraniellen Hauptastverschluss empfohlen (Empfehlungsstärke IIb). Grundlage dafür liefern die bereits auf den Seiten 13 ff. beschriebenen klinischen Studien [70–73]. Der Einsatz anderer Thrombolytika oder die adjuvante Sonothrombolyse werden in den amerikanischen Leitlinien ausdrücklich nicht empfohlen. Die überarbeiteten Leitlinien zur Schlaganfallakuttherapie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie lagen noch nicht vor. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie keine gravierenden Abweichungen enthalten werden.

In den hier vorgestellten Experimenten erwies sich, passend zu den eben genannten Empfehlungen, die TNK sowohl allein, als auch in Kombination mit diagnostischem Ultraschall einer entsprechenden Therapie mit rt-PA überlegen. Weiterführende klinische Studien zur vollständigen Etablierung dieser Substanz und zur Auslotung von Anwendungsvorteilen gegenüber rt-PA sind demnach sicherlich angebracht.

Auch die DSPA zeigte in unseren Untersuchungen eine signifikant größere thrombolytische Wirksamkeit als rt-PA. Nach den enttäuschenden, aber auch umstrittenen Ergebnissen der DIAS-3- und DIAS-4-Studie (vgl. S. 11 ff.) stoppte jedoch das dänische Pharmaunternehmen Lundbeck die Produktion dieses Medikaments, so dass für weiterführende Untersuchungen zur Zeit keine klinische Perspektive mehr besteht.

Die zunächst euphorische Einschätzung der thrombolytischen Wirkung des Ultraschalls musste im Verlauf der vergangenen Jahre relativiert werden (vgl. S. 57 ff.). Die zuletzt durchgeführte CLOTBUST-ER-Studie wurde vorzeitig abgebrochen, nachdem die Kombinationsbehandlung aus rt-PA und zweistündiger Sonothrombolyse mit einer fest am Kopf des Patienten montierten 2 MHz-Schallsonde zu keiner signifikanten Verbesserung des Behinderungsgrades nach drei Monaten verglichen mit der rt-PA-Monotherapie führte. Dementsprechend findet sich in den aktuellen Leitlinien auch keine Anwendungsempfehlung

für die Sonothrombolyse. Auch unsere Messungen zeigten, dass der diagnostische transkranielle Ultraschall die thrombolytische Wirkung aller getesteten Thrombolytika (rt-PA, DSPA und TNK) zwar steigert, aber die Lyserate nicht signifikant verbessert. Der alleinige Einsatz des Ultraschalls bewirkt keine dauerhafte Veränderung am Thrombus. Da die thrombolytische Wirksamkeit des Ultraschalls in Kombination mit Thrombolytika jedoch wiederholt nachgewiesen werden konnte, sind weitere Experimente zur Optimierung der Ultraschallparameter (Sendefrequenz, Schallintensität und Insonationsdauer) unter möglichst physiologischen Bedingungen erfolgsversprechend. Das hier entwickelte hämodynamische Modell bietet dafür alle Voraussetzungen. Eine auf diesem Wege adjustierte kombinierte Therapie aus Sonothrombolyse und Thrombolytikum könnte sich im Sinne eines optimierten Bridging-Verfahrens positiv auf den klinischen Verlauf von Patienten auswirken, die zur Durchführung einer Thrombektomie in ein anderes Krankenhaus verlegt werden müssen. Diese Vermutung wird durch die post-hoc-Analyse der CLOTBUST-ER-Studie bestätigt [276] und soll durch die aktuell laufende TRUST-Studie (NCT03519737) überprüft werden.

Interessant ist auch die Kombination aus Ultraschall und Echosignalverstärkern, insbesondere bei Patienten mit einer Kontraindikation für eine systemische Lyse und gleichzeitig fehlendem Nachweis für einen proximalen Gefäßverschluss und somit fehlender Indikationen für eine Thrombektomie. Die thrombolytische Wirksamkeit dieser Therapieform wurde wiederholt unter in vitro [277] und in vivo Bedingungen [278–280] nachgewiesen. Eine noch größere Wirksamkeit ist von einer Triple-Therapie bestehend aus Ultraschall, Echosignalverstärkern und systemischer Thrombolytika-Applikation zu erwarten. Durch die Wechselwirkung des auf den Thrombus ausgerichteten Ultraschalls und der Microbubbles des Echosignalverstärkers wird die Schwelle zur Auslösung von Kavitationen lokal gesenkt. Dadurch kommt es zu einer selektiven Verstärkung der Thrombolyse am Ort des Gefäßverschlusses [118, 281]. Durch diese lokal begrenzte Effizienzsteigerung ließe sich vielleicht auch die Konzentration des Thrombolytikums und somit das Risiko von Blutungen reduzieren. Schließlich wird mittlerweile auch an Echosignalverstärkern gearbeitet, die selektiv an den Thrombus binden [282, 283] oder dort ein Thrombolytikum freisetzen [149, 284]. Auf diese Weise ließe sich durch den Ultraschall eine lokale Thrombolyse induzieren.

Weitere präklinische Experimente widmeten sich dem Einfluss einer Vormedikation mit Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Thrombolyse. Es konnte gezeigt werden, wie entscheidend die

Entstehungsweise und Zusammensetzung eines Thrombus für dessen Lyserbarkeit ist. Thromben, die unter Einwirkung von ASS entstanden, bildeten ein schwächeres und nur inkomplett vernetztes Fibringerüst aus, was wiederum zu einer deutlichen Steigerung der Lyseraten führte.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der klinischen THROMBEX-Studie der Zusammenhang zwischen Thrombogenese und histologischer Beschaffenheit eines Blutgerinnsels noch einmal aufgegriffen, hier allerdings mit dem Ziel, erstmalig eine histologische Klassifikation zur Differenzierung arterioarterieller und kardialer Emboli zu entwickeln. Die Klassifikation beruht auf den pathophysiologisch gut begründbaren Hypothesen, dass kardiale Emboli aus Abscheidungs- und arterioarterielle Emboli aus Gerinnungsthromben hervorgehen. Im ersten Schritt konnte eine Vorhersagegenauigkeit von 70 – 78% erzielt werden. Die Limitationen histologischer Beurteilungen im Allgemeinen und der hier entwickelten Klassifikation im Speziellen wurden in Abschnitt 4.4 ausführlich erläutert und sollen in zukünftigen Projekten bearbeitet werden. Durch eine größere Anzahl und gleichzeitig verbesserte Auswahl der Referenzthromben wird vermutlich eine Optimierung der Cut-off-Werte und dadurch eine Steigerung der Vorhersagegenauigkeit der dichotomen Klassifikation erzielt werden können. Als zweiter Verbesserungsschritt sollte ein überregional gültiges Standardverfahren erarbeitet werden. Ein solches Verfahren bietet die Grundlage für eine multizentrische, prospektive Studie, in der die verbesserte Klassifikation an Patienten mit einem ESUS („embolic stroke of unknown source“) validiert werden kann. Gelingt dies, gäbe es eine einfach anzuwendende histologische Entscheidungshilfe für die Festlegung der Sekundärprophylaxe individueller Patienten, was insbesondere im Falle der ESUS-Patienten von enormem Vorteil wäre.

Hinsichtlich der Akuttherapie könnten die Daten der THROMBEX-Studie zukünftig genutzt werden, um klinische, anamnestische, laborchemische und bildgebungstechnische Prädiktoren für die histologische Zusammensetzung des schlaganfallauslösenden Blutgerinnsels zu identifizieren. In dem hier vorgestellten Flussmodell könnten für die unterschiedlich beschaffenen Blutgerinnsel individuelle Therapieschemata erprobt und festgelegt werden. Vielleicht wäre es dann anhand solcher Prädiktoren möglich, direkt zu Beginn der Schlaganfallbehandlung Patienten für eine spezifische Therapie zu selektionieren.

Die auf Seite 21 gestellten Fragen lassen sich abschließend wie folgt beantworten:

1. Messbare Veränderungen am Thrombus weisen in präklinischen Untersuchungen eine signifikant stärkere thrombolytische Wirkung der Desmoteplase (DSPA) und der Tenecteplase (TNK) im Vergleich zur rt-PA-Standardtherapie nach. DSPA und TNK scheinen damit als alternative Wirkstoffe für die Behandlung akuter ischämischer Schlaganfälle in Frage zu kommen, zumal sie hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik auch noch Vorteile im Vergleich zu rt-PA aufweisen. Weiterführende klinische Studien sollten daher zumindest im Falle der noch auf dem Markt befindlichen TNK durchgeführt werden. Die zusätzliche Anwendung der Sonothrombolyse in Form des diagnostischen Ultraschalls führt dagegen bei allen Thrombolytika (rt-PA, DSPA und TNK) lediglich zu einer nicht signifikanten Steigerung der Thrombolyse.
2. Unter Anwesenheit von Acetylsalicylsäure bildet sich im Thrombus ein schwächeres und nur inkomplett vernetztes Fibringerüst aus, wodurch es zu einer signifikanten Zunahme der Lysierbarkeit des Thrombus kommt. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass die Struktur eines schlaganfallinduzierenden Gerinnsels unter anderem von der Vormedikation eines Patienten abhängig ist und sich direkt auf die Effizienz der Thrombolyse auswirkt.
3. Es wurde ein einfaches und kostengünstiges histologisches Analyseverfahren entwickelt, das mit einer Treffsicherheit von 70 – 78% embolische Gefäßverschlüsse einer kardialen oder arterioarteriellen Genese zuordnen kann. Nach einer weiteren Optimierung könnte dieses Verfahren als Entscheidungshilfe bei der Festlegung der Sekundärprophylaxe für Schlaganfallpatienten mit konkurrierenden Ursachen oder einer kryptogenen Genese dienen.

Das „Clot is brain“-Konzept, d.h. die Analyse der Thrombusstruktur zur Optimierung der Schlaganfalltherapie, umfasst eine Vielzahl bedeutsamer Fragen, von denen im Rahmen dieser Arbeit lediglich drei beantwortet wurden. Die so gewonnenen Erkenntnisse bestätigen, dass der gefäßokkludierende Clot Dreh- und Angelpunkt einer zunehmend individualisierten Schlaganfallbehandlung ist und dass in der weiteren Erforschung der komplexen Zusammenhänge zwischen der Ätiologie, Beschaffenheit und Lysierbarkeit des Clots ein enormes therapeutisches Potential liegt.

6 Abkürzungsverzeichnis

α	Cronbachs Alpha
ACI	Arteria carotis interna
ANOVA	Varianzanalyse
ASPECTS	Alberta stroke program early computed tomography score
ASS	Acetylsalicylsäure
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DOAK	direktes orales Antikoagulans
DSPA	Desmodus rotundus salivary plasminogen activator; Desmoteplase
ESUS	embolic stroke of unknown source
EvG	Elastica-van-Gieson
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hämatoxylin–Eosin
I_{SPTA}	räumlicher Spitzen- und zeitlicher Mittelwert der Intensität
κ	Cohens Kappa
MI	mechanischer Index
MP	mittlerer arterieller Druck
mRS	modified Rankin Scale
MRT	Magnetresonanztomographie
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
POM	Polyoxymethylen
PFP	plättchenfreies Plasma
PRP	plättchenreiches Plasma
(r)t-PA	(rekombinierter) gewebespezifischer Plasminogenaktivator
SD	Standardabweichung
SEM	Rasterelektronenmikroskop

sICH	symptomatische intrakranielle Blutung
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
T	Temperatur
TCCS	transkranielle, farbkodierte Duplexsonographie
TCD	transkranieller Doppler
TEA	Thrombendarteriektomie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIA	transitorisch ischämische Attacke
TIMI	Thrombolysis In Myokardial Infarction
TNK	Tenecteplase
US	Ultraschall

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Basischarakteristika der Patienten, deren Emboli zur Validierung der THROMBEX-Klassifikation verwendet wurden	85
Tab. 2: Ergebnisse der Intra- und Interraterreliabilitäten der einzelnen histologischen Kriterien.....	92
Tab. 3: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Referenzthromben.....	96
Tab. 4: Reliabilitätswerte der histologischen Beurteilung der Emboli von Schlaganfallpatienten.....	98
Tab. 5: Vierfeldertafel der Validierungsdaten	99
Tab. 6: Studien zur Korrelation zwischen Embolushistologie und Schlaganfallätiologie seit Januar 2005	108

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der Aderlass.....	7
Abb. 2:	Das statische Thrombolysemodell.....	26
Abb. 3:	Das dynamische Flussmodell.....	29
Abb. 4:	Generierung physiologischer Fluss- und Druckverhältnisse.....	30
Abb. 5:	Gestalt und Funktionsweise des Thrombuskorbes	32
Abb. 6:	Sonothrombolyseversuch unter pulsatilen Strömungsbedingungen.....	35
Abb. 7:	Kennlinien des Thrombuskorbes	36
Abb. 8:	Histologischer Vergleich der unterschiedlichen Thromben	41
Abb. 9:	Ergebnis der Stabilitätstestung.....	42
Abb. 10:	Ergebnis der Lyseversuche	43
Abb. 11:	Übersicht der Auswahlkriterien.....	44
Abb. 12:	Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für Desmoteplase (DSPA)	52
Abb. 13:	Resultate der Thrombolyse mit rt-PA, DSPA und diagnostischem Ultraschall.....	54
Abb. 14:	Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für rt-PA	59
Abb. 15:	Ergebnis des Dosisfindungsexperiments für Tenecteplase (TNK)	60
Abb. 16:	Resultate der Thrombolyse mit rt-PA, TNK und diagnostischem Ultraschall.....	61
Abb. 17:	Exemplarische TEM-Aufnahmen nach Durchführung der unterschiedlichen (Sono-) thrombolysen.....	62
Abb. 18:	(Sono-)thrombolyse bei Thromben, die ohne und mit ASS entstanden waren.....	67
Abb. 19:	Der Einfluss des ASS und der Sonothrombolyse auf das Fibrinnetz.....	70
Abb. 20:	Der Einfluss des ASS und der Sonothrombolyse auf die Fibrinfaserdichte	71
Abb. 21:	Schematische Darstellung der ASS-Wirkung am Thrombus.....	72
Abb. 22:	Auswahl geeigneter Emboli zur Validierung der THROMBEX-Klassifikation.....	84
Abb. 23:	Klassifikation der Thrombozytenverteilung.....	87
Abb. 24:	Synopsis histologischer Kriterien und ihrer Ausprägungsformen	88
Abb. 25:	Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung des Verteilungsmusters der Thrombozyten.....	93
Abb. 26:	Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung der Beschaffenheit des Fibrinnetzes.....	94

Abb. 27: Bland-Altman-Diagramm der Intra- und Interraterreliabilität für die Bewertung des Anteils intakter neutrophiler Granulozyten und intakter Erythrozyten.....	95
Abb. 28: Der dreidimensionale Parameterraum der THROMBEX-Klassifikation.....	97
Abb. 29: Typische kardial und arterioarteriell entstandene Emboli.....	97
Abb. 30: Gerinnungsthrombus in der A. carotis interna.....	101

9 Danksagung

Viele Menschen haben mich während der Arbeit an dieser Habilitation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt und begleitet. Dafür bin ich sehr dankbar.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Professor Manfred Kaps und Herrn Professor Günter Seidel, die mich als akademische Lehrer stets unterstützt und gefördert haben. Herr Professor Seidel war es, der mich im Jahr 2006 bei meinem Arbeitsantritt in Lübeck auf die Thematik der Sonothrombolyse aufmerksam machte und damit den Grundstein für diese Arbeit legte. Unter der Leitung von Herrn Professor Kaps konnte ich meine Forschungstätigkeit in Gießen ausweiten. In vielen gemeinsamen Diskussionen erhielt meine Arbeit durch ihn neue wertvolle Impulse. Durch kritisches Hinterfragen der erzielten Ergebnisse steigerte Herr Kaps die Qualität meiner Auswertungen und Publikationen deutlich. Diese beiden Mentoren haben meine Freude an der Forschung über viele Jahre immer wieder neu entfacht und somit meine wissenschaftliche Laufbahn entscheidend beeinflusst.

Herrn Professor Thomas Münte danke ich für sein Vertrauen und die Unterstützung meiner Arbeit in Lübeck. Mit Herrn PD Georg Rojl verbindet mich die freundschaftliche und professionelle Zusammenarbeit an der THROMBEX-Studie. Seine Hilfe bei der Akquise geeigneter Studienpatienten in Lübeck war und ist von entscheidender Bedeutung für das Gelingen dieses Projekts.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin den Doktoranden meiner wissenschaftlichen Arbeitsgruppen, Frau Andrea Teichert, Frau Zhihua Wang, Frau Dr. Sabrina Schumacher, Herrn Tobias Frühwald, Herrn Nils Stöckmann, Herrn Nicolas Kalms und Herrn Florian Jann. Sie alle haben entscheidende Beiträge zu den hier beschriebenen Ergebnissen geleistet. Die gemeinsame Arbeit hat mir immer viel Freude bereitet.

Für die herzliche, vertrauensvolle und stets kompetente Unterstützung bei meiner Arbeit am dynamischen Flussmodell danke ich Herrn Marcus Ohlrich, Herrn Dipl.-Ing. Marc Schmieger, Herrn Dipl.-Ing. Peter-Karl Weber und Herrn Professor Peter Trillenber.

Der Erfolg der THROMBEX-Studie hing in besonderem Maße von der guten Zusammenarbeit mit den beiden Histopathologen Frau Dr. Julika Ribbat-Idel und Herrn Dr. Florian Stellmacher ab. Ich bin sehr froh darüber, sie bei diesem Projekt dabei zu haben und danke beiden für ihre Anregungen, kompetenten Befunde und vor allem für ihre Ausdauer und Geduld. Herrn Professor Stefan Klotz und Herrn Professor Thomas Kurz danke ich für die Gewinnung der

Referenzthromben. Herr PD André Kemmling war und ist mein Ansprechpartner bei neuroradiologischen Fragen. Ich danke ihm für seine nette und professionelle Hilfe sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Frau Lena Borchardt, Frau Susanne Riebau, Frau Susanne Tieze und Frau Anke Wilhoeft haben mir große Dienste bei der Sammlung thrombotischer Emboli und der Kontaktaufnahme zu den Studienpatienten erwiesen. Herr Professor Stephan Borrmann stellte mir freundlicherweise Abbildungen von Wolkenformationen für meine Publikationen und diese Habilitationsschrift zur Verfügung. Herr Dr. Dipl.-Psych. Andreas Sprenger sowie Frau Professor Imke R. König und Herr Helge Hudel halfen mir bei der statistischen Auswertung meiner Daten und Herr PD Ulrich Gärtner unterstützte mich bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Abbildungen. Ihnen allen gilt mein herzlicher Dank.

Bei Fragen zu dem für mich immer wieder erstaunlichen Gerinnungssystem durfte ich Frau Professor Bettina Kemkes-Matthes und Herrn Dr. Jan Henning Marxsen kontaktieren. Für ihre ausführlichen Erklärungen und geduldige Unterstützung bedanke ich mich sehr.

Alle wissenschaftlichen Artikel gingen zum Schluss noch einmal durch die hilfreichen Hände von Frau Stefanie Ruhrig-French, Frau Ana Ivasiuc und Frau Petra Dietz-Ruckstuhl, um sie von meinen Rechtschreib- und Übersetzungsfehlern zu befreien. Auch dafür möchte ich mich bedanken.

Herrn Professor Siegfried Görg sowie Herrn Professor Gregor Bein und allen Mitarbeitern der Transfusionsmedizin in Lübeck bzw. Gießen danke ich für das unermüdliche Sammeln von Spenderblut, das ich für meine Experimente brauchte.

Schließlich möchte ich den unzähligen Probanden, Blutspendern und Studienpatienten für ihre Bereitschaft danken, mich und meine Arbeit vertrauensvoll zu unterstützen.

Wissenschaft ist faszinierend und spannend, kann aber mitunter auch furchtbar mühsam und frustrierend sein. Diese Arbeit hätte ohne den motivierenden Zuspruch vieler treuer Freunde und vor allem meiner Familie nicht gelingen können. Ganz besonders danke ich dabei Eva Roessler, Melanie Kalka, Ulrich Radke und meinen Eltern, Susanne und Peter Roessler, für ihre unendliche Geduld und die Bereitschaft, einen Teil der Last mit mir zu tragen.

Meine Kinder Luca Marie, Ella und Levin haben mir durch ihren Frohsinn und ihre Liebe immer wieder Mut und Kraft zum Weitermachen gegeben. Ich hoffe, dass ihre Neugierde auf die wundervollen Dinge dieser Welt niemals erlischt. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.
The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.
The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

11 Literaturverzeichnis

1. Gomez CR (1993) Editorial: Time is brain! *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 3:1–2. [https://doi.org/10.1016/S1052-3057\(10\)80125-9](https://doi.org/10.1016/S1052-3057(10)80125-9)
2. Heuschmann PU, Busse O, Wagner M et al. (2010) Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland (Frequency and Care of Stroke in Germany). *Aktuelle Neurologie* 37:333–340
3. Mathers C, Fat DM, Boerma JT. (2008) The global burden of disease: 2004 update. World Health Organisation, Geneva, Switzerland
4. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Stroke drops to fourth leading cause of death in 2008. <http://www.cdc.gov/media/pressrel/2010/r101209.html>
5. Eyding J, Hölscher T, Postert T (2007) Transkranielle Neurosonologie beim akuten Schlaganfall. *Dtsch Arztebl International* 104:340–345
6. Nelles G, Diener HC (2002) Prävention und Rehabilitation des Schlaganfalls im Alter (Prevention and rehabilitation of stroke in the elderly). *Internist (Berl)* 43:941–948. <https://doi.org/10.1007/s00108-002-0665-y>
7. Robert-Koch-Institut (2006) *Gesundheit in Deutschland*, Berlin
8. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW et al. (2018) Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137:e67-e492. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>
9. Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO et al. (1997) Acute stroke care and rehabilitation: an analysis of the direct cost and its clinical and social determinants. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 28:1138–1141. <https://doi.org/10.1161/01.str.28.6.1138>
10. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D et al. (2006) Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* 37:1179–1183. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217450.21310.90>
11. Rosamond W, Flegal K, Furie K et al. (2008) Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117:e25-146. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187998>

12. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP et al. (2013) An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44:2064–2089.
<https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318296aeca>
13. Ntaios G, Papavasileiou V, Milionis H et al. (2015) Embolic strokes of undetermined source in the Athens stroke registry: a descriptive analysis. *Stroke* 46:176–181.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007240>
14. Rha J-H, Saver JL (2007) The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 38:967–973. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258112.14918.24>
15. Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM et al. (2001) Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 103:2897–2902.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.103.24.2897>
16. Ackerknecht EH (1992) *Geschichte der Medizin*. Thieme, Stuttgart
17. von Gruber-Gerardy KF, Merz W, Sonnenberg H. (2007) *Meilensteine aus der Geschichte des Schlaganfalls: Von Apoplexia, Blutegeln und moderner Sekundärprävention*. Böhringer Ingelheim Univers. GmbH, Mainz
18. Karenberg A (1998) Johann Jakob Wepfers Buch über die Apoplexie (1658). Kritische Anmerkungen zu einem Klassiker der Neurologie (Johann Jakob Wepfer's book on apoplexy (1658). *Critical comments on a classic in neurology*). *Nervenarzt* 69:93–98.
<https://doi.org/10.1007/s001150050244>
19. Gerabek WE, Haage BD, Keil G et al. (eds) (2005) *Enzyklopädie Medizingeschichte*. de Gruyter, Berlin
20. Beneke R (1910) *Klassiker der Medizin*. Band 7-8.: Rudolf Virchow: Thrombose und Embolie (1846-1856)., Leipzig
21. Haschek E LO (1896) Ein Beitrag zur praktischen Verwertung der Photographie nach Röntgen. *Wiener Klin Wschr.*:63–64
22. Artico M, Spoletini M, Fumagalli L et al. (2017) Egas Moniz: 90 Years (1927-2017) from Cerebral Angiography. *Front Neuroanat* 11:81.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00081>
23. Lauterbur PC (1989) Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973. *Clin Orthop Relat Res*:3–6

24. Jütte R (1996) Geschichte der alternativen Medizin: Von der Volksmedizin zu den unkonventionellen Therapien von heute. Beck, München
25. Hedenius P (1941) The use of heparin in internal diseases. *Acta Med Scand.*:170–177
26. Baker RN, Broward JA, Fang HC et al. (1966) Anticoagulant therapy of cerebral infarction: report of a national cooperative study. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 41:287–302
27. MacFarlane RG, Pilling J (1947) Fibrinolytic activity of normal urine. *Nature* 159:779. <https://doi.org/10.1038/159779a0>
28. Tillett WS, Johnson AJ, McCarty WR (1955) The intravenous infusion of the streptococcal fibrinolytic principle (streptokinase) into patients. *J Clin Invest* 34:169–185. <https://doi.org/10.1172/JCI103071>
29. Fletcher AP, Alkjaersig N, Lewis M et al. (1976) A pilot study of urokinase therapy in cerebral infarction. *Stroke* 7:135–142. <https://doi.org/10.1161/01.str.7.2.135>
30. (1995) Randomised controlled trial of streptokinase, aspirin, and combination of both in treatment of acute ischaemic stroke. Multicentre Acute Stroke Trial--Italy (MAST-I) Group. *The Lancet* 346:1509–1514
31. Hommel M, Cornu C, Boutitie F et al. (1996) Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 335:145–150. <https://doi.org/10.1056/NEJM199607183350301>
32. Kadir RRA, Bayraktutan U (2020) Urokinase Plasminogen Activator: A Potential Thrombolytic Agent for Ischaemic Stroke. *Cell Mol Neurobiol* 40:347–355. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00737-w>
33. Rijken DC, Collen D (1981) Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem* 256:7035–7041
34. Collen D, Lijnen HR (2004) Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost* 2:541–546. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7933.2004.00645.x>
35. van de Werf F, Bergmann SR, Fox KA et al. (1984) Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology. *Circulation* 69:605–610. <https://doi.org/10.1161/01.cir.69.3.605>

36. Haley EC, Levy DE, Brott TG et al. (1992) Urgent therapy for stroke. Part II. Pilot study of tissue plasminogen activator administered 91-180 minutes from onset. *Stroke* 23:641–645. <https://doi.org/10.1161/01.str.23.5.641>
37. Brott TG, Haley EC, Levy DE et al. (1992) Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke* 23:632–640. <https://doi.org/10.1161/01.str.23.5.632>
38. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333:1581–1587. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
39. Clark WM, Albers GW, Madden KP et al. (2000) The rtPA (alteplase) 0- to 6-hour acute stroke trial, part A (A0276g): results of a double-blind, placebo-controlled, multicenter study. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke study investigators. *Stroke* 31:811–816. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.4.811>
40. Clark WM, Wissman S, Albers GW et al. (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* 282:2019–2026. <https://doi.org/10.1001/jama.282.21.2019>
41. Davis SM, Donnan GA, Parsons MW et al. (2008) Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial. *The Lancet Neurology* 7:299–309. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70044-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70044-9)
42. Hacke W, Kaste M, Fieschi C et al. (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274:1017–1025
43. Hacke W, Kaste M, Fieschi C et al. (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *The Lancet* 352:1245–1251. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)08020-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)08020-9)
44. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359:1317–1329. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>

45. Lees KR, Bluhmki E, Kummer R von et al. (2010) Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *The Lancet* 375:1695–1703.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60491-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60491-6)
46. Parsons MW (2011) Treating as early as possible with thrombolysis is crucial, but can we do better in the sub-4.5-hour time window? *Cerebrovasc Dis* 31:229.
<https://doi.org/10.1159/000322555>
47. Shobha N, Buchan AM, Hill MD (2011) Thrombolysis at 3-4.5 hours after acute ischemic stroke onset—evidence from the Canadian Alteplase for Stroke Effectiveness Study (CASES) registry. *Cerebrovasc Dis* 31:223–228. <https://doi.org/10.1159/000321893>
48. Nakagawara J, Minematsu K, Okada Y et al. (2010) Thrombolysis with 0.6 mg/kg intravenous alteplase for acute ischemic stroke in routine clinical practice: the Japan post-Marketing Alteplase Registration Study (J-MARS). *Stroke* 41:1984–1989.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.589606>
49. Ahmed N, Wahlgren N, Grond M et al. (2010) Implementation and outcome of thrombolysis with alteplase 3–4.5 h after an acute stroke: an updated analysis from SITS-ISTR. *The Lancet Neurology* 9:866–874. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70165-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70165-4)
50. Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3–4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *The Lancet* 372:1303–1309.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61339-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61339-2)
51. Micieli G, Marcheselli S, Tosi PA (2009) Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. *Vasc Health Risk Manag* 5:397–409.
<https://doi.org/10.2147/vhrm.s4561>
52. Niego B, Freeman R, Puschmann TB et al. (2012) t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes. *Blood* 119:4752–4761.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369512>
53. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T et al. (2018) 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 49:e46-e110. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000158>

54. Medcalf RL, Davis SM (2012) Plasminogen activation and thrombolysis for ischemic stroke. *Int J Stroke* 7:419–425. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00783.x>
55. Liberatore GT, Samson A, Bladin C et al. (2003) Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 34:537–543.
<https://doi.org/10.1161/01.str.0000049764.49162.76>
56. Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI (1998) Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *J Biol Chem* 273:18292–18299. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18292>
57. Epple G, Schleuning W-D, Kettelgerdes G et al. (2004) Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator-mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2. *J Thromb Haemost* 2:962–968. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00675.x>
58. Pugsley MK, Lipka L, Petersen U et al. (2006) A new hope for stroke? Evidence for the use of rDSPA α 1 (Desmoteplase) in acute ischemic stroke. *Proc West Pharmacol Soc* 49:1–5
59. Paciaroni M, Medeiros E, Bogousslavsky J (2009) Desmoteplase. *Expert Opin Biol Ther* 9:773–778. <https://doi.org/10.1517/14712590902991497>
60. Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y et al. (2005) The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke* 36:66–73.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000149938.08731.2c>
61. Furlan AJ, Eydin D, Albers GW et al. (2006) Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 37:1227–1231. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217403.66996.6d>
62. Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y et al. (2009) Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion–diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet Neurology* 8:141–150.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70267-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70267-9)
63. Fiebich JB, Al-Rawi Y, Wintermark M et al. (2012) Vascular occlusion enables selecting acute ischemic stroke patients for treatment with desmoteplase. *Stroke* 43:1561–1566.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.642322>

64. Albers GW, Kummer R von, Truelsen T et al. (2015) Safety and efficacy of desmoteplase given 3–9 h after ischaemic stroke in patients with occlusion or high-grade stenosis in major cerebral arteries (DIAS-3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 14:575–584.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00047-2)
65. Kummer R von, Mori E, Truelsen T et al. (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* 47:2880–2887.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013715>
66. Mori E, Minematsu K, Nakagawara J et al. (2015) Safety and Tolerability of Desmoteplase Within 3 to 9 Hours After Symptoms Onset in Japanese Patients With Ischemic Stroke. *Stroke* 46:2549–2554. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009917>
67. Logallo N, Kvistad CE, Thomassen L (2015) Therapeutic Potential of Tenecteplase in the Management of Acute Ischemic Stroke. *CNS Drugs* 29:811–818.
<https://doi.org/10.1007/s40263-015-0280-9>
68. Tanswell P, Modi N, Combs D et al. (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction. *Clin Pharmacokinet* 41:1229–1245. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241150-00001>
69. Bell WR (2002) Present-day thrombolytic therapy: therapeutic agents--pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med* 3 Suppl 2:S34-44
70. Parsons M, Spratt N, Bivard A et al. (2012) A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 366:1099–1107.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109842>
71. Haley EC, Thompson JLP, Grotta JC et al. (2010) Phase IIB/III trial of tenecteplase in acute ischemic stroke: results of a prematurely terminated randomized clinical trial. *Stroke* 41:707–711. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572040>
72. Huang X, Cheripelli BK, Lloyd SM et al. (2015) Alteplase versus tenecteplase for thrombolysis after ischaemic stroke (ATTEST): a phase 2, randomised, open-label, blinded endpoint study. *The Lancet Neurology* 14:368–376.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70017-7)

73. Logallo N, Novotny V, Assmus J et al. (2017) Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *The Lancet Neurology* 16:781–788.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30253-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30253-3)
74. Campbell BCV, Mitchell PJ, Churilov L et al. (2018) Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 378:1573–1582.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716405>
75. Coutts SB, Berge E, Campbell BC et al. (2018) Tenecteplase for the treatment of acute ischemic stroke: A review of completed and ongoing randomized controlled trials. *Int J Stroke* 13:885–892. <https://doi.org/10.1177/1747493018790024>
76. Zeumer H, Hacke W, Kolmann HL et al. (1982) Lokale Fibrinolysetherapie bei Basilaris-Thrombose (Local fibrinolysis in basilar artery thrombosis (author's transl)). *Dtsch Med Wochenschr* 107:728–731. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1070010>
77. Smith WS, Sung G, Starkman S et al. (2005) Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke* 36:1432–1438.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000171066.25248.1d>
78. Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM et al. (2013) Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med* 368:893–903.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214300>
79. Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J et al. (2013) A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med* 368:914–923.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1212793>
80. Ciccone A, Valvassori L, Nichelatti M et al. (2013) Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 368:904–913. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213701>
81. Saver JL, Jahan R, Levy EI et al. (2012) Solitaire flow restoration device versus the Merci Retriever in patients with acute ischaemic stroke (SWIFT): a randomised, parallel-group, non-inferiority trial. *The Lancet* 380:1241–1249.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61384-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61384-1)
82. Nogueira RG, Lutsep HL, Gupta R et al. (2012) Trevo versus Merci retrievers for thrombectomy revascularisation of large vessel occlusions in acute ischaemic stroke (TREVO 2): a randomised trial. *The Lancet* 380:1231–1240.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61299-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61299-9)

83. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D et al. (2015) A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 372:11–20.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587>
84. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ et al. (2015) Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 372:1009–1018.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414792>
85. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK et al. (2015) Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 372:1019–1030.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414905>
86. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E et al. (2015) Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* 372:2296–2306.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503780>
87. Saver JL, Goyal M, Bonafe A et al. (2015) Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* 372:2285–2295.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1415061>
88. Bracard S, Ducrocq X, Mas JL et al. (2016) Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 15:1138–1147. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30177-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30177-6)
89. Bose A, Henkes H, Alfke K et al. (2008) The Penumbra System: a mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:1409–1413. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1110>
90. Jauch EC, Saver JL, Adams HP et al. (2013) Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44:870–947.
<https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318284056a>
91. Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA et al. (2000) High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial doppler monitoring. *Stroke* 31:610–614.
<https://doi.org/10.1161/01.str.31.3.610>
92. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC et al. (2004) Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 351:2170–2178.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa041175>

93. Eggers J, König IR, Koch B et al. (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* 39:1470–1475.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.503870>
94. Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D et al. (1999) Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol* 25:269–273.
[https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(98\)00158-6](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(98)00158-6)
95. Frenkel V, Oberoi J, Stone MJ et al. (2006) Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances thrombolysis in an in vitro model. *Radiology* 239:86–93.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2391042181>
96. Cintas P, Le Traon AP, Larrue V (2002) High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-MHz transcranial color-coded Doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke* 33:626–628. <https://doi.org/10.1161/hs0202.103073>
97. Eggers J, Seidel G, Koch B et al. (2005) Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA. *Neurology* 64:1052–1054.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154599.45969.D6>
98. Nedelmann M, Brandt C, Schneider F et al. (2005) Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 20:18–22. <https://doi.org/10.1159/000086122>
99. Cintas P, Nguyen F, Boneu B et al. (2004) Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *J Thromb Haemost* 2:1163–1166.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00746.x>
100. Molina CA, Ribo M, Rubiera M et al. (2006) Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 37:425–429.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000199064.94588.39>
101. Nedelmann M, Eicke BM, Nolle F et al. (2002) Ultraschallkontrastmittel Levovist steigert den thrombolytischen Effekt von niederfrequentem Ultraschall (The ultrasound contrast medium levovist increases the thrombolytic effect of low frequency ultrasound). *Med Klin (Munich)* 97:216–220. <https://doi.org/10.1007/s00063-002-1147-7>

102. Perren F, Loulidi J, Poggia D et al. (2008) Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke. *J Thromb Thrombolysis* 25:219–223. <https://doi.org/10.1007/s11239-007-0044-6>
103. Bader KB, Bouchoux G, Holland CK (2016) Sonothrombolysis. *Adv Exp Med Biol* 880:339–362. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22536-4_19
104. Braaten JV, Goss RA, Francis CW (1997) Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *Thromb Haemost* 78:1063–1068
105. Francis CW, Blinc A, Lee S et al. (1995) Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol* 21:419–424. [https://doi.org/10.1016/0301-5629\(94\)00119-x](https://doi.org/10.1016/0301-5629(94)00119-x)
106. Siddiqi F, Blinc A, Braaten J et al. (1995) Ultrasound increases flow through fibrin gels. *Thromb Haemost* 73:495–498
107. Meairs S, Alonso A, Hennerici MG (2012) Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke* 43:1706–1710. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.636332>
108. Francis CW (2001) Ultrasound-enhanced thrombolysis. *Echocardiography* 18:239–246. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8175.2001.00239.x>
109. Siddiqi F, Odrlijin TM, Fay PJ et al. (1998) Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood* 91:2019–2025
110. Spengos K, Behrens S, Daffertshofer M et al. (2000) Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound Med Biol* 26:889–895. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(00\)00211-8](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(00)00211-8)
111. Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL et al. (1993) Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *Blood* 81:2636–2643
112. Francis CW, Onundarson PT, Carstensen EL et al. (1992) Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. *J Clin Invest* 90:2063–2068. <https://doi.org/10.1172/JCI116088>
113. Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL et al. (1998) Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound. *Circulation* 98:1030–1035. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.10.1030>
114. Stride E (2009) Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 2:1–13. <https://doi.org/10.1159/000203122>
115. Bader KB, Gruber MJ, Holland CK (2015) Shaken and stirred: mechanisms of ultrasound-enhanced thrombolysis. *Ultrasound Med Biol* 41:187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.08.018>

116. Molina CA, Barreto AD, Tsivgoulis G et al. (2009) Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial. *Ann Neurol* 66:28–38.
<https://doi.org/10.1002/ana.21723>
117. Datta S, Coussios C-C, Ammi AY et al. (2008) Ultrasound-enhanced thrombolysis using Definity as a cavitation nucleation agent. *Ultrasound Med Biol* 34:1421–1433.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.016>
118. Nedelmann M, Ritschel N, Doenges S et al. (2010) Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1712–1720.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.82>
119. Schleicher N, Tomkins AJ, Kampschulte M et al. (2016) Sonothrombolysis with BR38 Microbubbles Improves Microvascular Patency in a Rat Model of Stroke. *PLoS One* 11:e0152898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152898>
120. Lu Y, Wang J, Huang R et al. (2016) Microbubble-Mediated Sonothrombolysis Improves Outcome After Thrombotic Microembolism-Induced Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 47:1344–1353. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012056>
121. Kvistad CE, Nacu A, Novotny V et al. (2018) Contrast-enhanced sonothrombolysis in acute ischemic stroke patients without intracranial large-vessel occlusion. *Acta Neurol Scand* 137:256–261. <https://doi.org/10.1111/ane.12861>
122. Yagita Y, Etani H, Handa N et al. (1996) Effect of transcranial Doppler intensity on successful recording in Japanese patients. *Ultrasound Med Biol* 22:701–705.
[https://doi.org/10.1016/0301-5629\(96\)00032-4](https://doi.org/10.1016/0301-5629(96)00032-4)
123. Ricci S, Dinia L, Del Sette M et al. (2012) Sonothrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*:CD008348.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD008348.pub2>
124. Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P et al. (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* 36:1441–1446. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000170707.86793.1a>
125. Baron C, Aubry J-F, Tanter M et al. (2009) Simulation of intracranial acoustic fields in clinical trials of sonothrombolysis. *Ultrasound Med Biol* 35:1148–1158.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.11.014>

126. Maxwell L, Collecutt T, Gledhill M et al. (1994) The augmentation of leucocyte adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 20:383–390.
[https://doi.org/10.1016/0301-5629\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0301-5629(94)90007-8)
127. Saqqur M, Tsivgoulis G, Nicoli F et al. (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* 24:209–220.
<https://doi.org/10.1111/jon.12026>
128. Tsivgoulis G, Eggers J, Ribo M et al. (2010) Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke* 41:280–287.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.563304>
129. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Vaskuläre Erkrankungen. Aufl. 5, Stand: 30. September 2012, gültig bis 31. Dezember 2014.
<https://dgn.org/leitlinien/ll-22-2012-akuttherapie-des-ischaemischen-schlaganfalls/>.
Accessed 30 Dec 2020
130. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Vaskuläre Erkrankungen, Ergänzung 2015. Stand: 06. Oktober 2015; gültig bis 05. Oktober 2020
<https://dgn.org/leitlinien/030-140-rekanalisierende-therapie-ergaenzung-akuttherapie-schlaganfall-special/>. Accessed 30 Dec 2020
131. Powers WJ, Derdeyn CP, Biller J et al. (2015) 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 46:3020–3035. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000074>
132. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM et al. (2001) Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology* 56:1015–1020.
<https://doi.org/10.1212/wnl.56.8.1015>
133. Nasr DM, Brinjikji W, Cloft HJ et al. (2013) Utilization of intravenous thrombolysis is increasing in the United States. *Int J Stroke* 8:681–688.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00844.x>

134. Tsivgoulis G, Alleman J, Katsanos AH et al. (2014) Comparative efficacy of different acute reperfusion therapies for acute ischemic stroke: a comprehensive benefit-risk analysis of clinical trials. *Brain Behav* 4:789–797. <https://doi.org/10.1002/brb3.279>
135. Schneider F, Gerriets T, Walberer M et al. (2006) Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-kHz ultrasound: a safety study in rats. *Stroke* 37:1301–1306. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217329.16739.8f>
136. Greenberg RK, Ouriel K, Srivastava S et al. (2000) Mechanical versus Chemical Thrombolysis: An In Vitro Differentiation of Thrombolytic Mechanisms. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 11:199–205. [https://doi.org/10.1016/s1051-0443\(07\)61465-1](https://doi.org/10.1016/s1051-0443(07)61465-1)
137. Sakharov DV, Rijken DC (2000) The effect of flow on lysis of plasma clots in a plasma environment. *Thromb Haemost* 83:469–474
138. Sersa I, Vidmar J, Grobelnik B et al. (2007) Modelling the effect of laminar axially directed blood flow on the dissolution of non-occlusive blood clots. *Phys Med Biol* 52:2969–2985. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/11/003>
139. Holscher T, Raman R, Ernström K et al. (2009) In vitro sonothrombolysis with duplex ultrasound: first results using a simplified model. *Cerebrovasc Dis* 28:365–370. <https://doi.org/10.1159/000230710>
140. Holland CK, Vaidya SS, Datta S et al. (2008) Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res* 121:663–673. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.07.006>
141. Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, Kollmann C et al. (2005) Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke* 36:124–128. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000150503.10480.a7>
142. Rosenschein U, Furman V, Kerner E et al. (2000) Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis: preclinical results. *Circulation* 102:238–245. <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.2.238>
143. Lauer CG, Burge R, Tang DB et al. (1992) Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation* 86:1257–1264. <https://doi.org/10.1161/01.cir.86.4.1257>

144. Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M et al. (2001) Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 27:1683–1689. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(01\)00481-1](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(01)00481-1)
145. Harpaz D, Chen X, Francis CW et al. (1993) Ultrasound enhancement of thrombolysis and reperfusion in vitro. *Journal of the American College of Cardiology* 21:1507–1511. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90331-t](https://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90331-t)
146. Olsson SB, Johansson B, Nilsson A-M et al. (1994) Enhancement of thrombolysis by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 20:375–382. [https://doi.org/10.1016/0301-5629\(94\)90006-x](https://doi.org/10.1016/0301-5629(94)90006-x)
147. Soltani A, Volz KR, Hansmann DR (2008) Effect of modulated ultrasound parameters on ultrasound-induced thrombolysis. *Phys Med Biol* 53:6837–6847. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/23/012>
148. Kwan D, Dries A, Burton T et al. (2003) Thrombus characterization with intravascular ultrasound: potential to predict successful thrombolysis. *J Endovasc Ther* 10:90–98. <https://doi.org/10.1177/152660280301000119>
149. Tiukinhoy-Laing SD, Huang S, Klegerman M et al. (2007) Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res* 119:777–784. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.06.009>
150. Devcic-Kuhar B, Pfaffenberger S, Gherardini L et al. (2004) Ultrasound affects distribution of plasminogen and tissue-type plasminogen activator in whole blood clots in vitro. *Thromb Haemost* 92:980–985. <https://doi.org/10.1160/TH04-02-0119>
151. Roessler FC (2011) Entwicklung eines computergesteuerten, pulsatilen Flussmodells zur Simulation und Untersuchung der Wirkmechanismen der Sonothrombolyse. Dissertation, Universität zu Lübeck
152. Demchuk AM, Burgin WS, Christou I et al. (2001) Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 32:89–93. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.1.89>
153. Wunderlich MT, Goertler M, Postert T et al. (2007) Recanalization after intravenous thrombolysis: does a recanalization time window exist? *Neurology* 68:1364–1368. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260604.26469.8e>

154. Furie B, Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359:938–949.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
155. Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17:796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
156. Meyer SF de, Denorme F, Langhauser F et al. (2016) Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke* 47:1165–1172. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011238>
157. Anrather J, Iadecola C (2016) Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics* 13:661–670. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x>
158. Edmunds LH (1993) Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 8:404–410. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8191.1993.tb00384.x>
159. Paparella D, Semeraro F, Scrascia G et al. (2010) Coagulation-fibrinolysis changes during off-pump bypass: effect of two heparin doses. *Ann Thorac Surg* 89:421–427.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.10.041>
160. Eggers J, Ossadnik S, Hütten H et al. (2009) Sonothrombolysis is effective with recombinant tissue-type plasminogen activator, but not with Abciximab. Results from an in vitro study with whole blood clots and platelet-rich clots. *Thromb Haemost* 102:1274–1277. <https://doi.org/10.1160/TH09-03-0207>
161. Aaslid R (1986) *Transcranial Doppler sonography*. Springer, Berlin
162. Lundbeck. Corporate Release No 537: Lundbeck provides update on the development program for desmoteplase. June 27, 2014.
<http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=856865>.
Accessed 23 Dec 2020
163. Nadler SB, Hidalgo JH, Bloch T (1962) Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 51:224–232
164. Schering. (1992) Lysis of human plasma and whole blood clots in vitro by ZK 152 387 (DPSA alpha1), ZK 153 786 (DSPA alpha2), ZK 155 278 (DSPA beta), ZK 153 858 (alteplase), ZK 130 932 (scu-PA), ZK 113 905 (urokinase), and ZK 156 552 (anistreplase): Schering Report A315, Berlin.
165. Schering. (1992) Lysis with ZK 152 387 of human whole blood clots in vitro: Schering Report 9752, Berlin.

166. Schleuning WD, Alagon A, Boidol W et al. (1992) Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity. *Ann N Y Acad Sci* 667:395–403. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb51639.x>
167. Sakharov DV, Barrertt-Bergshoeff M, Hekkenberg RT et al. (1999) Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro. *Thromb Haemost* 81:605–612
168. Witt W, Maass B, Baldus B et al. (1994) Coronary thrombolysis with *Desmodus* salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation* 90:421–426. <https://doi.org/10.1161/01.cir.90.1.421>
169. Onundarson PT, Francis CW, Marder VJ (1992) Depletion of plasminogen in vitro or during thrombolytic therapy limits fibrinolytic potential. *J Lab Clin Med* 120:120–128
170. Masomi-Bornwasser J, Winter P, Müller-Werkmeister H et al. (2017) Combination of ultrasound and rtPA enhances fibrinolysis in an In Vitro clot system. *PLoS One* 12:e0188131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188131>
171. Prokop AF, Soltani A, Roy RA (2007) Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated fibrinolysis. *Ultrasound Med Biol* 33:924–933. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.11.022>
172. Hitchcock KE, Ivancevich NM, Haworth KJ et al. (2011) Ultrasound-enhanced rt-PA thrombolysis in an ex vivo porcine carotid artery model. *Ultrasound Med Biol* 37:1240–1251. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2011.05.011>
173. Petit B, Gaud E, Colevret D et al. (2012) In vitro sonothrombolysis of human blood clots with BR38 microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 38:1222–1233. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.02.023>
174. Barlind K, Tsivgoulis G, Barreto AD et al. (2014) Outcomes following sonothrombolysis in severe acute ischemic stroke: subgroup analysis of the CLOTBUST trial. *Int J Stroke* 9:1006–1010. <https://doi.org/10.1111/ijs.12340>
175. Alexandrov AV, Köhrmann M, Soenne L et al. (2019) Safety and efficacy of sonothrombolysis for acute ischaemic stroke: a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 18:338–347. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30026-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30026-2)

176. Bates ER (2014) Evolution from fibrinolytic therapy to a fibrinolytic strategy for patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 130:1133–1135.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012539>
177. Haley EC, Lyden PD, Johnston KC et al. (2005) A pilot dose-escalation safety study of tenecteplase in acute ischemic stroke. *Stroke* 36:607–612.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000154872.73240.e9>
178. Papadopoulos N, Damianou C (2016) In Vitro Evaluation of Focused Ultrasound-Enhanced TNK-Tissue Plasminogen Activator-Mediated Thrombolysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25:1864–1877. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.051>
179. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. (2009) Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *The Lancet* 373:1849–1860.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60503-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60503-1)
180. Uyttenboogaart M, Koch MW, Koopman K et al. (2008) Safety of antiplatelet therapy prior to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Arch Neurol* 65:607–611.
<https://doi.org/10.1001/archneur.65.5.noc70077>
181. Ibrahim MM, Sebastian J, Hussain M et al. (2010) Does current oral antiplatelet agent or subtherapeutic anticoagulation use have an effect on tissue-plasminogen-activator-mediated recanalization rate in patients with acute ischemic stroke? *Cerebrovasc Dis* 30:508–513. <https://doi.org/10.1159/000319029>
182. Saňák D, Kuliha M, Herzig R et al. (2012) Prior use of antiplatelet therapy can be associated with a higher chance for early recanalization of the occluded middle cerebral artery in acute stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *Eur Neurol* 67:52–56. <https://doi.org/10.1159/000333064>
183. Schmülling S, Rudolf J, Strotmann-Tack T et al. (2003) Acetylsalicylic acid pretreatment, concomitant heparin therapy and the risk of early intracranial hemorrhage following systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 16:183–190.
<https://doi.org/10.1159/000071114>
184. European Stroke Organisation. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke 2008.
http://www.congrex-switzerland.com/fileadmin/files/2013/eso-stroke/pdf/ESO08_Guidelines_Original_english.pdf. Accessed 23 Dec 2020

185. Grotta JC, Welch KM, Fagan SC et al. (2001) Clinical deterioration following improvement in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Stroke* 32:661–668.
<https://doi.org/10.1161/01.str.32.3.661>
186. Ajjan RA, Standeven KF, Khanbhai M et al. (2009) Effects of aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro cellular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:712–717. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.183707>
187. He S, Bark N, Wang H et al. (2009) Effects of acetylsalicylic acid on increase of fibrin network porosity and the consequent upregulation of fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 53:24–29. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181953e0f>
188. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG (2007) Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood* 109:2285–2292.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-010645>
189. Stanford SN, Sabra A, D'Silva L et al. (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>
190. Svensson J, Bergman A-C, Adamson U et al. (2012) Acetylation and glycation of fibrinogen in vitro occur at specific lysine residues in a concentration dependent manner: a mass spectrometric and isotope labeling study. *Biochem Biophys Res Commun* 421:335–342.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.154>
191. Collet JP, Park D, Lesty C et al. (2000) Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1354–1361.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1354>
192. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM (1992) The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem* 267:24259–24263
193. He S, Blombäck M, Yoo G et al. (2001) Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann N Y Acad Sci* 936:531–535.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03540.x>
194. Williams S, Fatah K, Ivert T et al. (1995) The effect of acetylsalicylic acid on fibrin gel lysis by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:718–725.
<https://doi.org/10.1097/00001721-199512000-00004>

195. Fatah K, Beving H, Albåge A et al. (1996) Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? *Eur Heart J* 17:1362–1366. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a015070>
196. Antovic A, Perneby C, Ekman GJ et al. (2005) Marked increase of fibrin gel permeability with very low dose ASA treatment. *Thromb Res* 116:509–517. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.02.007>
197. Schrör K (1997) Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* 23:349–356. <https://doi.org/10.1055/s-2007-996108>
198. Sørensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S et al. (2009) Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood* 114:1645–1654. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199414>
199. Patrick J, Dillaha L, Armas D et al. (2015) A randomized trial to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of a single dose of an extended-release aspirin formulation. *Postgrad Med* 127:573–580. <https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1050341>
200. Deng CX, Xu Q, Apfel RE et al. (1996) In vitro measurements of inertial cavitation thresholds in human blood. *Ultrasound Med Biol* 22:939–948. [https://doi.org/10.1016/0301-5629\(96\)00104-4](https://doi.org/10.1016/0301-5629(96)00104-4)
201. Boeckh-Behrens T, Schubert M, Förschler A et al. (2016) The Impact of Histological Clot Composition in Embolic Stroke. *Clin Neuroradiol* 26:189–197. <https://doi.org/10.1007/s00062-014-0347-x>
202. Meyer SF de, Andersson T, Baxter B et al. (2017) Analyses of thrombi in acute ischemic stroke: A consensus statement on current knowledge and future directions. *Int J Stroke* 12:606–614. <https://doi.org/10.1177/1747493017709671>
203. Kim SK, Yoon W, Kim TS et al. (2015) Histologic Analysis of Retrieved Clots in Acute Ischemic Stroke: Correlation with Stroke Etiology and Gradient-Echo MRI. *AJNR Am J Neuroradiol* 36:1756–1762. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4402>
204. Niesten JM, van der Schaaf IC, van Dam L et al. (2014) Histopathologic composition of cerebral thrombi of acute stroke patients is correlated with stroke subtype and thrombus attenuation. *PLoS One* 9:e88882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088882>

205. Sporns PB, Hanning U, Schwandt W et al. (2017) Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke* 48:2206–2210. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016590>
206. Hart RG, Diener H-C, Coutts SB et al. (2014) Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *The Lancet Neurology* 13:429–438. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70310-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70310-7)
207. Diener H-C, Sacco RL, Easton JD et al. (2019) Dabigatran for Prevention of Stroke after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med* 380:1906–1917. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813959>
208. Hart RG, Sharma M, Mundl H et al. (2018) Rivaroxaban for Stroke Prevention after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med* 378:2191–2201. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802686>
209. Amarenco P, Lavallée PC, Labreuche J et al. (2016) One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *N Engl J Med* 374:1533–1542. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412981>
210. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH et al. (2016) Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* 387:1723–1731. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00163-X)
211. Ahn SH, Hong R, Choo IS et al. (2016) Histologic features of acute thrombi retrieved from stroke patients during mechanical reperfusion therapy. *Int J Stroke* 11:1036–1044. <https://doi.org/10.1177/1747493016641965>
212. Berndt M, Friedrich B, Maegerlein C et al. (2018) Thrombus Permeability in Admission Computed Tomographic Imaging Indicates Stroke Pathogenesis Based on Thrombus Histology. *Stroke* 49:2674–2682. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021873>
213. Boeckh-Behrens T, Kleine JF, Zimmer C et al. (2016) Thrombus Histology Suggests Cardioembolic Cause in Cryptogenic Stroke. *Stroke* 47:1864–1871. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013105>
214. Brinjikji W, Duffy S, Burrows A et al. (2017) Correlation of imaging and histopathology of thrombi in acute ischemic stroke with etiology and outcome: a systematic review. *J Neurointerv Surg* 9:529–534. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2016-012391>

215. Duffy S, McCarthy R, Farrell M et al. (2019) Per-Pass Analysis of Thrombus Composition in Patients With Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. *Stroke* 50:1156–1163. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.023419>
216. Fitzgerald S, Dai D, Wang S et al. (2019) Platelet-Rich Emboli in Cerebral Large Vessel Occlusion Are Associated With a Large Artery Atherosclerosis Source. *Stroke* 50:1907–1910. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.024543>
217. Gong L, Zheng X, Feng L et al. (2019) Bridging Therapy Versus Direct Mechanical Thrombectomy in Patients with Acute Ischemic Stroke due to Middle Cerebral Artery Occlusion: A Clinical- Histological Analysis of Retrieved Thrombi. *Cell Transplant* 28:684–690. <https://doi.org/10.1177/0963689718823206>
218. Maekawa K, Shibata M, Nakajima H et al. (2018) Erythrocyte-Rich Thrombus Is Associated with Reduced Number of Maneuvers and Procedure Time in Patients with Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. *Cerebrovasc Dis Extra* 8:39–49. <https://doi.org/10.1159/000486042>
219. Shin JW, Jeong HS, Kwon H-J et al. (2018) High red blood cell composition in clots is associated with successful recanalization during intra-arterial thrombectomy. *PLoS One* 13:e0197492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197492>
220. Jang IK, Gold HK, Ziskind AA et al. (1989) Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation* 79:920–928. <https://doi.org/10.1161/01.cir.79.4.920>
221. Kim BM (2017) Causes and Solutions of Endovascular Treatment Failure. *J Stroke* 19:131–142. <https://doi.org/10.5853/jos.2017.00283>
222. Kirchhof K, Sikinger M, Welzel T et al. (2004) Hängt das Ergebnis einer Thrombolyse mit rekombinantem Gewebe-Plasminogenaktivator (rt-PA) beim Kaninchen vom Erythrozyten- und Fibringehalt eines Thrombus ab? (Does the result of thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in rabbits depend on the erythrocyte- and fibrin-content of a thrombus?). *Rofo* 176:98–105. <https://doi.org/10.1055/s-2004-814671>

223. Niessen F, Hilger T, Hoehn M et al. (2003) Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 34:2019–2024.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000080941.73934.30>
224. Yuki I, Kan I, Vinters HV et al. (2012) The impact of thromboemboli histology on the performance of a mechanical thrombectomy device. *AJNR Am J Neuroradiol* 33:643–648.
<https://doi.org/10.3174/ajnr.A2842>
225. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR (1997) Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 89:1270–1278
226. Silvain J, Collet J-P, Nagaswami C et al. (2011) Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 57:1359–1367.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.09.077>
227. Collet JP, Allali Y, Lesty C et al. (2006) Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2567–2573. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000241589.52950.4c>
228. Longstaff C, Varjú I, Sótonyi P et al. (2013) Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* 288:6946–6956.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404301>
229. Weisel JW (2007) Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:116–124. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02504.x>
230. Ono A, Westein E, Hsiao S et al. (2008) Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood* 112:90–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127001>
231. Niesten JM, van der Schaaf IC, Biessels GJ et al. (2013) Relationship between thrombus attenuation and different stroke subtypes. *Neuroradiology* 55:1071–1079.
<https://doi.org/10.1007/s00234-013-1217-y>
232. Guo Y, Lip GYH, Apostolakis S (2015) Inflammatory Biomarkers and Atrial Fibrillation: Potential Role of Inflammatory Pathways in the Pathogenesis of Atrial Fibrillation-induced Thromboembolism. *Curr Vasc Pharmacol* 13:192–201.
<https://doi.org/10.2174/15701611113116660165>

233. Gosk-Bierska I, Wasilewska M, Wysokinski W (2016) Role of Platelets in Thromboembolism in Patients with Atrial Fibrillation. *Adv Clin Exp Med* 25:163–171.
<https://doi.org/10.17219/acem/38544>
234. Schäfer A, Eigenthaler M, Bauersachs J (2004) Platelet activation in heart failure. *Clin Lab* 50:559–566
235. Wysokinski WE, Owen WG, Fass DN et al. (2004) Atrial fibrillation and thrombosis: immunohistochemical differences between in situ and embolized thrombi. *J Thromb Haemost* 2:1637–1644. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00899.x>
236. Sato Y, Ishibashi-Ueda H, Iwakiri T et al. (2012) Thrombus components in cardioembolic and atherothrombotic strokes. *Thromb Res* 130:278–280.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.04.008>
237. Akoum N (2016) New perspectives on atrial fibrillation and stroke. *Heart* 102:1788–1792.
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-309066>
238. Yamashita T (2007) Molecular basis of thromboembolism in association with atrial fibrillation. *Circ J* 71 Suppl A:A40-4. <https://doi.org/10.1253/circj.71.a40>
239. Guazzi M, Arena R (2009) Endothelial dysfunction and pathophysiological correlates in atrial fibrillation. *Heart* 95:102–106. <https://doi.org/10.1136/hrt.2007.135277>
240. Hirsh BJ, Copeland-Halperin RS, Halperin JL (2015) Fibrotic atrial cardiomyopathy, atrial fibrillation, and thromboembolism: mechanistic links and clinical inferences. *Journal of the American College of Cardiology* 65:2239–2251.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.557>
241. Raviele A, Ronco F (2011) Endothelial dysfunction and atrial fibrillation: what is the relationship? *J Cardiovasc Electrophysiol* 22:383–384.
<https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2010.01954.x>
242. Wijesurendra RS, Casadei B (2015) Atrial fibrillation: effects beyond the atrium? *Cardiovasc Res* 105:238–247. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv001>
243. Chaves CJ, Caplan LR (2000) Heparin and oral anticoagulants in the treatment of brain ischemia. *Journal of the Neurological Sciences* 173:3–9.
[https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(99\)00299-3](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(99)00299-3)
244. Jerjes-Sanchez C (2005) Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *Eur Heart J* 26:3–4. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi041>

245. Marder VJ, Chute DJ, Starkman S et al. (2006) Analysis of thrombi retrieved from cerebral arteries of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 37:2086–2093.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000230307.03438.94>
246. Hart RG, Catanese L, Perera KS et al. (2017) Embolic Stroke of Undetermined Source: A Systematic Review and Clinical Update. *Stroke* 48:867–872.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.016414>
247. WMO (1975) Manual on the observation of clouds and other meteors (partly annex I to WMO Technical regulations), Rev. ed. WMO, vol 407. WMO, Geneva
248. R Foundation for Statistical Computing R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>. Accessed 28 Dec 2020
249. Molina CA, Montaner J, Arenillas JF et al. (2004) Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke* 35:486–490. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000110219.67054.BF>
250. Redgrave JNE, Lovett JK, Gallagher PJ et al. (2006) Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation* 113:2320–2328.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589044>
251. Perera KS, Vanassche T, Bosch J et al. (2016) Embolic strokes of undetermined source: Prevalence and patient features in the ESUS Global Registry. *Int J Stroke* 11:526–533.
<https://doi.org/10.1177/1747493016641967>
252. Borowsky LH, Regan S, Chang Y et al. (2017) First Diagnosis of Atrial Fibrillation at the Time of Stroke. *Cerebrovasc Dis* 43:192–199. <https://doi.org/10.1159/000457809>
253. Kamel H, Healey JS (2017) Cardioembolic Stroke. *Circ Res* 120:514–526.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308407>
254. O'Carroll CB, Barrett KM (2017) Cardioembolic Stroke. *Continuum (Minneapolis)* 23:111–132. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000419>
255. Weir NU (2008) An update on cardioembolic stroke. *Postgrad Med J* 84:133–42; quiz 139–40. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.066563>
256. Candido R, Bernardi S, Allen TJ (2009) Linking diabetes and atherosclerosis. *Expert Rev Endocrinol Metab* 4:603–624. <https://doi.org/10.1586/eem.09.46>

257. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al. (2001) Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683–689.
<https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.683>
258. Mostaza JM, Lahoz C, Salinero-Fort MA et al. (2018) Factores de riesgo asociados con el grosor íntima-media y la presencia de placas en arteria carótida: Estudio ESPREDIA (Risk factors associated with the carotid intima-media thickness and plaques: ESPREDIA Study). *Clin Investig Arterioscler* 30:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2017.07.005>
259. Caplan LR, Wityk RJ, Glass TA et al. (2004) New England Medical Center Posterior Circulation registry. *Ann Neurol* 56:389–398. <https://doi.org/10.1002/ana.20204>
260. Nagel S (2017) Schlaganfall bei akutem Verschluss der A. basilaris : Diagnostik und Therapie (Stroke due to acute occlusion of the basilar artery : Diagnosis and treatment). *Med Klin Intensivmed Notfmed* 112:679–686.
<https://doi.org/10.1007/s00063-017-0347-0>
261. Uno J, Kameda K, Otsuji R et al. (2017) Mechanical Thrombectomy for Acute Basilar Artery Occlusion in Early Therapeutic Time Window. *Cerebrovasc Dis* 44:217–224.
<https://doi.org/10.1159/000479939>
262. Sporns PB, Hanning U, Schwindt W et al. (2017) Ischemic Stroke: Histological Thrombus Composition and Pre-Interventional CT Attenuation Are Associated with Intervention Time and Rate of Secondary Embolism. *Cerebrovasc Dis* 44:344–350.
<https://doi.org/10.1159/000481578>
263. Gunning GM, McArdle K, Mirza M et al. (2018) Clot friction variation with fibrin content; implications for resistance to thrombectomy. *J Neurointerv Surg* 10:34–38.
<https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2016-012721>
264. Hashimoto T, Hayakawa M, Funatsu N et al. (2016) Histopathologic Analysis of Retrieved Thrombi Associated With Successful Reperfusion After Acute Stroke Thrombectomy. *Stroke* 47:3035–3037. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015228>
265. Liebeskind DS, Sanossian N, Yong WH et al. (2011) CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke. *Stroke* 42:1237–1243.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.605576>
266. Sallustio F, Arnó N, Di Legge S et al. (2015) Histological Features of Intracranial Thrombo-Emboli Predict Response to Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke. *J Neurol Disord Stroke* 3 (3):1105

267. Simons N, Mitchell P, Dowling R et al. (2015) Thrombus composition in acute ischemic stroke: a histopathological study of thrombus extracted by endovascular retrieval. *J Neuroradiol* 42:86–92. <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2014.01.124>
268. Singh P, Doostkam S, Reinhard M et al. (2014) Cerebrovascular occlusive disease histopathological analysis of thrombi retrieved by endovascular mechanical extraction during acute ischemic stroke. *Int J Stroke* 9:143
269. Molina-Seguin J, Vena AB, Colas-Campas L et al. (2018) Revision sistemática de las características y pronóstico de los sujetos que sufren un ictus criptogénico no lacunar de mecanismo embólico (A systematic review of the characteristics and prognosis of subjects who suffer an embolic stroke of undetermined source). *Rev Neurol* 66:325–330
270. Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F et al. (2018) MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. *N Engl J Med* 379:611–622. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804355>
271. Muir KW, Buchan A, Kummer R von et al. (2006) Imaging of acute stroke. *The Lancet Neurology* 5:755–768. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70545-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70545-2)
272. Röther J, Schellinger PD, Gass A et al. (2002) Effect of intravenous thrombolysis on MRI parameters and functional outcome in acute stroke <6 hours. *Stroke* 33:2438–2445. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000030109.12281.23>
273. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S et al. (2018) Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 49:754–757. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.019896>
274. Peña-Martínez C, Durán-Laforet V, García-Culebras A et al. (2019) Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance. *Stroke* 50:3228–3237. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.026848>
275. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T et al. (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:e344–e418. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>

276. Alexandrov AV, Tsivgoulis G, Köhrmann M et al. (2019) Endovascular equipoise shift in a phase III randomized clinical trial of sonothrombolysis for acute ischemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis* 120:1756-1762. <https://doi.org/10.1177/1756286419860652>
277. Borrelli MJ, O'Brien WD, Hamilton E et al. (2012) Influences of microbubble diameter and ultrasonic parameters on in vitro sonothrombolysis efficacy. *J Vasc Interv Radiol* 23:1677-1684.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2012.08.019>
278. Birnbaum Y, Luo H, Nagai T et al. (1998) Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug: recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. *Circulation* 97:130-134. <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.2.130>
279. Culp WC, Porter TR, McCowan TC et al. (2003) Microbubble-augmented ultrasound declotting of thrombosed arteriovenous dialysis grafts in dogs. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 14:343-347. <https://doi.org/10.1097/01.rvi.0000058409.01661.b4>
280. Xie F, Tsutsui JM, Lof J et al. (2005) Effectiveness of lipid microbubbles and ultrasound in declotting thrombosis. *Ultrasound Med Biol* 31:979-985. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2005.03.008>
281. Xie F, Everbach EC, Gao S et al. (2011) Effects of attenuation and thrombus age on the success of ultrasound and microbubble-mediated thrombus dissolution. *Ultrasound Med Biol* 37:280-288. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.10.022>
282. Alonso A, Dempfle C-E, Della Martina A et al. (2009) In vivo clot lysis of human thrombus with intravenous abciximab immunobubbles and ultrasound. *Thromb Res* 124:70-74. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.11.019>
283. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R et al. (2013) Thrombus-targeted perfluorocarbon-containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis: in vitro and in vivo study. *J Thromb Haemost* 11:1565-1573. <https://doi.org/10.1111/jth.12321>
284. Shaw GJ, Meunier JM, Huang S-L et al. (2009) Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res* 124:306-310. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.01.008>

12 Anlagenverzeichnis

1. **Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Schmieger M, Weber PK, Stellmacher F, Trillenberg P, Eggers J, Seidel G. Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. *BMC Neurology* 2011, 11:58-67.**
2. **Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Sprenger A, Dempfle CE, Seidel G. The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2011, 22:407-415.**
3. **Roessler FC, Teichert A, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Tanislav Ch, Seidel G. Development of a new clot formation protocol for standardized in-vitro investigations of sonothrombolysis. *Journal of Neuroscience Methods* 2014, 237:26-32.**
4. **Roessler FC, Wang Z, Schumacher S, Ohlrich M, Kaps M, Menciassi A, Eggers J. In vitro examination of the thrombolytic efficacy of desmoteplase and therapeutic ultrasound compared with rt-PA. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2015, 41:3233-3240.**
5. **Frühwald T, Gärtner U, Stöckmann N, Marxsen JH, Gramsch C, Roessler FC. In vitro examination of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA. *BMC Neurology* 2019, 19:181-191.**
6. **Roessler FC, Schumacher S, Sprenger A, Gärtner U, Al-Khaled M, Eggers J. Clot formation in the presence of acetylsalicylic acid leads to increased lysis rates regardless of the chosen thrombolysis strategy. *Journal of Vascular Research* 2016, 53:128-137.**
7. **Roessler FC, Kalms N, Jann F, Kemmling A, Ribbat-Idel J, Stellmacher F, König IR, Ohlrich M, Rojl G. First approach to distinguish between cardiac and arteriosclerotic emboli of individual stroke patients applying the histological THROMBEX-classification rule. *Scientific Reports* 2021, 11:8433. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87584-2>.**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions

Florian C Roessler^{1*}, Marcus Ohlrich¹, Jan H Marxsen², Marc Schmieger³, Peter-Karl Weber³, Florian Stellmacher⁴, Peter Trillenber¹, Jürgen Eggers¹ and Günter Seidel⁵

Abstract

Background: Thrombolysis is a dynamic and time-dependent process influenced by the haemodynamic conditions. Currently there is no model that allows for time-continuous, non-contact measurements under physiological flow conditions. The aim of this work was to introduce such a model.

Methods: The model is based on a computer-controlled pump providing variable constant or pulsatile flows in a tube system filled with blood substitute. Clots can be fixed in a custom-built clot carrier within the tube system. The pressure decline at the clot carrier is measured as a novel way to measure lysis of the clot. With different experiments the hydrodynamic properties and reliability of the model were analyzed. Finally, the lysis rate of clots generated from human platelet rich plasma (PRP) was measured during a one hour combined application of diagnostic ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²) and a thrombolytic agent (rt-PA) as it is commonly used for clinical sonothrombolysis treatments.

Results: All hydrodynamic parameters can be adjusted and measured with high accuracy. First experiments with sonothrombolysis demonstrated the feasibility of the model despite low lysis rates.

Conclusions: The model allows to adjust accurately all hydrodynamic parameters affecting thrombolysis under physiological flow conditions and for non-contact, time-continuous measurements. Low lysis rates of first sonothrombolysis experiments are primarily attributable to the high stability of the used PRP-clots.

Background

In ischemic stroke therapy, a critical need exists for early treatment to prevent neuronal loss. Several trials have shown that thrombolytic therapy in cerebral ischemia can reduce stroke disability in selected patients. In addition, the increased use of thrombolytic therapy has revealed significant limitations and stimulated efforts to improve effectiveness and decrease bleeding complications.

The use of ultrasound to enhance thrombolytic therapy (called sonothrombolysis) represents a complementary approach with unique features, as its effects are limited to theinsonified area. Therefore, thrombolytic activity can be enhanced at the site of the vessel

occlusion without increasing the risk of systemic bleeding complications. Although the supporting effect of ultrasound for thrombolysis is proven [1-4] and an enhanced lysis rate by a combined exposure to ultrasound and thrombolytics [5-7] or gas-filled microbubbles has been demonstrated [8,9], the underlying mechanisms are still unknown and require further investigations. In-vitro models are most suitable for such basic research, because they are safe, facilitate fast and accurate adjustments of experimental parameters, are inexpensive compared to animal or clinical studies, and provide reproducible results.

Most in-vitro models study the effect of thrombolytics or ultrasound on a clot stored in a resting fluid by measuring its weight loss [6,7,10-13] or the wash-out of radioactivity when radiolabelled clots are used [14,15]. Other experimental setups provide clots within fluids

* Correspondence: florian.roessler@neuro.uni-luebeck.de

¹Department of Neurology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

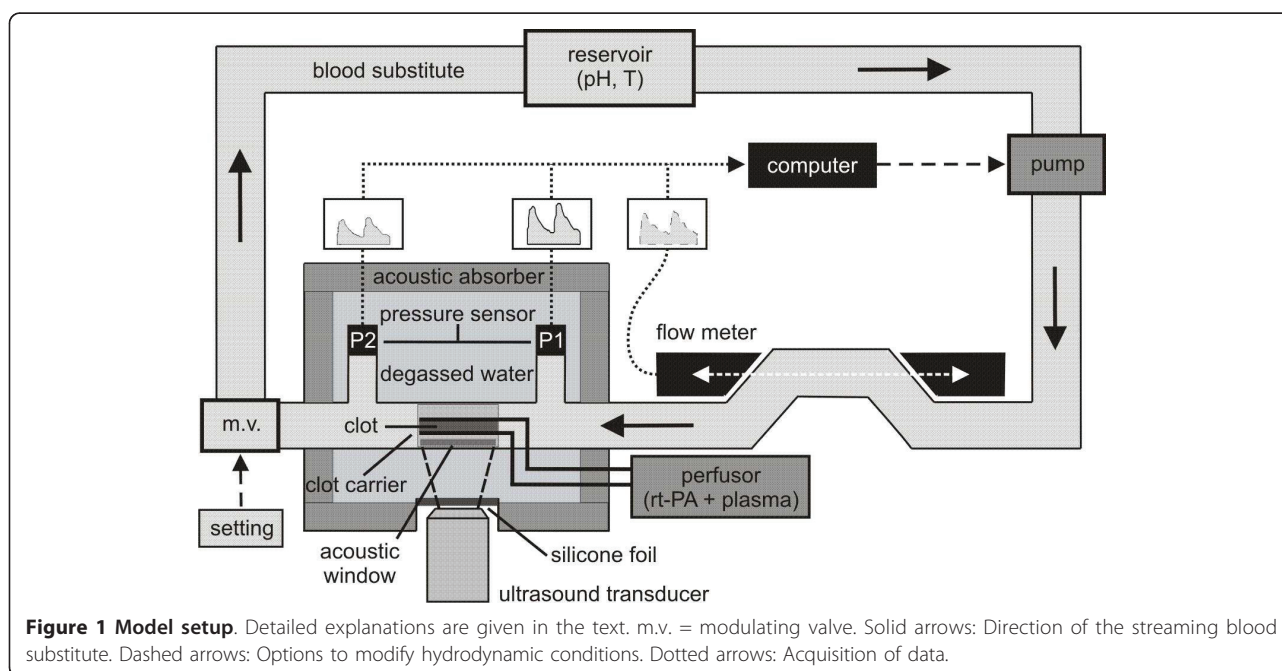
with a constant flow velocity [4,16-19]. Reperfusion is measured here by collecting the perfusion fluid per minute [16], by using photoelectric techniques [19], or by detecting flow velocities [18]. Clot dissolution is measured by weighing [4,17] or detecting concentrations of radiolabelled clot components [18]. A few investigators have applied roller pumps to generate pulsatile but unphysiological flow [20]. It has been frequently pointed out, however, that physiological flow and pressure have to be considered in experiments for thrombolysis, because the mechanical stress of streaming fluids affects clot lysis [21-25]. Knowledge about the interaction of thrombolysis and haemodynamic parameters such as blood pressure might lead to far-reaching consequences for clinical treatment [25-27].

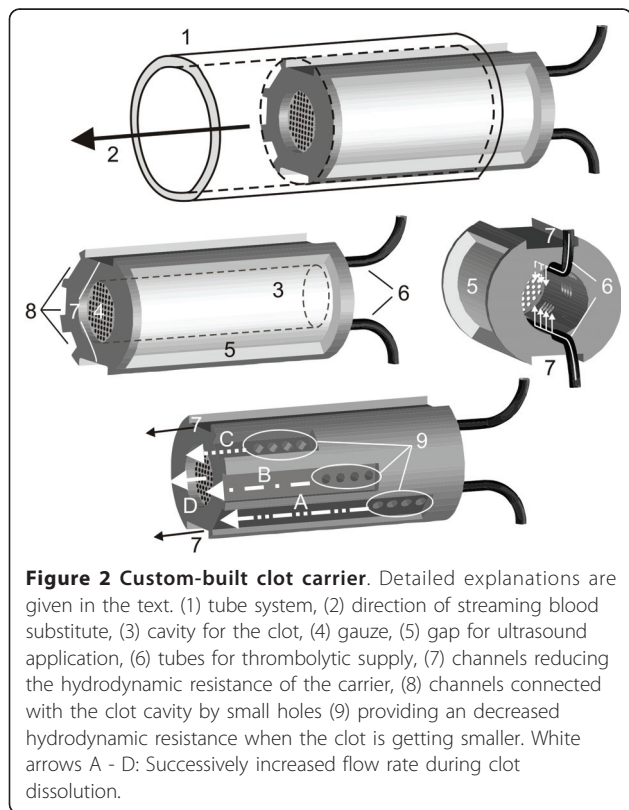
Only a few models allow temporally resolved measurements [18,19]. Time-continuous measurements of the temporal dynamic of thrombolysis, however, are essential in defining a lysis strategy that is both effective and safe. In most models, the clot has to be removed from the experimental setup to determine the lysis rate when using a method such as weighing. Methods like this interfere with the process of thrombolysis and might lead to inaccuracies.

In sight of these considerations the aim of this work was (1) to introduce a new in-vitro pulsatile flow model that meets these conditions, (2) to prove its reliability and describe its characteristics, and (3) to demonstrate its feasibility by first experiments.

Methods

The experimental setup is shown in Figure 1. A computer-controlled pump generates pulsatile flow velocities at defined values. A blood substitute (Ringer solution, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany), stored in a reservoir at a controlled temperature of 37°C and a pH of 7.4, circulates through a tube system (sheathed PVC, 6 mm inner diameter). Varying the computer-controlled flow velocity and the resistance of the tube system using a modulating valve (Teflon® 1/8" FNPT: Aalborg, Orangeburg NY, USA) leads to a defined adjustment of pressure and flow velocity at the same time. A clot is placed within a custom-built carrier, permitting accessibility for thrombolytics and ultrasound. The part of tube system containing the clot carrier runs through a basin filled with degassed water. Ultrasound is applied through a flexible silicone foil and enters the inside of the clot carrier through an acoustic window. Acoustic absorbers prevent ultrasonic reflections. Thrombolytics are applied at continuous rates via small tubes into the interior of the clot carrier (see also Figure 2). One flow velocity sensor before and two pressure sensors located 0.07 m before and behind the clot carrier are used to record data online. Because of its special shape, the pressure decline at the clot carrier is monotonically related to the hydrodynamic resistance of the clot and, therefore, to its size. We aim to detect reductions in this pressure decline as a new means of measuring the lysis rate of the clot.





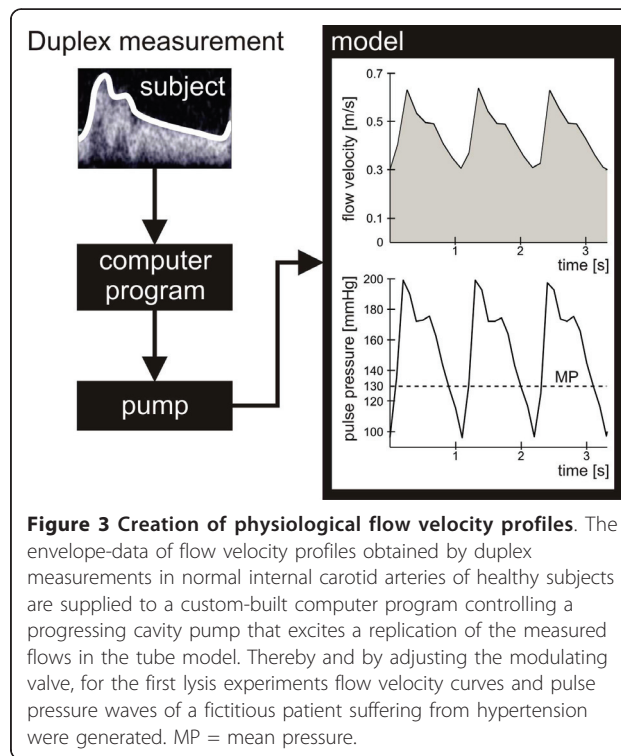
Computer-controlled pump

A progressing cavity pump (2-E15A: Netzsch, Selb, Germany) was used. With a custom-built program (LabVIEW) controlling the pump, any given pulsatile or constant flow velocity can be achieved within a range of 0 to 0.95 m/s. The pulsatile flow used in the experiments reflects common physiological flow velocity curves found in the internal carotid artery of healthy subjects recorded by duplex measurements (Figure 3).

Clot carrier

Figure 2 shows the design of the custom-built clot carrier. During the experiments, the carrier is located inside the tube system filled with the blood substitute. The carrier is composed of a cylindrical pipe made of polyoxymethylene (POM) with a concentric cavity where the clot is placed during the experiments.

The cavity is closed at the distal end by gauze. A gap at one side of the pipe allows the application of ultrasound with a minimized loss of energy. Using small tubes, human plasma and thrombolytics can be applied directly into the cavity of the pipe where the clot is located. Perfusor syringes (Pilot A2, Fresenius SE, Bad Homburg, Germany) ensure a uniform and defined application of plasma and thrombolytic agent. Thus the clot is ensheathed by a mixture of plasma and thrombolytic agent despite the circulating blood substitute. To



minimize the hydrodynamic resistance of the carrier, long channels allow the circulating fluid to pass by even if the cavity of the pipe is completely filled with a clot. Channels connected with the cavity by small holes drain more fluid when the clot becomes smaller and the blocked holes open. During clot lysis, the increased flow rate streaming through the cavity-connected-channels leads to a decreased pressure decline measured at the clot carrier.

Clot preparation

Human venous blood is obtained from different donors of the same blood group who are not taking anticoagulants or antithrombotic medications. Blood sampling has been approved by the ethics committee of the University of Lübeck and is conducted by the local Department of Transfusion Medicine, within the clinical routine. Blood is drawn into citrate tubes (S-Monovette®: REF 02.1067.001, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and pooled to avoid individual differences concerning the blood consistency and its quality of clotting. After centrifugation at 180g for 10 minutes (Multifuge® 1S-R: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany) 3.5 ml of platelet rich plasma (PRP) are removed by aspiration of the supernatant and mixed with 0.5 ml of the boundary layer, which formed between the supernatant and the erythrocyte layer. Clot formation is achieved by recalcification (final concentration of CaCl₂: 13.8 mmol/l) and incubation at 37°C for 2 hours.

Measurement of flow velocity

A custom-built ultrasonic flow meter (developed by the Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering IBMT, St. Ingbert, Germany) is used to measure flow velocity based on correlation methods. Two ultrasound transducers are placed directly opposite from each other and aligned parallel to the direction of the streaming fluid (Figure 1). The transducers work alternately as emitter or receiver. Thus, ultrasound can be emitted and received in both directions. In flow direction, the time of flight of the ultrasound (t_+) is shorter than in the reverse direction (t_-). Flow velocity is calculated by measuring the time of flight difference of the two emitting directions with a sampling rate of 1 Hz:

$$V \approx (t_- - t_+) / (t_- + t_+)^{-2} \quad (1)$$

Pressure measurement

Pressure sensors (REF I-99-IA-013, pvb[®]: Critical Care GmbH, Kirchseeon, Germany) are connected to the tube system before (P1) and behind (P2) the clot carrier for a continuous recording of the pressure decline at the clot carrier ($\Delta P = P1 - P2$).

Experimental analysis of the reliability of the model

According to Ohm's law the pressure decline that is measured to monitor thrombolysis depends not only on the clot volume but also on the flow velocity of the streaming blood substitute. Therefore a defined control of the flow velocity is necessary for all experiments with streaming fluids. The model was validated with three different measurements:

1) The accuracy of the flow meter was tested by volumetric measurements. 10 different constant flow velocities were excited by the pump and measured by the flow meter continuously for 5 minutes. The mean of the recorded data was compared with the flow velocity calculated from the collected fluid volume and the cross sectional area of the tube system.

2) The temporal stability of flow velocities excited by the pump was verified by continuous four-hour flow measurements using the ultrasonic flow meter. Two flow velocities were adjusted at the pump, that coincide with the minimum and maximum values of the pulsatile flow velocity used in the subsequent lysis experiments (0.29 and 0.64 m/s). To ensure stable testing conditions the clot carrier was totally filled with non-deformable POM.

3) Furthermore the dependence of flow velocity on the hydrodynamic resistance was analyzed. The pump was set to 5 different flow velocities within the available range of 0 to 0.95 m/s. Flow velocity was recorded for 1 minute in front of the gradually POM-charged clot carrier (0 - 100%) and averaged.

4) Finally the attenuation of ultrasound on its way to the cavity of the clot carrier was determined to test whether it coincides with values found in the literature for the attenuation of diagnostic ultrasound transcranially applied to the M1 segment of the middle cerebral artery of human beings. Ultrasound was supplied by a SONOS 2500 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) driven in the transcranial colour-coded ultrasound mode (2 MHz, 0.179 W/cm²) as it is commonly used for diagnostic purposes. A custom-built hydrophone (developed by the Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering IBMT, St. Ingbert, Germany) with a centre frequency of 2 MHz and a bandwidth of 100% (1 MHz - 3 MHz) was inserted into the centre of the cavity of the clot carrier. According to the experimental setup depicted in Figure 1 the clot carrier was located within the tube system that runs through the basin filled with degassed water. The distance between the hydrophone and the ultrasound transducer was 50 millimetre. Inside the clot carrier the ultrasound intensity I_1 was determined by the hydrophone and read off an oscilloscope (HP 54520A, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA). For reference measurements the ultrasound intensity I_0 was determined when ultrasound was applied from the water surface of the basin to the unshielded hydrophone mounted at the same distance of 50 mm within the degassed water. Attenuation A was determined five times by:

$$A = 10 \log (I_0 / I_1) \quad (2)$$

Experimental analysis of the hydrodynamic properties of the custom-built clot carrier

To describe the hydrodynamic properties of the custom-built clot carrier its resistance was calculated by Ohm's law on the basis of pressure declines at the clot carrier at different filling levels and flow velocities of the streaming blood substitute. For each flow velocity and each filling level three independent measurements of the pressure decline were performed. For each measurement the clot carrier was completely disassembled into its component parts and afterwards reassembled. Again, POM was used for the fillings.

First non-contact and time-continuous measurements of in-vitro thrombolysis

To prove the feasibility of the model the pressure decline at the clot-filled carrier was time-continuously measured for clots solely undergoing a defined pulsatile flow (group A). Flow and pressure were adjusted before the clot carrier was filled to simulate the hydrodynamic situation within the internal carotid artery of a patient with hypertension (Figure 3). Systolic and diastolic flow

velocities were set to 0.64 and 0.29 m/s, respectively, leading to a mean pressure (MP) of 130 mmHg.

In a second experimental group B the pressure decline was determined for clots under the same flow conditions and the influence of a typical scenario of sonothrombolysis using diagnostic ultrasound and rt-PA (Actilyse®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Germany) as thrombolytic drug. Starting at t = 60 minutes diagnostic ultrasound as described above was continuously applied for 1 hour. The distance between the clot within the clot carrier and the ultrasound transducer was 50 millimetres corresponding to the distance between the M1 segment of the human middle cerebral artery and the acoustic window of the human temporal bone. During ultrasound application 80 ml of a mixture of rt-PA and human blood plasma (final concentration of rt-PA: 60 kU/ml) were continuously injected into the clot carrier. Incubation time for clots of group B was reduced to 1 hour. In both groups A and B the same pulsatile flow was used. For each group 5 experiments with a clot-filled carrier were performed.

A slight shifting of the pressure decline is expected caused by small fluctuations of the flow velocity and temperature of the model. To evaluate this biased error 5 additional measurements with the carrier filled with non-deformable POM were made for each group A and B under the same experimental setups as they were used for the experiments with the clots. These additional measurements serve as control groups. In each experiment, the pressure decline at the clot carrier was continuously measured over a period of 4 hours, using a sampling rate of 10 Hz. Data were processed as follows:

$\Delta P_{F,i}^E(t,V)$ ($i = 1, \dots, n$) is defined to be the pressure decline measured in one of $n = 5$ experiments of group $E = A$ or B with the carrier filled by a clot ($F = \text{CLOT}$) or POM ($F = \text{POM}$). The biased error $D^E(t,V)$ is determined for each group E by

$$D^E(t,V) = \overline{\Delta P_{POM}^E(t,V)} - \overline{\Delta P_{POM}^E(0,V)} \text{ with } \overline{\Delta P_{POM}^E(t,V)} = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 \Delta P_{POM,i}^E(t,V) \text{ and } E = A, B. \quad (3)$$

$\overline{\Delta P_{POM}^E(t,V)}$ is the mean pressure decline of each control group. The biased error is subtracted from each time course measured with a clot under the appropriate experimental condition. For each group A and B this leads to 5 error adjusted time series $Y_{\text{CLOT},i}^E(t,V)$ of the measured pressure decline:

$$Y_{\text{CLOT},i}^E(t,V) = \Delta P_{\text{CLOT},i}^E(t,V) - D^E(t,V) \text{ with } i = 1, \dots, 5 \text{ and } E = A, B. \quad (4)$$

To allow for a direct comparison between all experiments the “normalized pressure decline” $Z_{\text{CLOT},i}^E(t)$ was

defined. It is a dimensionless quantity determined by

$$Z_{\text{CLOT},i}^E(t) = \frac{Y_{\text{CLOT},i}^E(t,V)}{Y_{\text{CLOT},i}^E(0,V)} \text{ with } i = 1, \dots, 5 \text{ and } E = A, B. \quad (5)$$

At the start of each measurement ($t = 0$) the value of the normalized pressure decline is 1. When the hydrodynamic resistance of the clot decreases during the measurement the values of $Z_{\text{CLOT},i}^E(t)$ are less than 1 and tend to a small positive value near zero when the clot dissolves completely. The following data of $Z_{\text{CLOT},i}^E(t)$ are reported as mean \pm standard error of mean.

Results

Reliability of the model

1) Measuring flow velocity by flow meter lead to marginally lower values compared with results of the volumetric measurement. Within the measuring range of 0 to 0.95 m/s the relative error never exceeded 0.04% (Figure 4).

2) A slight decrease was found for constantly adjusted flow velocities in the course of a four-hour measurement. Its maximum value accounted for 2.34% (Figure 5).

3) Flow velocities generated by the pump varied sparsely with changed hydrodynamic resistance. Within the available flow velocity range of 0 to 0.95 m/s no filling

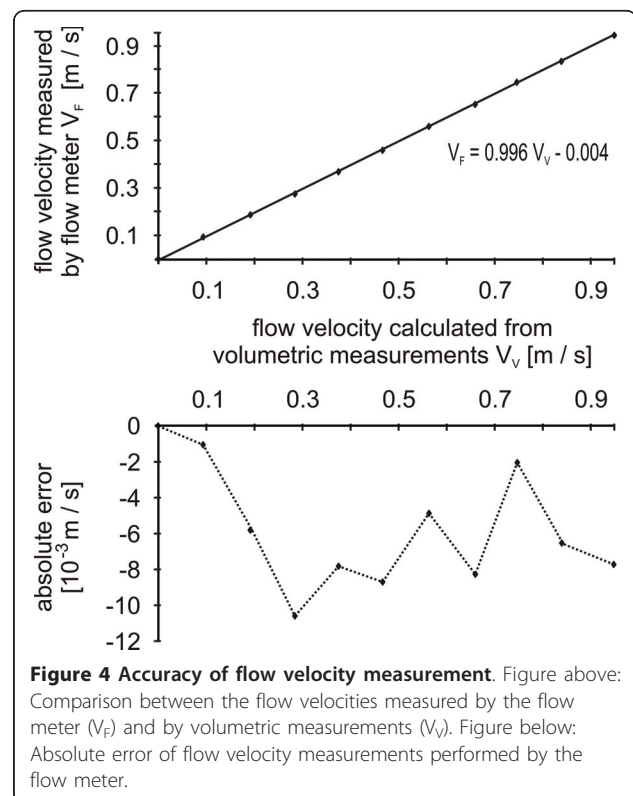
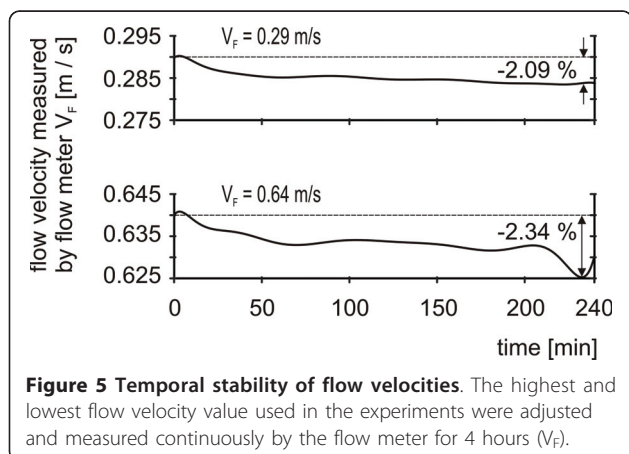


Figure 4 Accuracy of flow velocity measurement. Figure above: Comparison between the flow velocities measured by the flow meter (V_f) and by volumetric measurements (V_v). Figure below: Absolute error of flow velocity measurements performed by the flow meter.



level of the clot carrier caused a relative error beyond 0.81% (Figure 6).

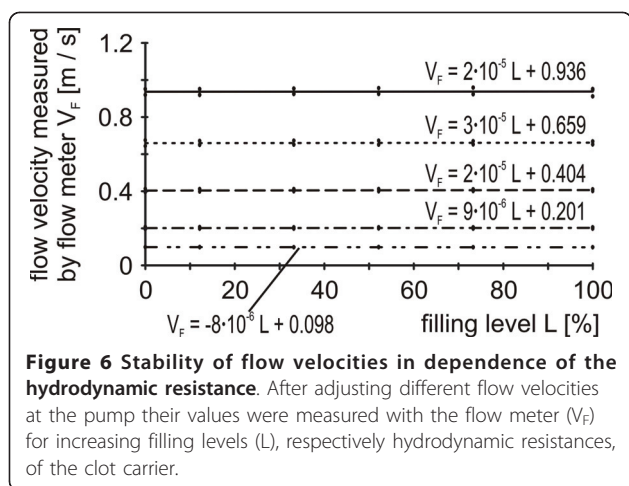
4) For the attenuation of diagnostic 2 MHz-ultrasound (0.179 W/cm^2) a value of $7.3 \text{ dB} \pm 0.7 \text{ dB}$ was found for the described experimental setup.

Hydrodynamic properties of the custom-built clot carrier

At low filling levels the resistance of the clot carrier was constant and independent of the flow velocity of the streaming blood substitute. With increasing filling levels the hydrodynamic resistance of the clot carrier increased exponentially and was correlated by a power law with increasing flow velocities. Repeated measurements showed reproducible results (Figure 7).

First measurements of in-vitro thrombolysis

In a four-hour period, no significant difference in thrombolysis between the conditions A and B (Figure 8) was detected. Clots prepared from platelet rich plasma with an incubation time of 2 hours showed only a negligible dissolution under the adjusted pulsatile flow



(group A). During the first minutes the normalized pressure decline of group A temporarily increased and stabilized finally at a mean value of about 0.98. Dissolution increased non-significantly in group B. Comparing to group A, clots prepared from platelet rich plasma with an incubation time of only 1 hour dissolved a little bit more during the first hour of the experiment reaching an intermediate value just below 0.96. After treatment with ultrasound and rt-PA the normalized pressure decline further decreased and stabilized at a mean value of about 0.91.

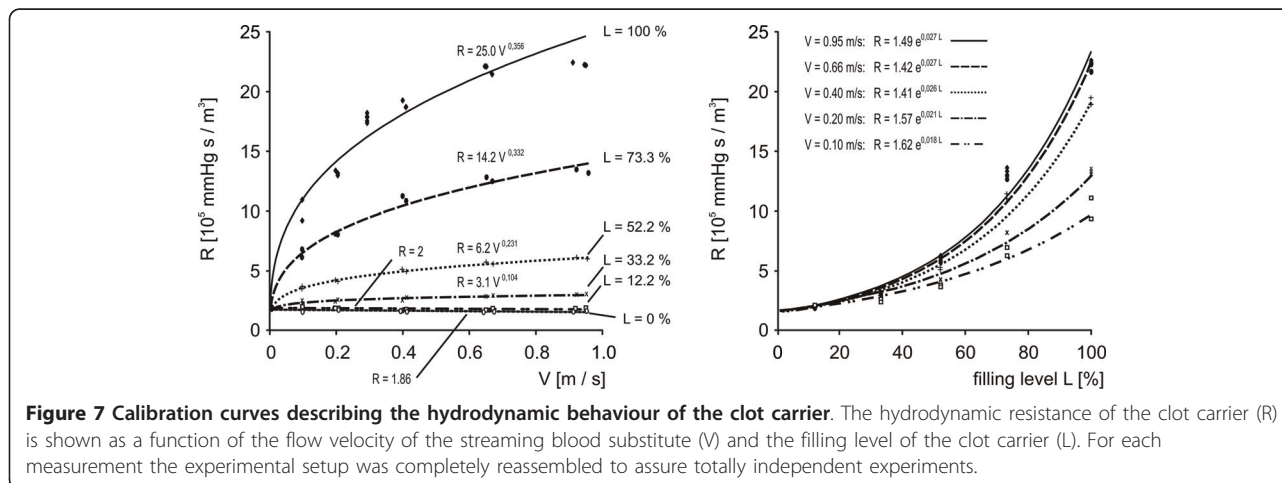
Discussion

We created an in-vitro pulsatile flow model for the investigation of thrombolysis. In contrast to all previously used experimental setups, the model generates defined physiological or pathological flow conditions. The model allows for time-continuous and non-contact measurements based on the recording of pressure gradients. Compared with other methods of measurement (e.g. magnetic resonance imaging [21], chemical analysis or radiolabeling [14,15,18]), this technique is very inexpensive.

In various experiments the model proved its operational reliability. Flow velocities can be adjusted accurately, remain sufficiently stable for long experimental periods and are nearly independent of the filling levels of the clot carrier. For each measurement of the calibration curve (Figure 7) the experimental setup was completely reassembled to assure totally independent experiments. The collected data prove high reproducibility of the method.

Investigations of the hydrodynamic behaviour of the clot carrier show that clot dissolution can be observed with highest resolution at high filling levels where the highest gradients of the hydrodynamic resistance of the clot carrier are found (Figure 7). Therefore, the model is most suitable for the discrimination of small lysis rates. With increasing filling levels and flow velocities there is an increased eddying flow leading to a non-linear hydrodynamic resistance of the clot carrier. This hydrodynamic behaviour reflects in-vivo turbulences in the region of vessel stenosis and requires an accurate mathematical analysis of the recorded data. For comparing lysis rates achieved under different flow conditions a diagram with rating curves as depicted in Figure 9 is needed.

First experiments concerning the lysis rates of clots prepared from platelet rich plasma reveal only small effects. For group A the hydrodynamic resistance of the clots temporarily increases, probably because the clots are pressed into the carrier by the streaming fluid and a mechanically induced deformation might lead to a tighter occlusion. Although this effect might also occur in group B, the normalized pressure decline decreases,



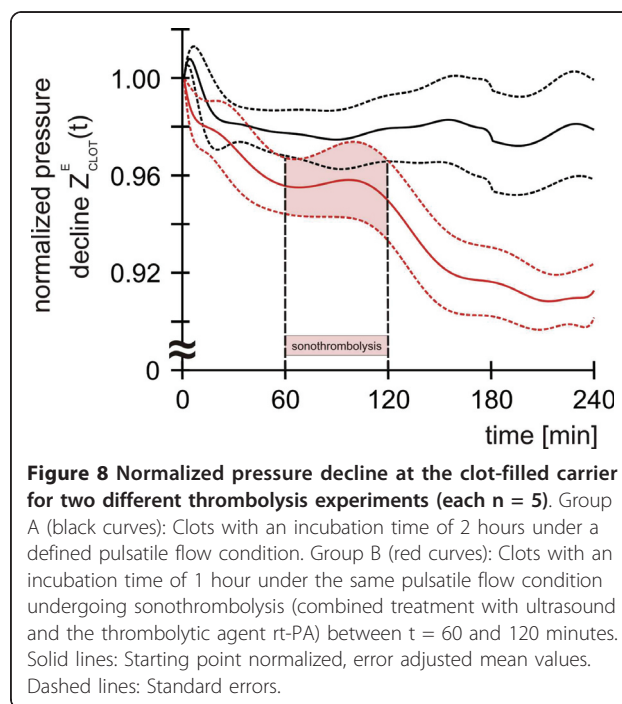
probably caused by the reduced incubation time leading to a lower strength of the less compact clots and an increased attrition at their surfaces. This might also be the reason for the further drop of the normalized pressure decline in group B during the first hour of the experiment. The data do not permit a decision whether the second drop of the normalized pressure decline in group B, starting after approximately 100 minutes, is attributable to those mechanical forces or the impact of sonothrombolysis. Therefore higher lysis rates have to be achieved, which would enable the discrimination between experiments with or without the application of sonothrombolysis. The small lysis rates found in the reported experiments are presumably caused by the following reasons:

1. Thrombolysis is mainly affected by the composition of the used clots [24]. The platelet rich clots of the current experiments are of a very firm and robust consistence with a relative clot mass loss of about 17% after a 2-hour incubation at 37°C in a solution of buffered plasma with pH = 7.4 and rt-PA (final concentration: 60 kU/ml) [28]. According to Mizushige et al. [29] who reported on low lysis rates for artificial white thrombi, this is low compared to the mass loss of about 64% we found under the same treatment for clots generated by spontaneously clotted whole venous blood [28]. Such clots are used by many other research groups for experiments with static or non-physiological flow conditions [4,11]. On the other hand, spontaneously clotted whole venous blood is unsuited for experiments under physiological flow conditions because it completely dissolves within seconds under the influence of the streaming fluid [28]. This work was not focused to investigate the clotting process in detail but the results point out that for future experiments clots are needed that resist pulsatile flows on the one hand, and show sufficient lysis rates on the other hand. In our opinion, the low lysis

rates of the first experiments with platelet rich clots reflect those clinical situations, in which delayed, incomplete, or even no lysis are observed [30].

- 2) It might be possible, that the used amount of rt-PA and plasma is too small for a sufficient thrombolysis. Therefore dose-finding experiments are planned.

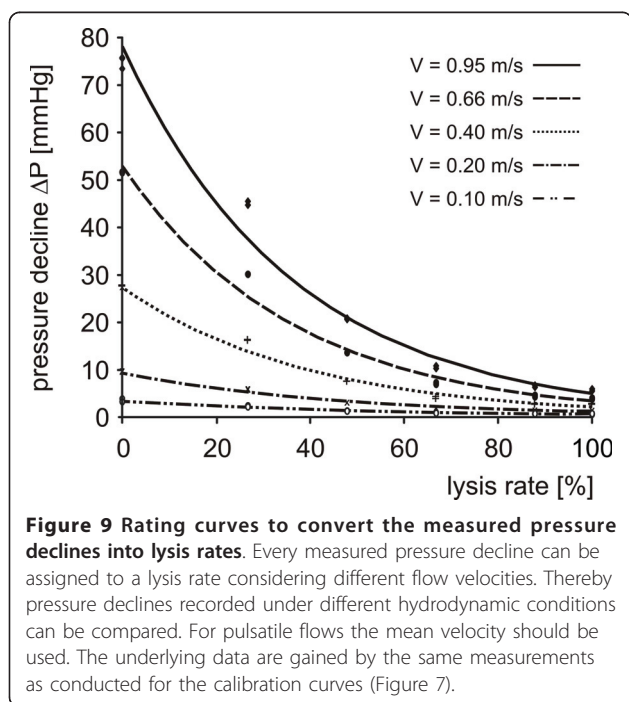
- 3) Finally attenuation of the applied ultrasound might be too high. Measurements revealed a value of about 7.3 dB for the used diagnostic 2 MHz-ultrasound (0.179 W/cm²) in the described experimental setup. Aaslid et al. report on a value of 7.0 dB for a 2 MHz-ultrasound passing through the human skull [31]. Pfaffenberger et al. determined ultrasound attenuations between 8.8 and



21.2 dB using 5 temporal bones of different thickness and a diagnostic ultrasound device (Sonos 4500, Philips, Hamburg, Germany) with a mean frequency of 1.8 MHz [10]. Although these data imply that attenuation measured in the experimental setup has the appropriate physiological dimension, it has to be considered that measurements carried out with different ultrasound devices can not be compared directly.

Despite low lysis rates the essential advantage of the presented model is clearly evident: Unlike all previously used models the dynamic process of thrombolysis can now be observed online and time-continuously without touching the clot and interfering with the process of lysis. As any model of physiological systems, the method includes also certain simplifications:

1. The complex function of the endothelium is not considered and blood has to be replaced by a substitute to avoid uncontrollable coagulation. Interactions between blood and artificial surfaces of the model will inevitably lead to unforeseeable changes of coagulation and fibrinolysis [32] just like the use of anticoagulated blood [33]. To avoid those complications we decided to use a Ringer solution as circulating blood substitute and to inject plasma directly into the clot carrier during the process of sonothrombolysis. Thereby, we hope to create a physiological microenvironment of plasma ensheathing the clot. Compared with blood, the Ringer solution we used has a lower viscosity. If the measured effects were attributable to merely the mechanical properties of the used fluid, however, they should be more pronounced in vivo.



2. Measurement errors caused by slight changes of the flow velocity and temperature of the model vary with the chosen hydrodynamic condition. We calculated an error adjusted pressure decline for an individual correction of each modelled hydrodynamic condition. From a mathematical point of view this is not absolutely correct because different measurements were offset against each other.

3. Even the empty clot carrier has a measurable hydrodynamic resistance. Therefore the defined normalized pressure decline that always starts with the value 1 can never reach value 0. This leads to problems when high lysis rates of experiments with different flow velocities are compared, because the final value attained for complete clot dissolution varies in dependence of the adjusted flow velocity. In such cases the normalized pressure decline has to be replaced by conversions based on the measured rating curves (Figure 9).

4. The presented experiments can not differentiate between mechanical deformation and enzymatic lysis of the clots. In future the D-dimer level in the streaming fluid will be determined as a marker for enzymatic fibrinolysis to overcome this inaccuracy.

Conclusion

Despite all mentioned limitations, we believe that our model is suitable for investigating the effects of mechanical and biochemical forces on clot dissolution. Thrombolysis is monitored by a new technique that is based on the measurement of the pressure decline at the clot carrier. The model enables the assessment of physiological flow conditions and non-contact, time-continuous measurements without disturbing the process of thrombolysis, as well as a defined adjustability of parameters and accessibility for thrombolytics and ultrasound.

The temporal effect of commonly used lysis strategies can now be investigated with high resolution. The online presentation of the measured data allow for an interactive and precise change of the model parameter even during the course of an experiment. Therefore the model provides ideal conditions for investigations of the mode of action of sonothrombolysis and will be a powerful tool in finding the most effective lysis strategy.

Acknowledgements

The authors thank the Department for Ultrasound Systems Development of the Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering (IBMT) in St. Ingbert, Germany, for providing technical equipment and support, Dr. Andreas Sprenger (Department of Neurology, University Hospital of Schleswig-Holstein) for advice in statistical matters, the scientific workshop of the University Hospital of Schleswig-Holstein for making various custom devices, and the Department of Transfusion Medicine at the University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (director: PD Dr. S. Görg), for allocating blood. Finally, we thank all blood donors for their attendance in support our scientific efforts.

This work was supported in part by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim, Germany). The first author is the recipient of research funding from the Faculty of Medicine of the University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (E05-2008).

Author details

¹Department of Neurology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany.

²Department of Internal Medicine, Haematology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany. ³Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering (IBMT), Ultrasound Systems Development, Ensheimer Str. 48, 66386 St. Ingbert, Germany.

⁴Research Centre Borstel, Clinical and Experimental Pathology, Parkallee 3a, 23845 Borstel, Germany. ⁵Department of Neurology, Asklepios Klinik Nord, Langstedter Landstr. 400, 22417 Hamburg, Germany.

Authors' contributions

FCR designed the model, carried out the experiments, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. MO assisted in doing the experiments and made substantial contributions to acquisition of data. JHM and FS were substantially involved in all questions concerning the clot preparation. MS and PKW provided technical equipment and support. PT made substantial contributions to analysis and interpretation of data. JE made substantial contributions to interpretation of data. GS made important contributions to the model design and interpretation of data. All authors revised the manuscript critically and approved its final version.

Competing interests

The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written. There are no conflicts of interest.

Received: 19 February 2011 Accepted: 26 May 2011

Published: 26 May 2011

References

- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moyé LA, Hill MD, Wojner AW: **Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke.** *The New England Journal of Medicine* 2004, **351**:2170-2178.
- Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PhA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC: **High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring.** *Stroke* 2000, **31**:610-614.
- Eggers J, Seidel G, Koch B, König IR: **Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA.** *Neurology* 2005, **64**:1052-1054.
- Nedelmann M, Brandt Ch, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, Dieterich M: **Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies.** *Cerebrovascular Diseases* 2005, **20**:18-22.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G: **Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type Plasminogen activator in acute middle cerebral main stem occlusion.** *Stroke* 2008, **39**:1470-1475.
- Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M: **Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull.** *Ultrasound in Medicine & Biology* 1999, **25**:269-273.
- Frenkel V, Oberoi J, Stone MJ, Park M, Deng C, Wood BJ, Neeman Z, Horne M, Li KC: **Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances thrombolysis in an in-vitro model.** *Radiology* 2006, **239**:86-93.
- Perren F, Loulidi J, Poglia D, Landis T, Sztajzel R: **Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke.** *J Thromb Thrombolysis* 2008, **25**:219-223.
- Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Huertas R, Purroy F, Alvarez-Sabin J: **Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator.** *Stroke* 2006, **37**:425-429.
- Pfaffenberger St, Devcic-Kuhar B, Kollmann Ch, Kastl StP, Kaun Ch, Speidl WS, Weiss ThW, Demyanets S, Ullrich R, Sochor H, Wöber Ch, Zeitlhofer J, Huber K, Gröschl M, Wojta J, Gottsauner-Wolf M: **Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in-vitro skull model.** *Stroke* 2005, **36**:124-128.
- Holland ChK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ: **Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in-vitro porcine clot model.** *Thromb Res* 2008, **121**:663-673.
- Rosenschein U, Furman V, Kerner E, Fabian I, Bernheim J: **Ultrasound imaging-guided non-invasive ultrasound thrombolysis.** *Circulation* 2000, **102**:238-245.
- Holscher T, Raman R, Ernström K, Parrish J, Le DT, Lyden PD, Mattrey RF: **In vitro sonothrombolysis with duplex ultrasound: first results using a simplified model.** *Cerebrovasc Dis* 2009, **28**:365-370.
- Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL, Dalecki D, Child S, Francis CW: **Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound.** *Circulation* 1998, **98**:1030-1035.
- Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM: **Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis.** *Circulation* 1992, **86**:1257-1264.
- Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M: **Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound.** *Ultrasound in Medicine & Biology* 2001, **27**:1683-1689.
- Soltani A, Volz KR, Hansmann DR: **Effect of modulated ultrasound parameters on ultrasound-induced thrombolysis.** *Phys Med Biol* 2008, **53**:6837-6847.
- Harpaz D, Chen X, Francis CW, Marder VJ, Meltzer RS: **Ultrasound enhancement of thrombolysis and reperfusion in-vitro.** *J Am Coll Cardiol* 1993, **21**:1507-1511.
- Olsson SB, Johansson B, Nilsson AM, Olsson C, Rojjer A: **Enhancement of thrombolysis by ultrasound.** *Ultrasound Med Biol* 1994, **20**:375-382.
- Kwan D, Dries A, Burton T, Bhandari G, Young D, Green R, Ouriel K, Greenberg RK: **Thrombus characterization with intravascular ultrasound: potential to predict successful thrombolysis.** *J Endovasc Ther* 2003, **10**:90-98.
- Blinic A, Kennedy SD, Bryant RG, Marder VJ, Francis CW: **Flow through clots determines the rate and pattern of fibrinolysis.** *Thromb Haemostasis* 1994, **71**:230-235.
- Greenberg RK, Ouriel K, Srivastava S, Shortell C, Ivancev K, Waldman D, Illig K, Green R: **Mechanical versus chemical thrombolysis: an in-vitro differentiation of thrombolytic mechanisms.** *J Vasc Interv Radiol* 2000, **11**:199-205.
- Serša I, Vidmar J, Grobelnik B, Mikac U, Tratar G, Blinc A: **Modelling the effect of laminar axially directed blood flow on the dissolution of non-occlusive blood clots.** *Phys Med Biol* 2007, **52**:2969-2985.
- Sakharov DV, Rijken DC: **The effect of flow on lysis of plasma clots in a plasma environment.** *Thromb Haemost* 2000, **83**:469-474.
- Diamond SL, Anand S: **Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis.** *Biophys J* 1993, **65**:2622-2643.
- Tsvigoulis G, Saqqur M, Sharma VK, Lao AY, Hill MD, Alexandrov AV: **Association of pretreatment blood pressure with tissue plasminogen activator-induced arterial recanalization in acute ischemic stroke.** *Stroke* 2007, **38**:961-966.
- Grabska K, Niewada M, Sarzyńska-Długosz I, Kamiński B, Członkowska A: **Pulse pressure-independent predictor of poor early outcome and mortality following ischemic stroke.** *Cerebrovasc Dis* 2009, **27**:187-192.
- Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Sprenger A, Dempfle CE, Seidel G: **The platelet-rich plasma clot: A standardised in vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows.** *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2011, accepted.
- Mizushige K, Kondo I, Ohmori K, Hirao K, Matsuo H: **Enhancement of ultrasound-accelerated thrombolysis by echo contrast agents: Dependence on microbubble structure.** *Ultrasound in Medicine & Biology* 1999, **25**:1431-1437.
- Wunderlich MT, Goertler M, Postert T, Schmitt E, Seidel G, Gahn G, Samii C, Stolz E: **Recanalization after intravenous thrombolysis. Does a recanalization time window exist?** *Neurology* 2007, **68**:1364-1368.
- Aaslid R: *Transcranial Doppler sonography* Berlin: Springer; 1986.
- Edmunds LH Jr: **Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass.** *J Card Surg* 1993, **8**:404-410.
- Paparella D, Semeraro F, Scrascia G, Galeone A, Ammollo CT, Kounakis G, de Luca Tupputi Schinosa L, Semeraro N, Colucci M: **Coagulation-fibrinolysis**

changes during off-pump bypass: effect of two heparin doses. *Ann Thorac Surg* 2010, **89**:421-427.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/11/58/prepub>

doi:10.1186/1471-2377-11-58

Cite this article as: Roessler et al.: Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. *BMC Neurology* 2011 **11**:58.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows

Florian C. Roessler^a, Marcus Ohlrich^a, Jan H. Marxsen^b, Florian Stellmacher^c, Andreas Sprenger^a, Carl-Erik Dempfle^d and Günter Seidel^e

No agreement exists about which protocol for in-vitro clot formation is suitable for sonothrombolysis investigations. Lysis rates vary considerably because of different clotting processes and cannot be compared. We aim to establish a new protocol for in-vitro coagulation to permit standardized sonothrombolysis investigations. The proposed procedure is based upon clots prepared from platelet-rich plasma (PRP). This clot material (group A) was compared with the two most commonly used procedures, namely, recalcification of citrate-anticoagulated whole venous blood (group B) and spontaneous clotting of nonanticoagulated venous blood (group C). Histological examinations were performed and clot stability was tested under physiological flow conditions *in vitro* for all groups (each $n = 10$). Lysis rates measured by mass loss were compared using buffered plasma and recombinant tissue plasminogen activator (60 kU/ml), or buffered plasma alone. PRP clots displayed a high degree of similarity to emboli specimens in histological examinations and remained stable under pulsatile flow conditions. B and C clots were mechanically unstable and did not resist physiological flow and pressure.

Introduction

Although clinical trials indicate that sonothrombolysis is an effective treatment for acute ischaemic stroke [1–3] some dispute arises because it may be associated with an increased rate of intracranial haemorrhage [2,4]. To minimize harm to patients, inexpensive in-vitro models are needed to study the effects of sonothrombolysis and to optimize its system settings.

A large number of different in-vitro models have been used, which measure lysis rates using ultrasound alone or in combination with thrombolytic drugs or microbubbles. Despite their differences, all these models rely on in-vitro clot formation and measurement of lysis rates.

The protocols used for clot preparation are astonishingly heterogeneous. Many researchers use spontaneously clotting nonanticoagulated venous blood [5–7] or recalcified, citrated venous blood [8–10]. The lack of standardization makes comparisons between experimental series difficult. Even results reported by the same group may differ enormously between different experimental series. For example, the lysis rate of untreated clots in one test run was reported to be higher than the lysis rate of clots treated with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) in another examination [8,9].

Measuring the lysis rate by weighing seems to be inaccurate, with lowest variability in PRP clots. PRP clots appeared more resistant to lysis. PRP clots should be used for standardized sonothrombolysis investigations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22:407–415 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2011, 22:407–415

Keywords: clot formation protocol, histological examination, in-vitro experiment, physiological flow conditions, sonothrombolysis

^aDepartment of Neurology, University Lübeck, Ratzeburger Allee, Lübeck, ^bDepartment of Internal Medicine, Haematology, University Lübeck, Ratzeburger Allee, Lübeck, ^cResearch Center Borstel, Clinical and Experimental Pathology, Parkallee, Borstel, ^dDepartment of Internal Medicine, University Medical Center Mannheim, Theodor Kutzer Ufer, Mannheim and ^eDepartment of Neurology, Asklepios Clinic Heidberg, Tangstedter Landstraße, Hamburg, Germany

Correspondence to Dr rer-medic Dipl-Phys Florian C. Roessler, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany
Tel: +49 451 500 2926; fax: +49 451 500 2489;
e-mail: florian.roessler@neuro.uni-luebeck.de

Received 19 October 2010 Accepted 25 February 2011

Physiological clot formation requires the presence of plasma and corpuscular blood components, including the components of the coagulation cascade, sources of tissue factor, and platelets. Platelets are essential for coagulation in a high shear rate system [11]. Platelets adhere to sites of endothelial injury by directly or indirectly interacting with subendothelial proteins. Platelets, upon activation, provide negatively charged phospholipid surfaces that are needed for thrombin generation, calcium, and various coagulation factors. Fibrin is stabilized by the introduction of covalent bonds between gamma and alpha chains of adjacent fibrin monomer units within the fibrin polymer [11]. Clots are rendered more resistant towards proteolysis by the covalent linkage of alpha-2-plasmin-inhibitor to fibrin and by the incorporation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) into the clot [12]. PAI-1 is partially derived from activated platelets. Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFIa) is a carboxypeptidase generated at high thrombin concentration, which further modifies fibrin by cleaving terminal lysine residues essential for the binding of plasminogen and plasmin [12]. Finally, contractile proteins from platelets that are incorporated into the clot cause clot retraction. Activated platelets also release potent vasoconstrictors and growth factors.

Until now, lysis rates are mostly determined by the relative clot mass loss [5,6,13], measurements of radioactivity using radiolabelled clots [14–16], or measurements of clot perfusion in constant flow models [17]. Although thrombolysis is a dynamic, time-dependent process and flow might be of great importance with regard to thrombolysis efficacy, no model was found in the literature that allows a noncontact and time continuous measurement of lysis rates under physiological pulsatile flow conditions.

With our experiments we pursue three aims:

- (1) We want to establish a new suitable clot formation protocol for experiments involving sonothrombolysis. This protocol should consider the particular importance of platelets and should be simple and reproducible.
- (2) We want to show that clots prepared by this protocol more closely resemble clots formed *in vivo* concerning structural and functional properties than clots formed by two other clotting procedures used by the majority of investigators for sonothrombolysis models (i.e. recalcification of citrate-anticoagulated venous blood and spontaneous clotting of nonanticoagulated venous blood).
- (3) We want to compare the properties of the three clot types under a common lysis procedure with rt-PA.

Materials and methods

Clot preparation

Human venous blood was obtained from different healthy donors (8–10 ml each) of the same blood group who were not taking anticoagulants or platelet function inhibitors. Blood sampling was approved by the ethics committee of the University of Lübeck and was conducted by the local Department of Transfusion Medicine, within the blood donation program.

Blood was drawn into citrate (S-Monovette, REF 02.1067.001; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) or sterile plastic tubes (REF 55.468.001; Sarstedt) and was pooled to avoid individual differences concerning blood consistency and its quality of clotting. The final concentration of trisodium citrate in blood-filled tubes was 0.0106 mol/l.

Clots were formed by three different clot formation protocols. Group A represents clots gained by a new clot formation protocol using platelet-rich plasma (PRP). The processes of clotting used in groups B and C were adopted from the literature [5–10]. For all clotting processes an incubation time of 2 h was chosen according to the majority of protocols found in the literature.

Platelet-rich plasma -clot (group A)

After centrifugation of citrate-anticoagulated blood at 180g for 10 min (Multifuge 1S-R; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany), 3.5 ml PRP were removed by aspiration of the supernatant. To add some erythrocytes, PRP was

then mixed with 0.5 ml of the boundary layer, which formed between the supernatant and the erythrocyte layer. Clot formation was initiated by adding CaCl₂ to a final concentration of 13.8 mmol/l, and incubation at 37°C for 2 h in sterile plastic tubes. The constituents of the human venous blood and the mixture of PRP and boundary layer were determined before the clotting process was started (Micros 60 OS/OT, HORIBA ABX Diagnostics, BP 7290, 34184 Montpellier Cedex 4, France).

Recalcified human venous blood drawn in citrate tubes (group B)

Clot formation of 3 ml citrate-anticoagulated venous blood was initiated by recalcification (final concentration of CaCl₂ = 13.8 mmol/l) and incubation at 37°C for 2 h in sterile tubes.

Spontaneously clotted human venous blood (group C)

Three millilitre blood drawn into sterile plastic tubes clotted spontaneously at 37°C for 2 h.

The different clot formation protocols will be referred to as factor 'TYPE' in the statistical analysis.

Histological examination

For each clot type, 10 clots were fixed in 4% formaldehyde for 24 h. Afterwards the clots were embedded in paraffin wax and were stained with haematoxylin and eosin before histological evaluation by an experienced pathologist who was blinded as to the method used for clot preparation. Histological appearance was compared with four fresh thrombi which were removed by neuro-radiological emergency interventions from cerebral arteries of patients who suffered a stroke. Three thrombi were captured from the basilar artery, one from the middle cerebral artery. All examinations were performed with an Axioskop 40 with Plan Neofluar objectives and a bright field condenser (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg, Germany). After conventional histological examination the specimens were stained with Ladewig stain. For detecting thrombocytes the material was analysed immunohistochemically by using streptavidin-labelled antibodies against CD42 or CD61 (ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Germany).

Stability analysis

Our experimental set-up is depicted in Fig. 1. A computer-controlled pump (2-E15A; Netzsch, Selb, Germany) generates a physiological flow velocity leading to high blood pressure values similar to those found in patients suffering from an acute ischaemic stroke. A buffer solution (Ringer solution; Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany), stored in a reservoir at a controlled temperature of 37°C and a pH of 7.4, circulates through a tube system (sheathed PVC, 6 mm I.D.). Varying the computer-controlled flow velocity and the resistance of the tube system using a modulating valve (Teflon 1/8"

FNPT: Aalborg, Orangeburg, New York, USA) leads to a defined adjustment of pressure and flow at the same time. The clots are placed within a custom-built carrier. Pressure sensors (REF I-99-IA-013, pvb: Critical Care GmbH, Kirchseon, Germany) located before and behind the clot carrier, and a custom-built flow sensor record data online. Because of its special shape, the pressure decline at the clot carrier is monotonically related to the haemodynamic resistance of the clot and, therefore, to its size. For each clot type the pressure decline of five clots was continuously recorded for hours and served as a measure for the haemodynamic stability of the clot. The used in-vitro model and measurement technique are published elsewhere [18].

Clot lysis

For each clot type, 10 clots were treated for 2 h at 37°C in a sterile plastic tube (REF 55.468.001; Sarstedt) in the presence of 1.5 ml citrated plasma (same blood group as used for clot formation) with rt-PA (Actilyse; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) dissolved in 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4). To achieve observable lysis rates the final concentration of rt-PA was chosen to be 60 kU/ml so that it was equal or higher as reported by other investigators [9,16,17,19]. In experiments by Holland *et al.* [5] concentrations beyond 30 kU/ml did not promote further degradation of the fibrin mesh and concomitant clot mass loss. Plasma was harvested from the supernatant of pooled human venous blood after centrifugation at 2570g for 10 min. Control samples ($n = 10$ for each clot type) were incubated with a mixture of 1.5 ml citrated plasma and 0.5 ml PBS (pH 7.4).

The different ways of treating the clots will be referred to as factor 'TREATMENT' in the statistical analysis.

Determination of lysis rates

Lysis rates are determined by the clot mass loss as it is performed by the majority of other investigators with an analytical balance (Kern 770; Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany). To avoid measurement errors caused by clot dehydration, each clot was weighed in Ringer's solution (Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany). The mass of the Ringer's solution, which had been previously measured, was subtracted from the overall mass. To prevent elutriation, the measurement was performed as quickly as possible. The duration of one single measurement never exceeded 20 s.

Calculations and statistics

Weighing was performed three times in triplicate (i.e. each clot was weighed nine times). x_i^t is defined as the clot mass at time $t=0, 60, 120$ min in measurements $i = 1, 2, 3$.

- (1) Before starting the lysis experiment at time $t=0$ variability of mass was determined between measurements 2 and 1, as well as between measurements 3 and 1:

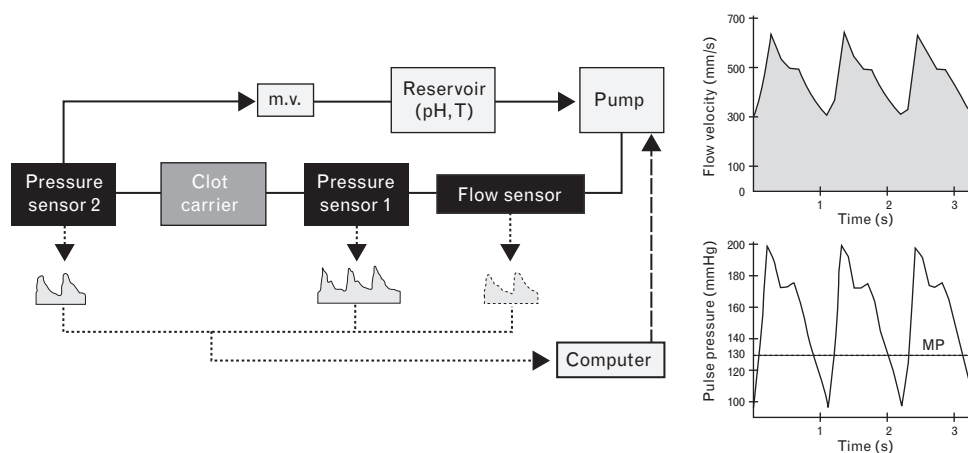
$$\Delta x_{j1}^0 = \left| \frac{x_j^0 - x_1^0}{x_1^0} \right| \text{ with } j = 2, 3. \quad (1)$$

The triply repeated measurements will be referred to as factor 'COURSE' in the statistical analysis.

- (2) The lysis rates were calculated using the clot mass loss measurements. The main value of one weighing performed in triplicate was determined by

$$x^t = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 x_i^t \text{ with } t = 0, 60, 120 \text{ minutes,} \quad (2)$$

Fig. 1



Model set-up and haemodynamic conditions used for the stability analysis. Concerning the model set-up detailed explanations are given in the text. m.v. = modulating valve. Solid arrows: direction of the streaming buffer solution. Dotted arrows: acquisition of data. On the right side the generated pulsatile flow velocity (above) and resulting pulse pressure wave proximal to the clot carrier (below), that are used to examine the stability of the clots, are depicted. MP = mean pressure.

before the relative clot mass loss was evaluated by

$$\Delta X^t = \frac{x^0 - x^t}{x^0} \text{ for } t = 60, 120 \text{ minutes.} \quad (3)$$

Because different values for the initial clot mass of the different clot types are expected we calculated variations as relative measures.

Data given in tables and figures are reported as mean \pm standard deviation of the mean. Analysis of variance (ANOVA) and post-hoc *t* tests were performed to determine the statistical significance between the different clot types with regards to their lysis rates in buffered plasma and in a solution of buffered plasma and rt-PA, as well as the reproducibility of their weighing at time $t=0$. All analyses and statistics were performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software (version 15.0.1).

Results

Platelet-rich plasma clots are made from PRP and boundary layer both prepared from human venous blood. The corresponding blood cell counts are listed in Table 1.

Histological examination

Ten samples for each clot type were evaluated and histologically compared with four fresh thrombi which were removed by neuroradiological emergency interventions from cerebral arteries of stroke patients. All PRP-clots (group A) appeared to be very similar and resembled the clots formed *in vivo* (Fig. 2). A strong fibrin mesh was found, containing intact erythrocytes, erythrocyte fragments, leucocytes, and other cellular and noncellular components arranged as a layered assembly. Neutrophil granulocytes were, to different extent, arranged in linear aggregates. In Ladewig stain the fibrin showed a metachromatic violet-blue colour. Thrombocytes, verified immunohistochemically, were arranged in a grid-shaped pattern with disseminated patchy aggregates.

Clots prepared by recalcification of citrated venous blood (method B) or by spontaneous clotting of nonanticoagulated venous blood (method C) were profoundly different

Table 1 Constituents of pooled venous blood and platelet-rich plasma clot solutions

	Venous blood (<i>n</i> = 4)	PRP + boundary layer (<i>n</i> = 10)
Leucocytes (/nl)	5.4 (0.3)	4.4 (0.6)
Erythrocytes ($10^{12}/l$)	4.2 (0.09)	0.3 (0.04)
Haemoglobin (g/l)	122.3 (2.1)	8.6 (1.7)
Hematocrit (%)	36.9 (0.3)	2.5 (0.4)
Platelets (/nl)	224.8 (22.7)	488.8 (42.3)

The blood cell count is depicted for the pooled human venous blood (VB) used to extract platelet-rich plasma (PRP) by centrifugation and for the solutions (consisting of PRP and boundary layer) used to generate PRP clots by a final recalcification and incubation. Mean values and standard deviations of mean (specified in brackets) are specified.

from the thrombi described before upon histological examination (Fig. 3). These clots consisted almost entirely of sedimented, mostly intact erythrocytes, varying in package density, and a very fine, sparse fibrin mesh, hardly visible in Ladewig stain. The dispersal of leucocytes resembled that of whole blood. Thrombocytes, easily visible in CD61 immunostain, were loosely disseminated or formed tiny aggregates. There was no obvious difference between clots prepared by methods B and C.

Stability analysis

For each clot type, the mechanical stabilities of five clots were measured under pulsatile flow conditions simulating the haemodynamic condition during acute stroke (Fig. 1). Only PRP clots (group A) were stable during the course of a 4-h measurement, whereas all other clots completely dissolved within seconds so that no data could be recorded. Clots from groups B and C yet dissolved at unphysiologically low and constant flow rates, with a proximal pressure of only 30 mmHg.

Variability of clot mass during the triplicate measurement at $t = 0$

Each clot was measured in triplicate to determine its mass at a particular time during the lysis experiment. Figure 4 shows the absolute values of clot mass and the variability of clot mass during the triplicate measurement at time $t=0$ for all clots of the control groups of clot types A–C (each $n=10$). The underlying data and analytical results are presented in Table 2.

An ANOVA with repeated measurement factor 'COURSE' and between measurement factor 'TYPE' revealed a significant main effect of COURSE [F(1,27) = 26.95, $P < 0.001$] but no interaction of COURSE and TYPE. There was a significant difference between TYPES [F(2,27) = 4.32, $P = 0.024$].

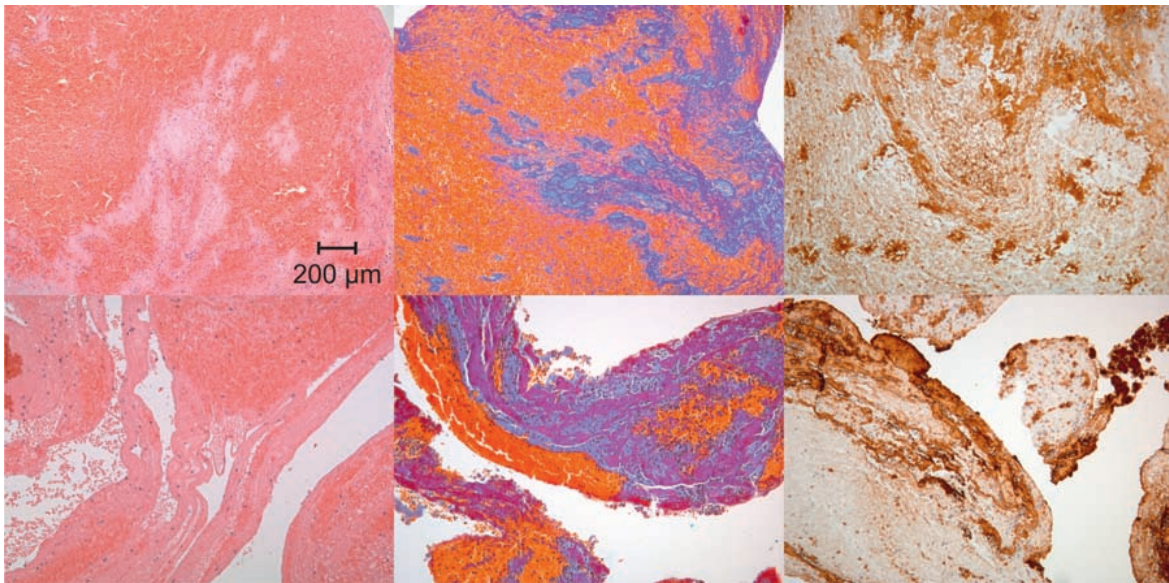
Post-hoc *t* tests showed a significant increase in variability of clot mass for clots of groups B and C but not for those of group A. Moreover they detected significant differences between PRP clots and clots of groups B and C but not between B and C clots in terms of their variability of mass. Variability was considerably higher in groups B and C compared with group A.

Clot lysis

Figure 5 shows the lysis rates for the different clot types A–C when treated with buffered plasma and rt-PA (60 kU/ml) or buffered plasma alone (for further data see Table 3). ANOVA revealed significant main effects of TREATMENT [F(1,54) = 44.23, $P < 0.001$] and TYPES [F(2,54) = 66.59, $P < 0.001$] as well as the interaction of these two factors [F(2,54) = 6.39, $P = 0.003$].

All lysis rates of the PRP clots (group A) were lower compared with those from groups B and C. Post-hoc

Fig. 2



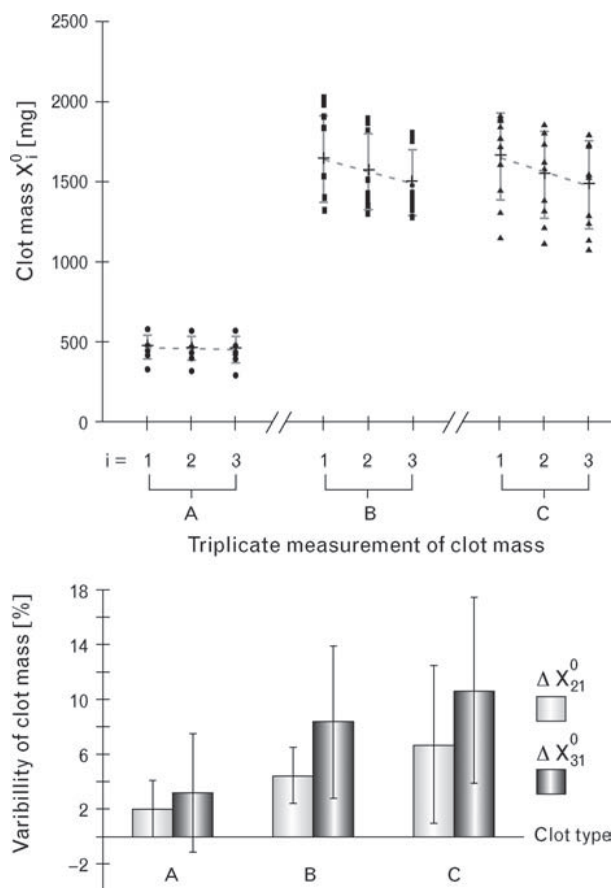
Histological evaluation of clots formed *in vivo* and *in vitro* by using platelet-rich plasma. Above: representative pictures of four different emboli removed from the basilar artery or the middle cerebral artery of stroke patients. Below: PRP clot (group A) generated of platelet-rich plasma. From left to right: staining with haematoxylin and eosin, Ladevig stain, and streptavidin-labelled antibodies against CD42. General magnification: $\times 100$. The *in-vivo* formed emboli and the PRP clot are characterized by a layered, coloured appearance with a strong fibrin mesh, intact erythrocytes, erythrocyte fragments, leucocytes, and other cellular and noncellular components. Additionally the fresh *in-vivo* thrombi showed focally initiated compact infiltration by neutrophil granulocytes.

Fig. 3



Histological evaluation of clots prepared by recalcification of citrated venous blood or by spontaneous clotting of nonanticoagulated venous blood. Above: clot of group B achieved by recalcification of venous blood (VB) drawn into citrate tubes. Below: spontaneously clotted VB of group C. From left to right: staining with haematoxylin and eosin, Ladevig stain, and streptavidin-labelled antibodies against CD61. General magnification: $\times 100$. Clots of group B and C consist almost entirely of sedimented red cells and a dispersal of leucocytes as it is found in whole blood.

Fig. 4



Variability of clot mass in the course of a triplicate measurement at $t=0$. All clots of the control groups A–C (each $n=10$) were weighed by a triplicate measurement at $t=0$. Figure above depicts the absolute values of clot mass x_i^0 for measurements i ($i=1, 2, 3$). Figure below shows the variabilities of clot mass Δx_{ij}^0 between measurements 1 and measurement j ($j=2, 3$). Values are depicted with their mean and standard deviation of mean. Clot types: (A) clots generated of platelet-rich plasma (PRP); (B) clots achieved by recalcification of venous blood (VB) drawn into citrate tubes; (C) spontaneously clotted VB.

t tests showed that additional treatment with rt-PA led to a significantly increased lysis rate only for clots from B [$T(18)=-4.60, P<0.001$] and C [$T(18)=-4.79, P<0.001$] groups. Only a slight increase of rt-PA treatment was measured for the PRP clots ($P=0.141$). A paired analytical comparison of the three clot types showed that group A differed significantly from groups B and C with regard to their thrombolytic behaviour.

Discussion

We introduce a novel clot formation protocol, which, unlike other protocols used so far, produces clots that closely resemble – in terms of histological appearance and behaviour under physiological flow conditions – arterial emboli formed *in vivo*.

Although experimental clots should ideally be generated from whole blood under physiological flow and shear conditions, obviously nonphysiological clot models are being used for in-vitro sonothrombolysis experiments. The Fahraeus-Lindquist effect results in a redistribution of the cellular components in flowing blood, leading to a high concentration of platelets and to a rather low number of erythrocytes incorporated into the fibrin network. Using PRP as starting material for the preparation of experimental clots (instead of whole blood) produces clots that resemble arterial thromboemboli in terms of structure and distribution of cellular and noncellular components, even without the element of flow during clot formation. The presence of a high concentration of platelets during clot formation results in a higher level of factor XIII (released from activated platelets), which in turn leads to a more complete fibrin cross-linking and the attachment of alpha-2-plasmin inhibitor and other proteins to the fibrin network.

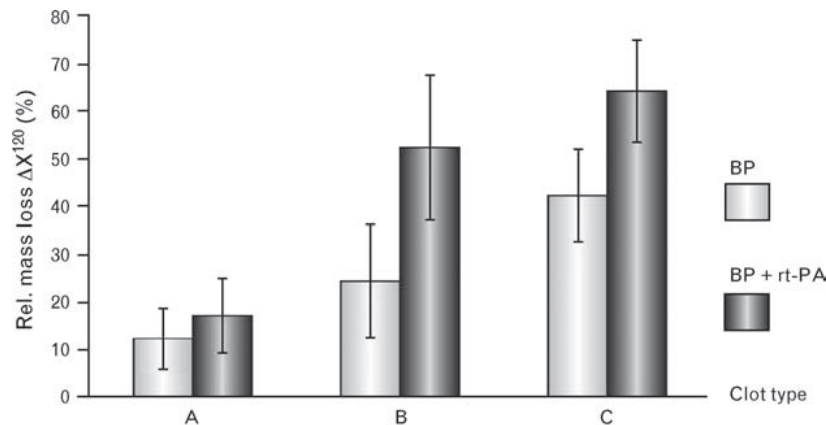
Histological examinations show high correspondence between fresh in-vivo thrombi and PRP clots. The only noteworthy difference is the focally initiated compact infiltration of fresh in-vivo thrombi by neutrophil granulocytes because of the unspecific immune response under physiological conditions. In contrast, fundamental

Table 2 Change of clot mass during measurements performed in triplicate of clot types A–C

	Clot type					
	A		B		C	
	Δx_{21}^0	Δx_{31}^0	Δx_{21}^0	Δx_{31}^0	Δx_{21}^0	Δx_{31}^0
Variability of clot mass (%) (each $n=10$)	2.1 (2.0)	3.6 (4.2)	4.4 (2.0)	8.3 (5.5)	6.7 (5.7)	10.6 (6.7)
Effect between Δx_{21}^0 and Δx_{31}^0 : p -/T(18)-value	0.198/1.390		0.018/2.887		<0.001/7.451	
	A/B		B/C		A/C	
Comparison of clot types A–C: p -/T(18)-value	0.019/2.581	0.044/2.162	0.26/1.162	0.415/0.834	0.029/2.377	0.012/2.8

At time $t=0$ the mass of all clots in the control groups was triply measured. Δx_{ij}^0 , variabilities of clot mass between measurements 1 and measurement j ($j=2, 3$). Apart from mean values, standard deviations of mean are specified in brackets. ANOVA and post-hoc t -tests were used to assess the difference between the variabilities Δx_{21}^0 and Δx_{31}^0 for one clot type and between the three different clot types. Clot types: (A) clots generated of platelet-rich plasma (PRP); (B) clots achieved by recalcification of venous blood (VB) drawn into citrate tubes; (C) spontaneously clotted VB.

Fig. 5



Lysis rates of different clot types A–C measured by relative mass loss. After a 2-h incubation at 37°C in a solution of buffered plasma (BP) with pH = 7.4 and rt-PA (final concentration: 60 kU/ml) or BP alone (each $n = 10$) the relative clot mass loss ΔX^{120} was determined. Clot types: (A) clots generated of platelet-rich plasma (PRP); (B) clots achieved by recalcification of venous blood (VB) drawn into citrate tubes; (C) spontaneously clotted VB. Values are depicted as mean \pm standard deviation of mean.

differences are found between PRP clots and clots of the indistinguishable groups B and C. The development of a strong fibrin mesh as it can be seen in clots of group A but not in those of groups B and C is of vital importance. Cross-linked fibrin ensures mechanical stability of the clot, thus permitting the investigator to expose the PRP clot to physiological flow conditions for several hours. Clots of groups B and C predominantly consist of red cells that are embedded in a very loose fibrin mesh, which can not resist the haemodynamic forces of physiological flows.

In our experiments, PRP clots exhibit lower lysis rates compared with clots of groups B and C (Fig. 5). Mizushige *et al.* [19] already reported in 1999 on low lysis rates for artificial white thrombi. In our opinion, these low lysis rates reflect not so much a limitation but rather a reality of clinical lysis treatments, which mostly lead to delayed, incomplete, or no lysis [20]. Furthermore we attribute the rather small effect of rt-PA for PRP clots to

inaccuracies of the measurement technique leading to high standard deviations, which statistically overlap the expected effect. An optimized lysis protocol might lead to a more pronounced effect of rt-PA. Investigations of the processes of clotting and lysis were not the focus of this work.

Significant effects of rt-PA are found for B and C clots, whereas no significant difference exists between these groups. Presumably, these increased mass losses are caused by the decomposition of fibrin fibres, leading to a mass disposal of sedimented red cells, that is the main constituent of these clots. In our opinion, spontaneous and mechanical decomposition plays a greater role than the effect of enzymatic lysis in B and C clots. This hypothesis is confirmed by the significantly increased variability found for B and C clots in the measurements performed in triplicate without rt-PA (Fig. 4). B clots and, especially, C clots are unstable and dissolve under repeated mechanical stress. PRP clots remain comparatively stable.

Table 3 Lysis rates of clot types A–C

	Clot type					
	A		B		C	
	BP	BP + rt-PA	BP	BP + rt-PA	BP	BP + rt-PA
x^0 (mg)	457.8 (75.4)	418.6 (211.5)	1568.1 (233.0)	1509.5 (245.0)	1563.5 (265.7)	1501.0 (446.5)
ΔX^{120} (%)	12.0 (6.3)	16.9 (7.7)	24.2 (11.9)	52.4 (15.3)	42.2 (9.8)	64.3 (10.9)
Relative increase in mass loss under rt-PA (%), p - $T(18)$ -value	41, 0.141/–1.54		116, <0.001/–4.60		52, <0.001/–4.79	
	A/B		B/C		A/C	
Comparison of clot types A–C: p - $T(18)$ -value	0.011/–2.85 <0.001/–6.56		0.002/–3.69 0.06/–2.00		<0.001/–8.19 <0.001/–11.24	

Treatments: BP and BP + rt-PA (each $n = 10$). x^0 , initial clot mass. ΔX^{120} , relative mass loss after a 2-h incubation at 37°C. Apart from mean values, standard deviations of mean are specified in brackets. ANOVA and post-hoc t -tests were used to calculate the statistical significance of the increased lysis rate under rt-PA for each group and to discover differences between the three clot types with regards to their thrombolytic behaviour under plasma with or without rt-PA. BP = buffered plasma (pH = 7.4). Clot types: (A) clots generated of platelet-rich plasma (PRP); (B) clots achieved by recalcification of venous blood (VB) drawn into citrate tubes; (C) spontaneously clotted VB.

These findings are strengthened by the results of the histological examinations and the stability checks under physiological flow conditions.

Finally, our data indicate that the clot mass loss is an inaccurate means of quantifying fibrinolytic activity. In most cases, the transfer of drops of fluid or the dehydration of clots during the weighing process leads to high standard deviations. In the course of the weighing process, the clots are transferred several times and are subjected to repeated mechanical forces. The more frequent the clot mass is measured the more clot mass decreases and variability increases as to be presumed from the trend shown in Figure 4. Under these circumstances, sufficient reproducibility is found only for PRP clots. Furthermore, the dynamic process of thrombolysis is altered by changes in temperature and other confounders during weighing.

In-vitro investigations of sonothrombolysis require a standardized clot formation protocol and a suitable lysis rate measurement technique. Otherwise, lysis rates of different treatment strategies cannot be compared, which is counterproductive to progress in research and therapy. Therefore we pursued three objectives in this study leading to the following conclusions:

- (1) A new protocol is introduced providing for a simple and economic clot preparation.
- (2) The methods we used to compare the different clot types are purposely simple. We focused not to understand the clotting or lysis processes in detail but showed, that PRP clots have a histological appearance that resembles in-vivo thrombi, are of firm and robust consistence, and resist a pulsatile flow within pressure limits found in stroke patients. In this regard PRP clots differ completely from clots used so far by the majority of investigators. B and C clots are not suitable for investigations under physiological flow conditions.
- (3) (a) Lysis rates of PRP clots are low.
(b) B and C clots are mechanically unstable.
(c) Weighing of clots involves an unacceptable degree of handling and is unsuitable to determine lysis rates, especially in experiments with B and C clots. Alternative methods that employ continuous and noncontact measurement techniques are needed for estimating the process of fibrinolysis [18].

No in-vitro clot formation protocol will ever reflect the natural process of in-vivo clotting in detail. The described PRP clot might be a valuable tool for optimizing the equipment and procedures used for in-vitro investigations of sonothrombolysis.

Acknowledgements

The authors thank the Department of Transfusion Medicine at the University Hospital of Schleswig-Holstein,

Campus Lübeck, Germany (PD Dr S. Görg), for allocating blood. Finally, we thank all blood donors for their attendance in support of our scientific efforts.

Conflict of interest: G.S. has previously received unrestricted educational grants from Boehringer Ingelheim, Solvay, and Sanofi-Aventis. G.S. has worked together with Bracco Imaging SpA and Philips Medical Systems on research projects funded by the European Union.

The authors had full access to the data and take responsibility for their integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written. There are no conflicts of interest.

Funding sources: The author is recipient of research funding from the Faculty of Medicine of the University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (E05-2008). The sponsor was not involved in the experimental design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

- 1 Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, *et al.* Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2004; **351**:2170–2178.
- 2 Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral main stem occlusion. *Stroke* 2008; **39**:1470–1475.
- 3 Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, *et al.* Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2006; **37**:425–429.
- 4 Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els Th, *et al.* Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia. *Stroke* 2005; **36**:1441–1446.
- 5 Holland ChK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ. Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res* 2008; **121**:663–673.
- 6 Tiukinhoy-Laing SD, Huang S, Klegerman M, Holland ChK, McPherson DD. Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res* 2007; **119**:777–784.
- 7 Nedelmann M, Brandt Ch, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, *et al.* Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 2005; **20**:18–22.
- 8 Devcic-Kuhar B, Pfaffenberger St, Gherardini L, Mayer Ch, Gröschl M, Kaun Ch, *et al.* Ultrasound affects distribution of plasminogen and tissue-type plasminogen activator in whole blood clots in vitro. *Thromb Haemost* 2004; **92**:980–985.
- 9 Pfaffenberger ST, Devcic-Kuhar B, Kollmann Ch, Kastl StP, Kaun Ch, Speidl WS, *et al.* Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke* 2005; **36**:124–128.
- 10 Rosenschein U, Furman V, Kerner E, Fabian I, Bernheim J. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis. *Circulation* 2000; **102**:238–245.
- 11 Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; **359**:938–949.
- 12 Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:812–817.
- 13 Prokop af, Soltani A, Roy RA. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated fibrinolysis. *Ultrasound Med Biol* 2007; **33**:924–933.
- 14 Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL, Dalecki D, Child S, Francis CW. Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound. *Circulation* 1998; **98**:1030–1035.

- 15 Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL, Carstensen EL. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *Blood* 1993; **81**:2636–2643.
- 16 Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation* 1992; **86**:1257–1264.
- 17 Behrens St, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici MG. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2001; **27**:1683–1689.
- 18 Roessler FC, Ohlrich M, Schmieger M, Weber PK, Seidel G. Influence of pressure and flow velocity on thrombolysis in-vitro. *Cerebrovasc Dis* 2009; **27 (Suppl 6)**:116.
- 19 Mizushige K, Kondo I, Ohmori K, Hirao K, Matsuo H. Enhancement of ultrasound-accelerated thrombolysis by echo contrast agents: dependence on microbubble structure. *Ultrasound Med Biol* 1999; **25**:1431–1437.
- 20 Wunderlich MT, Goertler M, Postert T, Schmitt E, Seidel G, Gahn G, *et al.* Recanalization after intravenous thrombolysis. Does a recanalization time window exist? *Neurology* 2007; **68**:1364–1368.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

Basic Neuroscience

Development of a new clot formation protocol for standardized in vitro investigations of sonothrombolysis[☆]Florian C. Roessler^{a,*}, Andrea Teichert^b, Marcus Ohlrich^b, Jan H. Marxsen^c, Florian Stellmacher^d, Christian Tanislav^a, Günter Seidel^e^a Department of Neurology, University Hospital Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany^b Department of Neurology University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany^c Oncology Practice Am Marien-Krankenhaus, Parade 5, 23552 Lübeck, Germany^d Research Centre Borstel, Clinical and Experimental Pathology, Parkallee 3a, 23845 Borstel, Germany^e Asklepios Klinik Nord, Tangstedter Landstraße 400, 22417 Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2014

Received in revised form 15 July 2014

Accepted 25 August 2014

Available online 3 September 2014

Keywords:

Clot formation protocol

Sonothrombolysis

Physiological flow

Histological examination

In vitro model

ABSTRACT

Background: Agreement about the most suitable clot formation protocol for sonothrombolysis investigations is lacking. Lysis rates vary strongly owing to different test conditions and, thus, cannot be compared. We aim to establish a simple but physiologically grounded protocol for in vitro coagulation to enable standardized sonothrombolysis investigations.

Method: Clots were generated from platelet-rich plasma (PRP) obtained by centrifugation (10 min, 180 × g) of human venous blood (VB). PRP was mixed with the boundary layer formed between the supernatant and the erythrocyte layer. To achieve clots with different platelet counts, PRP was gradually substituted with platelet-free plasma (PFP), harvested from the supernatant of VB after centrifugation (10 min, 2570 × g). Clot types were examined for histological appearance, hydrodynamic resistance under physiological flows, and lysis rate measured by weight loss after a 2-h treatment with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) (60 kU/ml). Lysis rates of the most suitable clot were measured after a 1-h treatment with rt-PA (60 kU/ml), and combined treatment with rt-PA and 2-MHz transcranial color-coded sonography (TCCS) (0.179 W/cm²) or 2-MHz transcranial Doppler (TCD) (0.457 W/cm²).

Results: With increased platelet count, the hydrodynamic resistance of the artificial clots increased, their histological appearance became more physiological, and lysis rates decreased. The most suitable clots consisted of 1.5-ml PRP, 2.0-ml PFP, and 0.5-ml boundary layer. Their lysis rates were 36.7 ± 7.8% (rt-PA), 40.8 ± 8.6% (rt-PA + TCCS), and 40.4 ± 8.3% (rt-PA + TCD).

Comparison with existing methods: These systemic investigations were conducted for the first time.

Conclusion: This protocol should be used for standardized sonothrombolysis investigations.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CBC, complete blood cell count; HCT, hematocrit; HE, hematoxylin–eosin; HGB, hemoglobin; PFP, platelet-free plasma; PLT, platelet; PRP, platelet-rich plasma; RBC, red blood cell; rt-PA, recombinant tissue plasminogen activator; SC, spontaneously clotted whole blood; sICH, symptomatic intracerebral hemorrhage; SPSS, Statistical Product and Service Solutions; TCCS, transcranial color-coded sonography; TCD, transcranial Doppler; US, ultrasound; VB, human venous blood; WBC, white blood cell.

[☆] All experiments were carried out while F. Roessler was employed by the Klinik für Neurologie, Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany.

* Corresponding author. Tel.: +49 0641 985 56814; fax: +49 0641 985 45309.
E-mail address: florian.roessler@neuro.med.uni-giessen.de (F.C. Roessler).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.025>

0165-0270/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Local transcranial application of diagnostic ultrasound (US) seems to be a promising tool for accelerating vessel recanalization in patients suffering from an acute ischemic stroke. This therapeutic approach, called sonothrombolysis, seems to have positive effects with (Alexandrov et al., 2004, 2000; Eggers et al., 2008) or even without (Cintas et al., 2002; Eggers et al., 2005; Nedelmann et al., 2005) additional systemic recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) treatment. Owing to its local application, US does not have any systemic adverse reactions; it can also be applied as monotherapy in patients with contraindications for rt-PA. The only stipulation is that the occluded vessel has to be depicted by diagnostic US examinations, and US parameters should be adjusted in the range of diagnostic settings to avoid symptomatic intracerebral

Table 1

Blood cell counts of donor blood samples and different mixtures used for clot preparation (each $n=5$): Values are listed for white blood cells (WBCs), red blood cells (RBCs), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), and platelets (PLTs). Accuracies of the used automated hematology analyzer are indicated in the first column. Values are noted as mean \pm standard deviation.

	Blood from donor	PRP/PFP mixtures for clot preparation						Normal value	Unit
		3.5/0.0	3.0/0.5	2.5/1.0	2.0/1.5	1.5/2.0	1.0/2.5		
WBC \pm 0.2	5.6 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	4–9	10 ⁹ /l
RBC \pm 0.03	4.17 \pm 0.08	0.59 \pm 0.09	0.67 \pm 0.09	0.7 \pm 0.1	0.68 \pm 0.08	0.67 \pm 0.05	0.71 \pm 0.03	4–5	10 ¹² /l
HGB	122.2 \pm 1.8	17.2 \pm 3.4	20.0 \pm 2.1	21.6 \pm 2.3	21.0 \pm 2.0	19.2 \pm 1.1	20.4 \pm 0.9	120–180	g/l
HCT	37.1 \pm 0.5	4.9 \pm 0.8	5.8 \pm 0.6	6.0 \pm 0.6	5.8 \pm 0.5	5.6 \pm 0.4	6.1 \pm 0.2	38–54	%
PLT \pm 10	213 \pm 31	489 \pm 42	373 \pm 24	310 \pm 15	257 \pm 25	167 \pm 10	121 \pm 6	150–400	10 ⁹ /l

hemorrhage (sICH) (Alexandrov et al., 2000; Daffertshofer et al., 2005). Using diagnostic US, researchers have found no significant increase of sICH in patients treated with a combination of US and rt-PA (Ricci et al., 2012).

The crucial underlying mechanisms of sonothrombolysis are assumed to be acoustic streaming, radiation force, and cavitation. They promote drug transport into the clot, thus increasing its interaction with fibrin fibers. Furthermore, microjets and microstreaming caused by cavitation lead to a reversible disaggregation of fibrin structures and, therefore, to an increased exposure of additional fibrin-binding sites for rt-PA and its deeper penetration into the clot with an increased flow through the fibrin network (Alexandrov et al., 2000; Braaten et al., 1997; Siddiqi et al., 1995; Spengos et al., 2000). For further specific investigations of these mechanisms, in vitro models are used because they minimize harm to patients, facilitate fast and accurate adjustments of experimental parameters, and save time and money. Although all these models rely on an in vitro clot, no agreement exists about a standardized clot formation protocol. Protocols found in the literature are astonishingly heterogeneous. Lysis rates vary considerably and do not produce comparable results, probably owing to different physical and chemical conditions of the clots.

We have previously suggested a method for processing a clot prepared from platelet-rich plasma (PRP) to permit standardized sonothrombolysis investigations (Roessler et al., 2011a). Thereby, we tried to consider major aspects of the clotting process, particularly the substantial role of platelets. Apart from the presence of plasma and the required components of the coagulation cascade, they play a key role in all steps of the clotting process. Owing to the Fahraeus–Lindqvist effect, a highly concentrated platelet stream circulates near the endothelium. As soon as an endothelial injury occurs, platelets start to adhere by interacting with uncovered subendothelial proteins and cause hemostasis. During this process, platelets become activated and release or expose different materials, which amplify further adhesion and activation. Furthermore, activated platelets discharge various factors of the coagulation cascade, such as calcium, fibrinogen or thrombin, and hormones, leading to vasoconstriction. Clotting is finished by retraction caused by contractile proteins stored within the platelets. Cross-linking of fibrin and activated platelets ensures the solidity of clots.

Therefore, we use PRP to form physiological clots. However, clots that predominantly consist of PRP have such low lysis rates that they are not suitable for sonothrombolysis investigations (Roessler et al., 2011a).

The aim of this work is to find a PRP clot that fulfills the following three criteria: (1) sufficient histological similarity with in vivo clots, (2) adequate stability under physiological flow conditions, and (3) suitable lysis rates.

2. Methods

2.1. Clot preparation

Blood sampling was approved by the Ethics Committee of the University of Lübeck and conducted by the local Department of

Transfusion Medicine, within the blood donation program. All donors signed informed consent.

Human venous blood (VB) was drawn into citrate tubes (S-Monovette®: REF 02.1067.001; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) from different healthy donors who were not taking anticoagulants or antithrombotic medications in the preceding 2 weeks. Blood of the same blood group was pooled to avoid individual differences concerning the blood consistency and its quality of clotting.

After centrifugation at 180 \times g for 10 min (Multifuge® 1S-R; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany), PRP was removed by aspiration of the supernatant and mixed with the boundary layer, which had formed between the supernatant and the erythrocyte layer, and with platelet-free plasma (PFP). PFP was prepared by aspiration of the supernatant after centrifugation at 2570 \times g for 10 min (EBA 8s; Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany). The total volume of the used mixture for each clot type was 4.0 ml, with a constant volume of 0.5 ml for the boundary layer. Six different clot types with different platelet counts were made by gradual substitution of PRP with PFP (Table 1). The complete blood cell count (CBC) was determined with an automated hematology analyzer (KX-21; Sysmex Corporation, Kobe, Japan) for each PRP/PFP ratio and for the pooled VB from whom the mixtures were achieved.

Clot formation was initiated by adding CaCl₂, to a final concentration of 13.8 mmol/l, and incubating at 37 °C for 1 h in plastic tubes (REF 55.468.001, Sarstedt). The cylindrical clots were then stored in plastic tubes with a blood substitute (Ringer's solution; Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany) at 37 °C overnight to ensure complete clot retraction and to avoid an increasing autolytic dissolution that had been observed for clots placed in plasma.

2.2. Histological examination

For each clot type, 10 clots were fixed in 4% formaldehyde for 24 h. The clots were then embedded in paraffin and evaluated by an experienced pathologist using hematoxylin–eosin (HE) and Ladewig stain and CD61 immunostain. All examinations were performed with an Axioskop 40 with Plan Neofluar objectives and a bright field condenser (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg, Germany). The histological appearance was compared with those of emboli, which had been removed interventionally from the middle cerebral artery of patients with acute arterial thromboembolic occlusions. These interventional procedures followed an insufficient systemic rt-PA (Actilyse®) treatment (0.9 mg/kg body weight).

2.3. Stability analysis

For each clot type, the resistance of three clots was measured in vitro under physiological pulsatile flow conditions leading to high blood pressure values similar to those found in patients suffering from an acute ischemic stroke. We used a computer-controlled pump to generate pulsatile flow velocities and pulse pressure waves (Fig. 1) in a tube system. The clots were placed in a custom-built clot carrier within the tube system. The decrease in pressure

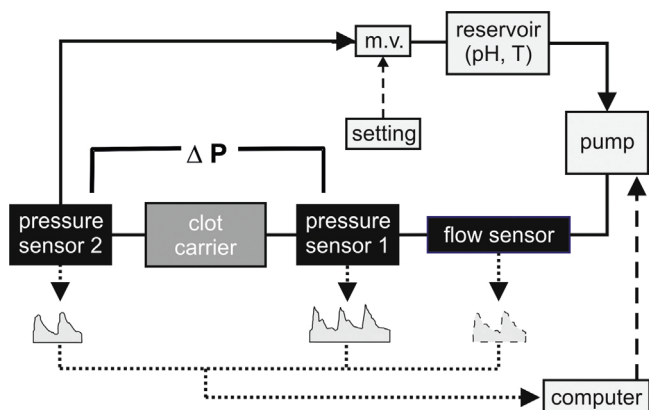


Fig. 1. Setup of the dynamic model: Solid arrows: Direction of the streaming blood substitute. Dashed arrows: Options to modify the hemodynamic conditions. Dotted arrows: Acquisition of data. m.v.: modulating valve. ΔP : pressure difference that results from the hemodynamic resistance of the clot.

in the clot-filled carrier was continuously recorded for 4 h, and served as a measure for the hemodynamic resistance of the clot. The *in vitro* model and measurement technique used in the present study were described in a previous publication (Roessler et al., 2011b).

2.4. Static model

A static model was created (Fig. 2). Clots were stored in Eppendorf™ microtubes (REF 72.690.001; Sarstedt) that had been fixed in a custom-built holder located in a tank filled with degassed water, which was maintained constantly at 37 °C using a temperature-controlled heater. A pump was used to circulate the water so as to prevent heat accumulation. Diagnostic 2-MHz pulsed wave US devices were installed at two separate places in the model where they became effective independently of one another: One performed US in a transcranial color-coded sonography (TCCS) mode, with an intensity of 0.179 W/cm² (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Palo Alto, USA); the other generated US in a transcranial Doppler (TCD) mode, with an intensity of 0.457 W/cm² (Multi Dop T2; DWL Compumedics, Singen, Germany). The US probe was immersed in the water bath, with a 50-mm distance to the clots. The remaining clots were separated by baffles to ensure that lysis was unaffected by US.

2.5. Lysis measurements

The lysis rate was determined by measuring the clot mass loss with an analytical balance (Kern 770; Kern & Sohn GmbH, Balingen,

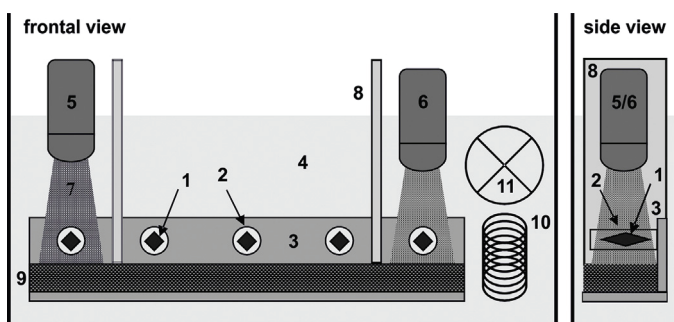


Fig. 2. Setup of the static model: Clots (1) are placed in microtubes (2) that are fixed in a custom-built holder (3). Degassed water (4), independently working ultrasound devices (5 = TCCS, 6 = TCD), applied ultrasound (7), baffles (8), ultrasound absorber (9), temperature-controlled heater (10), and circulation pump (11).

Germany). To avoid measurement errors caused by clot dehydration, each clot was weighed in Ringer's solution. The mass of the Ringer's solution, which had been previously measured, was subtracted from the overall mass. To prevent elutriation, the measurement was performed as quickly as possible.

The lysis rates of clots with different PRP/PFP ratios were measured after incubating the clots in a solution of plasma (pH 7.4) and rt-PA with a final concentration of 60 kU/ml at 37 °C for 2 h. To assess the effect of rt-PA, we also measured the relative weight loss after incubating the clots solely in plasma for 2 h. For each setting, 10 clots for the different clot types were investigated. These measurements were used as an assessment criterion for choosing a clot formation protocol that leads to suitable lysis rates.

Finally, the relative weight loss values of the clots made from the chosen clot formation protocol were determined after incubating them solely in plasma and after a 1-h treatment with rt-PA (60 kU/ml) and after a combined treatment with rt-PA and 2-MHz TCCS (0.179 W/cm²) or with rt-PA and 2-MHz TCD (0.457 W/cm²), each *n* = 20.

2.6. Calculations and statistics

Data in the tables and figures are reported as mean \pm standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) and post hoc *t* tests were performed to determine the statistical significance between the factors CLOTTYPE (clots with different PRP/PFP ratios) and TREATMENT (spontaneous lysis or rt-PA-induced lysis) concerning the weight loss of clots. After the most suitable clot formation protocol was chosen, ANOVA and post hoc *t* tests were performed to investigate the effect of the factor LYSISSTRATEGY (1-h spontaneous lysis, rt-PA lysis, or combined treatment with rt-PA and TCCS or with rt-PA and TCD) on the weight loss of clots generated by the chosen clot formation protocol. All analyses and statistics were performed using statistical software (Statistical Product and Service Solutions [SPSS] version 21.0.1; IBM, New York, USA).

3. Results

3.1. Clot preparation

The determined CBCs for all clot preparation mixtures are displayed in Table 1. The concentration of red blood cells (RBCs) and, accordingly, hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) remained stable. The platelet (PLT) concentration decreased considerably with increasing portions of PFP. The decrease in concentration was much less pronounced in white blood cells (WBCs) and was of the same order of magnitude as the accuracy of the hematology analyzer used. For all blood cells, the concentrations varied about the same extent as for the original whole blood samples and with equal accuracy to the hematology analyzer. Overall, the portions of solid blood components were redistributed in favor of the platelets.

3.2. Histological examination

In Fig. 3, selected histological specimens are shown for different clot types. *In vivo* clots are characterized by solid fibrin meshes (possessing a layered colored appearance with captured proteins) and older fragments of RBCs as well as fresh RBCs and many platelets. By contrast, spontaneously clotted clots consisted only of sedimented RBCs. Clots consisting of only PRP looked very similar to the *in vivo* clots. However, with increasing portions of PFP, the histological appearance deteriorated.

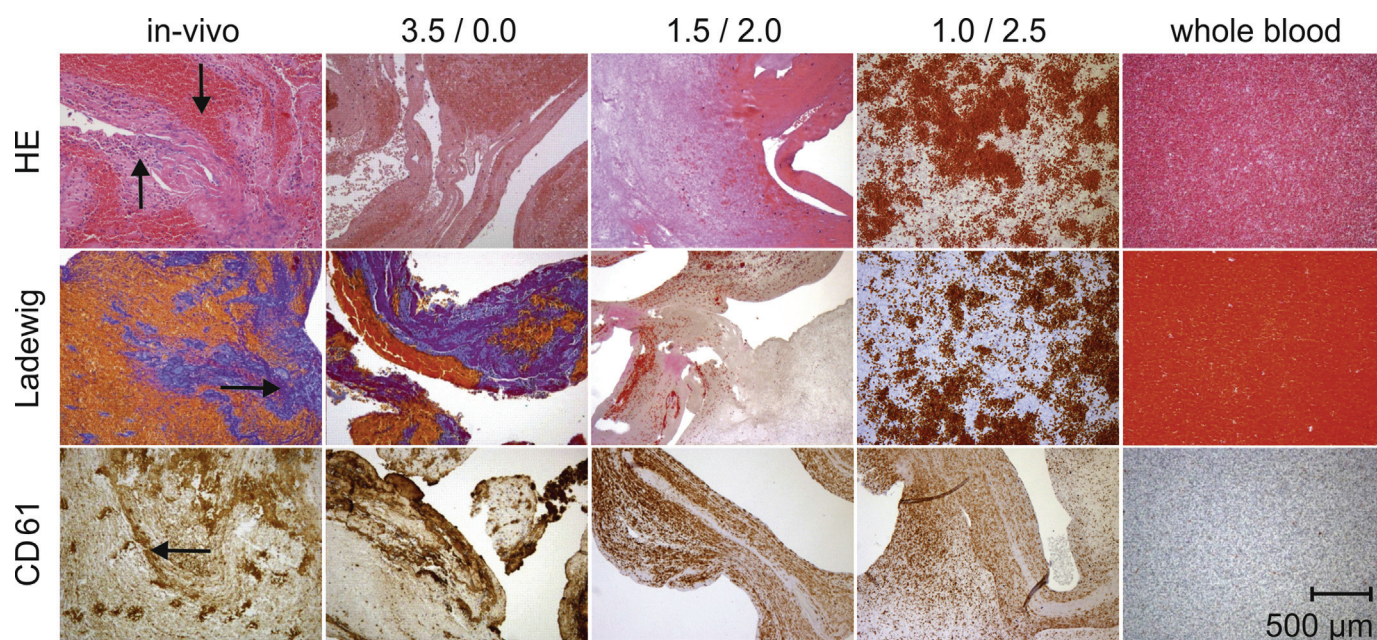


Fig. 3. Histological evaluation: Histological specimens (100× optical magnification) with hematoxylin–eosin (HE) and Ladewig stain and with CD61 immunostaining for different clot types. From left to right: In vivo clot removed from the middle cerebral artery after insufficient systemic thrombolysis with rt-PA, in vitro clots made from different mixing ratios of platelet-rich and platelet-free plasma (PRP/PFP), spontaneously clotted whole blood. → fibrin-mesh, ↑ fibrin-mesh with captured proteins and leucocytes and fragments of RBCs, ← CD61-labeled platelets, ↓ sedimented RBCs.

3.3. Stability analysis

We used a pulsatile flow model that allows continuous, contact-free measurements of the hemodynamic resistance of clots. The different clots were analyzed for their stability under physiological flow conditions. In Fig. 4, measured hemodynamic resistance is plotted for the duration of the experiment. An unchanged hemodynamic resistance is expressed by a value of 1. The smaller the value, the more the hemodynamic resistance decreases, and the more the clot dissolves. In contrast to PRP clots, spontaneously clotted clots dissolve quickly.

3.4. Measurements of rt-PA lysis for clots with varying PRP/PFP ratios

Fig. 5 shows the weight loss values of clots produced by mixtures with varying PRP/PFP ratios after 2-h treatment with rt-PA or 2-h spontaneous lysis (values are displayed in Table 2); US was not applied. Lysis rates increased with decreasing portions of PRP. Two-way factorial ANOVA reveals significant main effects of the factors CLOTTYPE [$F(5,108) = 36.9, p < 0.001$] and TREATMENT [$F(1,108) = 76.7, p < 0.001$] and an interaction between both factors [$F(5,108) = 7.3, p < 0.001$]. Concerning weight loss, post hoc *t* tests

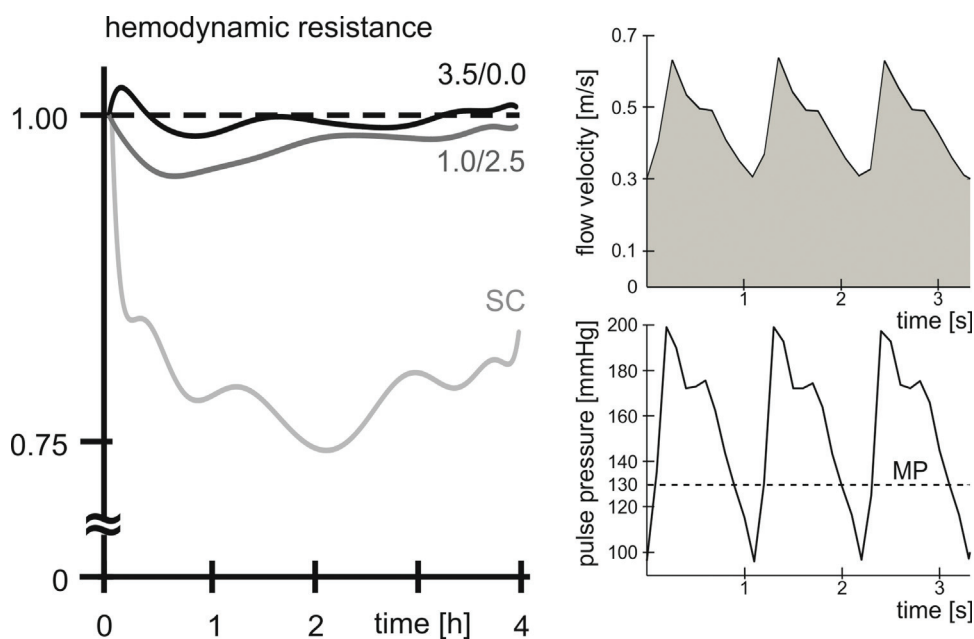


Fig. 4. Stability testing: Hemodynamic resistance was measured continuously for different clot types (each $n = 3$). Results are shown for clots with PRP-PFP ratios of 3.5/0.0 and of 1.0/2.5 and for spontaneously clotted whole blood (SC). Adjusted pulsatile flow velocities and pulse pressure waves are depicted on the right side. MP: mean pressure.

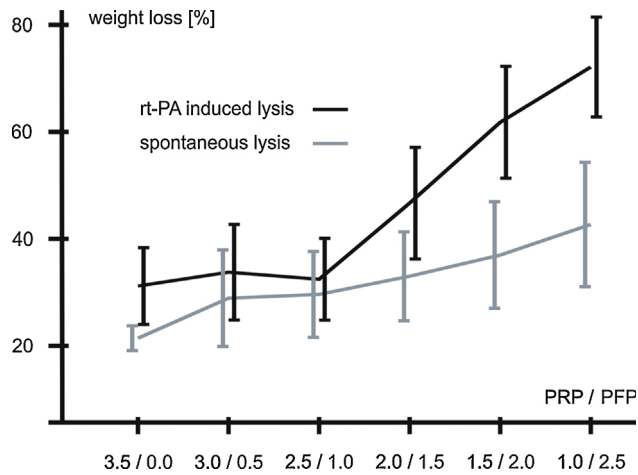


Fig. 5. Lysis rates of clots with different PRP/PFP ratios: Lysis rates measured by weight loss for a 2-h spontaneous lysis (clots that were simply stored in plasma with pH 7.4 and at 37 °C; gray line) and for lysis under the same conditions but with rt-PA added to a final concentration of 60 kU/ml (black line). Ultrasound was not applied. Values are depicted as mean ± standard deviation. Each n = 10. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

show significantly increased mean values of rt-PA-induced lysis versus spontaneous lysis for PRP/PFP ratios smaller than 2.0/1.5 and for a ratio of 3.5/0.0, respectively (Table 2).

3.5. Impact of different lysis treatments on weight loss of 1.5/2.0 clots

Based on the assessment criteria (i.e. sufficient histological similarity with in vivo clots, adequate stability under physiological flows, and suitable lysis rates), one clot formation protocol was chosen (Fig. 6). Fig. 7 depicts the relative weight loss measured after 1 h for clots generated by the chosen clot formation protocol after spontaneous lysis in plasma (A), after treatment with rt-PA (B), or after combined therapy of rt-PA and different modes of US (C: TCCS, D: TCD).

Table 3 gives an overview of the underlying data. Univariate ANOVA reveals a significant main effect of the factor LYSIS-STRATEGY concerning weight loss of the chosen 1.5/2.0 clot [$F(3,76) = 32.4, p < 0.001$]. Post hoc *t* tests show significant differences between the mean value of weight loss for group A and all other lysis treatments (groups B–D). The mean values of weight loss for groups B, C, and D do not differ significantly (*p* always > 0.16).

4. Discussion

The CBC values in Table 1 show that redistribution of blood cells with an enrichment of platelets was achieved with the clot formation protocol introduced here. The inaccuracy of the procedure

Table 2
Weight loss after 2-h spontaneous lysis of clots with different PRP/PFP ratios (each n = 10): Below the PRP/PFP ratio, the left side shows the weight loss after 2-h spontaneous lysis, and the right side presents the weight loss after 2-h rt-PA treatment (60 kU/ml). Below, the result of the post hoc *t* test concerning a significant difference between spontaneous and rt-PA-induced lysis is shown. Ultrasound was not applied. Values are noted as mean ± standard deviation. Values of the later chosen 1.5/2.0 clot are highlighted.

Weight loss of clots with different PRP/PFP ratios, %					
3.5/0.0		3.0/0.5		2.5/1.0	
21.4 ± 2.3	31.2 ± 7.2	28.9 ± 9.0	33.8 ± 8.9	29.6 ± 8.0	32.4 ± 7.6
T[18] = 4.09, p = 0.001		T[18] = 1.21, p = 0.24		T[18] = 0.81, p = 0.43	
2.0/1.5		1.5/2.0		1.0/2.5	
33.0 ± 8.3	46.7 ± 10.4	37.0 ± 10.0	61.8 ± 10.5	42.7 ± 11.6	72.1 ± 9.3
T[18] = 0.22, p = 0.005		T[18] = 5.46, p < 0.001		T[18] = 6.25, p < 0.001	

PRP / PFP	3.5 / 0.0	3.0 / 0.5	2.5 / 1.0	2.0 / 1.5	1.5 / 2.0	1.0 / 2.5
stability	+	+	+	+	+	0
histology	+	+	+	0	0	-
lysis rate	-	-	-	0	+	+

Fig. 6. Overview of assessment criteria: Qualitative assessment of the different criteria is conducted with “good” (+), “sufficient” (0), and “bad” (-). All clot types showed good or sufficient stability under physiological flows. Only clots with a higher portion of PRP showed a good histological resemblance to in vivo clots. Useful lysis rates were achieved only for clots with a moderate portion of PRP. Considering all results, we chose a clot with a PRP/PFP ratio of 1.5/2.0.

used here is just as small as the inaccuracy of the used hematology analyzer. This leads to a good reproducibility of clots. Hence, the Fahraeus–Lindqvist effect of streaming blood can be simulated despite the use of a static model. This effect leads to high platelet concentrations near the endothelium, where the clotting process usually starts. Owing to a constant volume of 0.5 ml of the boundary layer, the concentrations of RBCs, HGB, and HCT remained nearly constant within the different mixtures of varying PRP/PFP ratios. For WBCs, the deviation was within

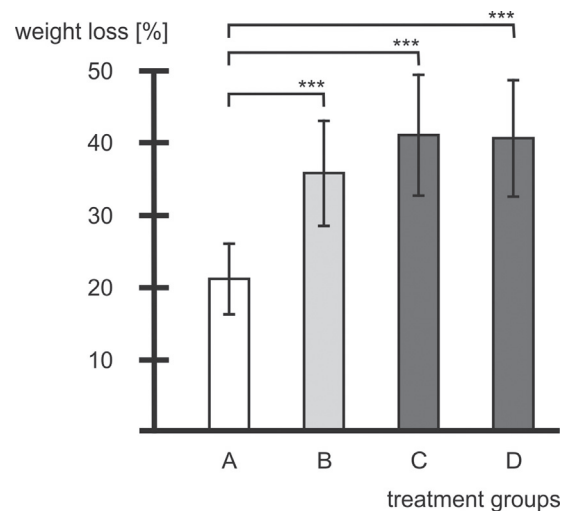


Fig. 7. Lysis rates of the chosen clot (PRP/PFP ratio: 1.5/2.0): Based on the weight loss measurements, the lysis rates were determined for different 1-h treatments. A: Spontaneous lysis. Clots were stored in plasma with pH 7.4 and at 37 °C. B: Same conditions as A with rt-PA added to a final concentration of 60 kU/ml. C: Same conditions as B with additional application of 2-MHz TCCS (0.179 W/cm²). D: Same conditions as B with additional application of 2-MHz TCD (0.457 W/cm²). Values are depicted as mean ± standard deviation. *** *p* < 0.001. Each n = 20.

Table 3

Weight loss values of the chosen 1.5/2.0 clots for different 1-h treatments (each $n=20$): A: Spontaneous lysis (plasma with pH 7.4 and 37 °C). B: Same conditions as A with rt-PA added to a final concentration of 60 kU/ml. C: Same conditions as B with additional application of 2-MHz TCCS (0.179 W/cm²). D: Same conditions as B with additional application of 2-MHz TCD (0.457 W/cm²). Values are depicted as mean \pm standard deviation. Below, the results of post hoc *t* tests for significant differences between the different lysis protocols are shown.

	Weight loss of 1.5/2.0 clots for different lysis treatments			
	A	B	C	D
Mean \pm SD, %	20.9 \pm 3.8	36.7 \pm 7.8	40.8 \pm 8.6	40.4 \pm 8.3
Difference of mean				
A		$T[38]=8.16$	$T[38]=9.49$	$T[38]=9.57$
B		$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
C			n.s.	n.s.

the limits of measuring accuracy. Unfortunately, no reference values exist for the blood composition of individual layers of in vivo streaming blood. Therefore, these results cannot be analyzed quantitatively.

Only clots with higher portions of PRP had a good histological appearance compared with in vivo formed clots extracted from intracranial arteries. In Fig. 3 (from left to right), the contents of fibrin (stained with Ladewig) and platelets (labeled with CD61) decrease constantly. Semiquantitative analysis of the histological appearance indicates good correlation for clots with a PRP/PFP ratio greater than or equal to 2.5/1.0. Sufficient correlation was found for ratios down to 1.5/2.0. For ratios of 1.0/2.5 or below, the histological appearance deteriorated. It is important to note that the available in vivo clots had to be extracted from intracranial arteries because they resisted previous systemic rt-PA treatment. Presumably, these clots are more resistant than the majority of intracranial clots in vivo.

Clots that cause ischemic strokes should be stable under physiological flows. We found that all tested PRP clots remained sufficiently stable.

The lysis measurements for the different clot types pointed to an interaction of CLOTTYPE \times TREATMENT. This means that dissolution and scale of difference between rt-PA-induced lysis and spontaneous lysis in the absence of US is affected by the PRP/PFP ratio of clots. The smaller the amount of PRP, the softer and more unstable the clot is, and the more the lysis rate increases. Useful lysis rates that differ significantly from spontaneous clot dissolution were found for clots with a PRP/PFP ratio below 2.0/1.5 (p always < 0.005). Apart from this, no further quantitative evaluation of these results can be performed because the accurate lysis rate expected for an in vivo clot undergoing treatment with rt-PA is not known. A significant difference between rt-PA-induced and spontaneous lysis also existed for 3.5/0.0 clots because the standard deviation was small for the measured spontaneous weight loss. Presumably, this small standard deviation value might be caused by a decrease in measuring errors, which usually arise from damages to unstable clots during the weighing process. However, the lysis rate was too small for this clot type (Roessler et al., 2011a).

Taking into consideration all the defined assessment criteria, we chose a PRP clot consisting of 1.5-ml PRP, 2.0-ml PFP, and a 0.5-ml boundary layer. Hence, clots can be manufactured with not only a sufficient lysis rate but also a sufficient histological appearance. It is important to keep in mind that none of the criteria have any quantitative point of reference.

The weight loss of the chosen 1.5/2.0 clots increased significantly after a 1-hour treatment with rt-PA or after a combined treatment of rt-PA and different US modes compared with spontaneous lysis in buffered plasma. An additional application of US (TCCS or TCD) tended to enforce the weight loss induced by a single treatment with rt-PA, but no statistical significance was detected in our static model. This could be a consequence of low US energy inside the tubes owing to less than optimal US conditions. The clot

formation protocol introduced here provides a reference clot for comparable investigations in this field.

Another reason for the slight increase of weight loss under the additional application of US might be the presence of small air bubbles that rarely cumulate at the upper rim of EppendorfTM microtubes. Ultrasound reflections caused by air bubbles can be avoided in the future by using the aforementioned pulsatile flow model.

Finally, lower lysis rates can be explained by the fact that the clot formation protocol introduced here is adapted to the only clots that are available for histological investigations. These clots are gained by thrombectomy. Because thrombectomy is usually performed after bridging therapy with rt-PA, the extracted clots are a selection of more resistant clots. This is not a drawback for further investigations in sonothrombolysis. On the contrary, the aim of further investigations is to find ways to improve sonothrombolysis so that sufficient treatment of such resistant clots becomes feasible.

Our data are in agreement with the findings of other studies. Eggers et al. (2009) have already showed that rt-PA treatment results in reduced dissolution with PRP clots compared with clots consisting of spontaneously clotted venous blood; this reduced dissolution is presumably caused by the higher number of platelets and stronger fibrin mesh present in PRP clots. Furthermore, Eggers et al. (2009) found only small additional effects of US in combination with rt-PA for PRP clots. However, the PRP clots used by Eggers et al. are not made in the same way as our PRP clots. Therefore, comparability is limited. Comparable investigations of sonothrombolysis require a standardized clot formation protocol.

We conclude that the clot formation protocol introduced here generates clots (consisting of 1.5-ml PRP, 2.0-ml PFP, and 0.5-ml boundary layer) that exhibit sufficient histological similarity with in vivo clots extracted from intracranial arteries by thrombectomy, that remain stable under physiological flows ensuring manifest strokes, and that provide sufficient lysis rates for lysis experiments with rt-PA, with or without the additional application of different US modes (TCCS or TCD), which differ significantly from spontaneous lysis. Keeping in mind that no in vitro clot formation protocol will ever reflect the diverse natural processes of in vivo clotting in detail, we advise using this simple, reproducible, and physiologically justified clot formation protocol for future standardized and comparable experiments of sonothrombolysis and for an optimization of its parameters.

Authors contributions

F. Roessler organized the laboratory, conceived the experimental design, developed all models, analyzed and interpreted the data, and wrote the article. A. Teichert carried out most of the experiments and assisted Roessler in analyzing the data. M. Ohlrich assisted Teichert in performing the experiments. J. Marxsen assisted in all issues of coagulation and thrombolysis. F. Stellmacher

conducted all histological examinations. Ch. Tanislav critically revised the article and provided statistical assistance. G. Seidel conceived the study design and judiciously revised the article.

Conflict of interest

The authors had full access to the data and take responsibility for their integrity. All authors have read and agreed to the manuscript as written. There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Andreas Sprenger for his support in statistical matters. The authors thank the Department of Transfusion Medicine at the University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (PD Dr. S. Görg), for allocating blood. We also thank all blood donors for their attendance in support of our scientific efforts.

References

- Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS, et al. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring. *Stroke* 2000;31:610–4.
- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2004;351:2170–8.
- Braaten JV, Goss RA, Francis CW. Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *Thromb Haemost* 1997;78:1063–8.
- Cintas P, Le Traon AP, Larrue V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-MHz transcranial color-coded Doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke* 2002;33:626–8.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringeb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, et al. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of haemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial. *Stroke* 2005;36:1441–6.
- Eggers J, Ossadnik S, Hütten H, Seidel G. Sonothrombolysis is effective with recombinant tissue-type plasminogen activator, but not with Abciximab. Results from an in vitro study with whole blood clots and platelet-rich clots. *Thromb Haemost* 2009;102:1274–7.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. 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* 2008;39:1470–5.
- Eggers J, Seidel G, Koch B, König IR. Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA. *Neurology* 2005;64:1052–4.
- Nedelmann M, Brandt C, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, et al. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:18–22.
- Ricci S, Dinia L, Del Sette M, Anzola P, Mazoli T, Cenciarelli S, et al. Sonothrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD008348. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD008348.pub3>.
- Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Sprenger A, Dempfle CE, et al. The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows. *Blood Coagul Fibrinol* 2011a;22:407–15.
- Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Schmieger M, Weber PK, Stellmacher F, et al. Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. *BMC Neurol* 2011b;11:58–68.
- Siddiqi F, Blinc A, Braaten J, Francis CW. Ultrasound increases flow through fibrin gels. *Thromb Haemost* 1995;73:495–8.
- Spengos K, Behrens S, Daffertshofer M, Dempfle CE, Hennerici M. Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound Med Biol* 2000;26:889–95.

● *Original Contribution*

IN VITRO EXAMINATION OF THE THROMBOLYTIC EFFICACY OF DESMOTEPLEASE AND THERAPEUTIC ULTRASOUND COMPARED WITH RT-PA

FLORIAN C. ROESSLER,* ZHIHUA WANG,[†] SABRINA SCHUMACHER,[‡] MARCUS OHLRICH,[‡]
MANFRED KAPS,* ARIANNA MENCIASSI,[†] and JÜRGEN EGGERS[§]

*Department of Neurology, University Hospital Giessen, Giessen, Germany; [†]The BioRobotics Institute, Scuola Superiore Sant'Anna and Center for Micro-BioRobotics@SSSA, Istituto Italiano di Tecnologia, Pontedera, Italy; [‡]Department of Neurology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Germany; and [§]Department of Neurology, Sana Kliniken Lübeck GmbH, Lübeck, Germany

(Received 28 February 2015; revised 26 June 2015; in final form 8 July 2015)

Abstract—The aim of the study described here was to evaluate the thrombolytic efficacy of combined treatment with the fibrin-selective plasminogen activator desmoteplase (DSPA) and therapeutic ultrasound (sonothrombolysis [STL]) compared with conventional rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) treatment *in vitro*. Lysis rates were determined by the weight loss of platelet-rich plasma (PRP) clots treated with rt-PA (60 kU/mL) or DSPA (2 μ g/mL) combined with pulsed wave ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²). To reveal the individual effects of medication and ultrasound, lysis rates were also determined for DSPA monotherapy and for combined treatment with rt-PA and ultrasound. Clots solely placed in plasma served as the control group. Lysis increased significantly with rt-PA (26.5 \pm 7.8%) and DSPA (30.5 \pm 6%) compared with the control group (18.2 \pm 5.9%) (each $p < 0.001$). DSPA lysis was more effective than rt-PA lysis (without STL: $p = 0.015$, with STL: $p = 0.01$). Combined treatment with DSPA and 2-MHz STL significantly exceeded rt-PA lysis (32.8% vs. 26.5%, $p < 0.001$). (E-mail: florian.roessler@neuro.med.uni-giessen.de) © 2015 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Cerebrovascular stroke, Sonothrombolysis, Fibrin-selective plasminogen activator, Desmoteplase, Alteplase, Ultrasound, *In vitro* model.

INTRODUCTION

Acute ischemic stroke (AIS) is the fourth most frequent cause of mortality and a leading cause of permanent disability in developed countries (Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2010). Thromboembolic AIS therapy is focused on limiting the severity of ischemic injury by early recanalization of occluded vessels (Rha and Saver 2007).

At present, the only Food and Drug Administration-approved thrombolytic agent for thrombotic AIS therapy is recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA, alteplase). However, the use of rt-PA is currently restricted by the necessity to administer it within 4.5 h of the onset of symptoms (Hacke et al. 2008) because of an unfavorable risk/benefit ratio beyond this time. The limited fibrin selectivity of rt-PA causes plasminemia, which contributes to bleeding complications (Arnold et al. 1989). Given this finding and considering the general restrictions on use of rt-PA, only a minority of AIS patients can be treated with rt-PA. In the United States, in 2008, only 3%–5% of AIS patients were treated with rt-PA (Nasr et al. 2013). Thus, there is a need for treatments with improved tolerability that can be administered within an extended time-to-treat window.

Local transcranial application of ultrasound is a promising tool that accelerates vessel recanalization (known as sonothrombolysis [STL]) with (Alexandrov et al. 2000, 2004; Eggers et al. 2008) or without (Cintas et al. 2002; Eggers et al. 2005; Nedelmann et al. 2005)

Address correspondence to: Florian C. Roessler, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Standort Giessen, Klinikstrasse 33, 35385 Giessen, Germany. E-mail: florian.roessler@neuro.med.uni-giessen.de

Authorship: F.R. organized the laboratory, conceived the experimental design, built the static model, analyzed and interpreted the data and wrote the article together with Z.W. Z.W. carried out most of the experiments, analyzed and interpreted the data and wrote the article together with F.R. F.R. and Z.W. contributed equally to the work and approve dual first authorship. S.S. and M.O. assisted Z.W. in the experiments. M.K., A.M. and J.E. critically revised the article. J.E. initiated the *in vitro* experiment with DSPA and organized provision of staff and DSPA.

an additional systemic rt-PA treatment. STL without additional thrombolytic drug treatment does not have systemic adverse reactions because of its local application and can be used as monotherapy in patients with contra-indications to rt-PA (Eggers et al. 2005). If ultrasound with higher frequencies and defined sonication areas is used, then as a sole requirement, the occluded vessel has to be depicted using ultrasound imaging to ensure sufficient ultrasound energy is administered. The STL parameters should be adjusted to diagnostic settings to avoid intracerebral hemorrhage (Daffertshofer et al. 2005; Eggers et al. 2008). No significant increase in symptomatic intracerebral hemorrhage (sICH) was observed in patients treated with diagnostic ultrasound and rt-PA in combination (Ricci et al. 2012).

Plasminogen activators that selectively activate fibrin-bound plasminogen have increasingly become a focus of investigations in cerebral stroke. Plasminogen activator from vampire bat saliva (*Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator [DSPA], desmoteplase) is one of these effective thrombolytic drugs (Liberatore et al. 2003). It has been investigated for the treatment of acute ischemic stroke within the time window of 3–9 h after stroke onset. DSPA has unique characteristics compared with other thrombolytic agents, particularly rt-PA. Its high specificity for fibrin-bound plasminogen is noteworthy because fibrin is not only the substrate, but is also a cofactor for DSPA. In contrast to rt-PA, DSPA exhibits hardly any activity in the presence of fibrinogen. Thus, extensive plasminogen activation is avoided. In turn, this prevents plasmin-mediated fibrinogenolysis and consumption of α^2 -antiplasmin, which severely compromises the coagulation potential of the plasma, resulting in an increased risk of systemic bleeds (Stewart et al. 1998). Moreover, DSPA lacks intrinsic neurotoxicity (mostly NMDA-mediated) and exhibits negligible activation by β -amyloid and human cellular prion protein (Epple et al. 2004), which might result in a reduced incidence of bleeding (Pugsley et al. 2006). Finally, DSPA has a long half-life of approximately 3 h (Paciaroni et al. 2009). These characteristics suggest increased tolerability and a better pharmacologic profile for clinical use with an extended time window that is not accessible for the thrombolytic agents currently available. A considerable advantage of DSPA in clinical use is its application as a single bolus.

Desmoteplase has been studied *in vitro* (Schleuning et al. 1992) and in animal models (Witt et al. 1994) using various thrombosis models and preferentially with rt-PA as a comparator. In these studies, DSPA equaled or exceeded rt-PA in potency, with shorter lysis times and higher rates of recanalization.

In two phase II trials conducted in AIS (DIAS and DEDAS), doses of 90 and 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ had acceptable

safety profiles. For both doses, superior reperfusion rates were observed compared with placebo. DSPA exhibited apparent clinical efficacy for up to 9 h after the onset of stroke for patients with a significant ischemic penumbra (Furlan et al. 2006). On the other hand, a phase III study (DIAS-2) was unable to detect any benefit for either of the two doses of DSPA given 3–9 h after stroke onset (Hacke et al. 2009). However, the potential of this study to detect a DSPA effect was reduced because of the modest sample size. Furthermore, only 30% of the examined patients had a visible occlusion at presentation with only small core and mismatched lesion volumes. Rates of sICH (90 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 3.5%, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 4.5%) were lower compared with those in the rt-PA studies (Hacke et al. 1998), but mortality rates increased for the higher-dose group associated with sICH (Hacke et al. 2009). After pooling the data from DIAS, DEDAS and DIAS-2, Fiebach et al. (2012) confirmed that DSPA was beneficial for patients with complete or almost complete arterial occlusions at baseline.

Recently, the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled DIAS-3 trial was completed. In this study, 479 patients with AIS and a proven obstruction of major brain-supplying arteries were enrolled. Treatment was performed 3–9 h after stroke onset with 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DSPA versus placebo. The median time from symptom onset to treatment was 7.0 h. Once again, this study confirmed the favorable safety profile of DSPA. Desmoteplase was well tolerated. Adverse events were at the placebo level. Mortality was equal for the treatment groups. The rates of sICH were 2.5% (DSPA) and 2.1% (placebo) after completion of the study follow-up period to day 90. However, the trial did not meet the primary endpoint. The proportion of patients with a favorable outcome of modified Rankin scale (mRS) scores 0–2 at day 90 did not significantly differ between patients treated with DSPA (51.3%) and patients in the placebo control group (49.8%) (Lundbeck 2014a). However, shift analysis revealed an improvement of the functional outcome in the per-protocol population after DSPA (Lundbeck 2014b).

Despite these ambiguous study results, the characteristics of DSPA make it a promising treatment with improved tolerability for administration within an extended time-to-treat window. Additional application of ultrasound might also result in a further increase in lysis rates. Thus, the aim of the present study was to test the superiority of combined treatment with DSPA and STL as an alternative to rt-PA treatment, which serves as the current gold standard. We compared the lysis efficacy of DSPA and rt-PA in a reproducible *in vitro* setup using physiologic clots and investigated the additional effect of STL with DSPA and rt-PA.

METHODS

Clot preparation

Blood sampling was approved by the ethics committee of the University of Lübeck and was performed by the local Department of Transfusion Medicine, within the blood donation program. All donors provided informed consent.

Development of the clot formation protocol has been discussed elsewhere (Roessler *et al.* 2014). The main reasons leading to its design include:

- To provide a simple, economic and reproducible preparation
- To provide clots that exhibit both sufficient stability under physiologic flows and suitable lysis rates
- To generate clots that histologically resemble the *in vivo* thrombi that we received by thrombectomy.

The design of the clot formation protocol attaches great importance to the role of platelets in the clotting process.

Human venous blood was drawn into citrate tubes (S-Monovette, REF 02.1067.001, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) from different healthy donors who had not taken anticoagulants or antithrombotic medications during the previous 2 wk. Blood of the same blood group was pooled to avoid individual differences concerning the consistency and clotting quality of the blood. After centrifugation at 180g for 10 min (Multifuge 1 S-R, Heraeus Holding, Hanau, Germany), 1.5 mL of platelet-rich plasma (PRP) was removed by aspiration of the supernatant. PRP was mixed with 0.5 mL of the boundary layer, which had formed between the supernatant and erythrocyte layer, and with 2.0 mL of platelet-free plasma (PFP). PFP was prepared by aspiration of the supernatant after centrifugation of human venous blood at 2,570g for 10 min (EBA 8 s, Hettich, Tuttlingen, Germany). The blood cell count was determined using an automated analyzer (KX-21, SYSMEX, Kobe, Japan) for the gained mixture and the pooled venous blood. Clot formation was initiated by addition of CaCl₂ to a final concentration of 13.8 mmol/L and incubation at 37°C for 1 h in plastic tubes (REF 55.468.001, Sarstedt). Next, cylindrical clots (diameter: 4–5 mm) were cut to an average weight of 250 ± 50 mg and stored in plastic tubes with a blood substitute (Ringer solution, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany) at 37°C overnight to ensure complete clot retraction.

Static model

A static model was generated (Fig. 1). Five clots were stored in Eppendorf pipettes (REF 72.690.001, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) fully surrounded by fluid. The pipettes were fixed in a custom-built holder

completely made of plastic (polyoxymethylene [POM]) standing in a tank filled with degassed water. The water was maintained at 37°C using a temperature-controlled heater. Heat accumulation was prevented by a pump circulating the water. The two laterally placed clots were intended to be exposed to continuous 2-MHz pulsed wave ultrasound with an intensity of 0.179 W/cm² (Sonos 2500, Hewlett-Packard, Andover, MA, USA). The clots were fixed 50 mm perpendicular underneath the transducer face. The remaining clots were separated by baffles to ensure that lysis was unaffected by ultrasound. The sound absorber used consisted of foamed plastic (SH002, aixFOAM, Eschweiler, Germany).

Dose-finding experiments with DSPA

Inspired by *in vitro* experiments performed on rt-PA (Holland *et al.* 2008), the weight loss of clots stored in the static model within a solution of DSPA and pooled buffered plasma (pH 7.4) was measured after 1 and 2 h using an analytical balance (Kern 770, Kern & Sohn, Balingen, Germany). Lysis rates were determined for DSPA concentrations varying between 0 and 10.0 µg/mL (n = 10 each).

Lysis measurement

Clots were weighed on an analytical balance (Kern 770) before and after 1 h of exposure for five groups (each n = 40) to determine the percentage mass loss. In control group A, clots were treated solely with buffered plasma (pH 7.4); in groups B and C, with a solution of buffered plasma and rt-PA without and with insonation; and in groups D and E, with a solution of buffered plasma and DSPA without and with insonation. On the basis of our dose-finding experiments, a DSPA concentration of 2.0 µg/mL was used. For rt-PA, a final concentration of 60 kU/mL was used in accordance with other research groups (Behrens *et al.* 1999) and dose-finding experiments performed by Holland *et al.* (2008). Because of the short half-life of rt-PA which is approximately 4–9 min (Bell 2002), in groups B and C, the solution of buffered plasma and rt-PA was renewed every 15 min over 1 h of exposure. Solutions of DSPA in groups D and E were not renewed because DSPA has a terminal plasma half-life of approximately 3 h.

Therapeutic ultrasound exposure

Clots were exposed to pulsed ultrasound for 1 h using a clinical ultrasound system (Sonos 2500, Hewlett-Packard) in 2-MHz pulsed wave transcranial color-coded mode (TCCS), which is used in our clinic for transcranial diagnostic imaging. The transmit power and anti-aliasing threshold were set to 100% and 0.25 m/s, respectively. According to the manufacturer, the spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA}) at that

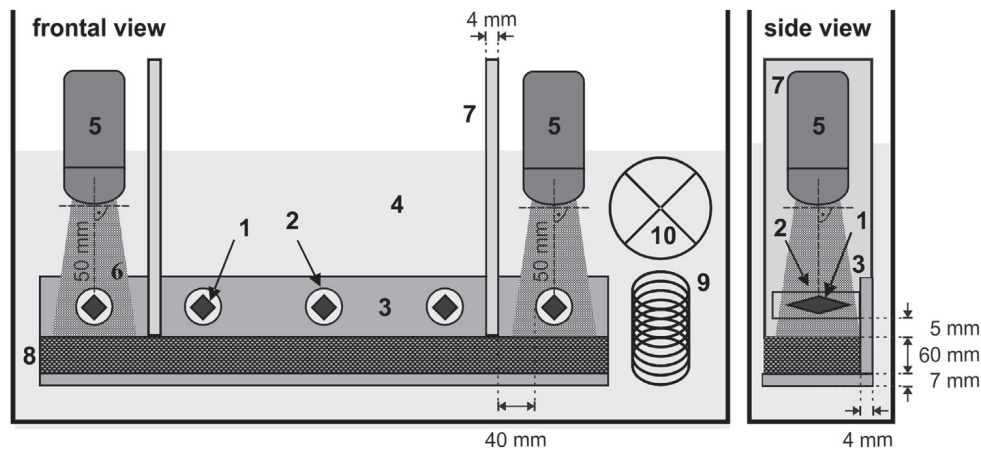


Fig. 1. Experimental setup. Clots (1) are placed within pipettes (2) that are fixed in a custom-built holder made of polyoxymethylene (3). Degassed water (4), ultrasound device (5), applied ultrasound (6), baffles made of polyoxymethylene (7), ultrasound absorber (8), temperature-controlled heater (9) and circulation pump (10). Clots that were treated with ultrasound were fixed 50 mm perpendicular underneath the transducer face. They were located exactly within the sample volume of the pulsed wave ultrasound.

setting is 0.179 W/cm^2 . The -6-dB bandwidth of the phased-array ultrasound transducer employed (21202A, Hewlett-Packard) was 2.0 to 2.5 MHz. The ultrasound probe was immersed in a degassed water bath and positioned 50 mm from the surface of the clot, as depicted in the experimental setup illustrated in Figure 1. The clots were located within the pulsed Doppler “sample volume” or focal volume of the ultrasound beam. The mechanical index (MI onscreen) was 0.6.

Calculations and statistics

Analysis of variance (ANOVA) and *post hoc t*-tests were performed to determine the statistical significance between the factors Medication (DSPA or rt-PA) and Ultrasound (no or present application of TCCS) with respect to the lysis rates. All analyses and statistics were performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software (Version 21.0.1, IBM, Armonk, NY, USA). Data provided in the text are reported as the mean \pm standard deviation of the mean. The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Table 1 lists the typical blood cell counts of mixtures that were used for clot preparation. With respect to the blood cell count of the original whole blood, white and red cell counts were reduced significantly, in contrast to the platelet count. This redistribution of blood cells reflects the Fahraeus–Lindqvist effect, which results in high concentrations of platelets close to the inner wall of the blood vessel where clotting occurs. For further details, please refer to Roessler et al. (2014).

Dose finding for DSPA

In Figure 2, the data reveal that clot lysis achieves saturation at DSPA concentrations $>2.0 \mu\text{g/mL}$ after 1 h and $>3.0 \mu\text{g/mL}$ after 2 h. After 1 h, the lysis rate reached values between 12% in the control group (spontaneous lysis with no DSPA) and 30% (DSPA concentration: $10 \mu\text{g/mL}$) and between 23% and 54% after 2 h. On the basis of these results, a DSPA concentration of

Table 1. Blood cell count of donor blood samples and the gained PRP/PFP mixture used for clot preparation

Overview of blood cell counts	Human venous blood		PRP/PFP mixture for clot preparation (n = 5)	Accuracy of analyzer*	Units
	Donor blood (n = 5)	Normal values			
WBC	$5.6 \pm 0.4^\dagger$	4–9	0.8 ± 0.1	± 0.2	$\times 10^9/\text{L}$
RBC	4.17 ± 0.08	4–5	0.67 ± 0.05	± 0.03	$\times 10^{12}/\text{L}$
Hemoglobin	122.2 ± 1.8	120–180	19.2 ± 1.1	—	g/L
Hematocrit	37.1 ± 0.5	38–54	5.6 ± 0.4	—	%
Platelets	213 ± 31	150–400	167 ± 10	± 10	$\times 10^9/\text{L}$

PFP = platelet-free plasma; PRP = platelet-rich plasma; RBC = red blood cells; WBC = white blood cells.

* Accuracy was calculated for the analyzer as operated according to the manufacturer’s instructions.

† Values are the mean \pm standard deviation of the mean or range.

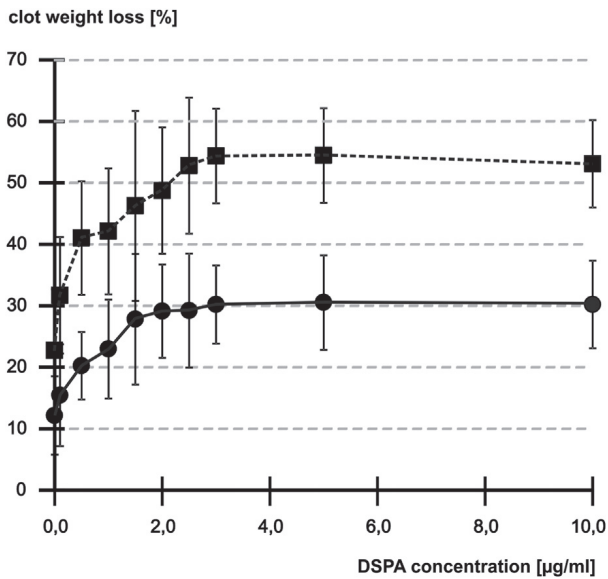


Fig. 2. Results of the dose-finding experiments with desmoteplase (DSPA). Clot lysis achieves saturation at DSPA concentrations $>2.0 \mu\text{g/mL}$ after 1 h (circles) and $>3.0 \mu\text{g/mL}$ after 2 h (squares) of treatment. Values are expressed as means \pm standard deviations of mean.

$2.0 \mu\text{g/mL}$ was employed in all of the following lysis experiments using the static model.

Lysis rates of rt-PA, DSPA, rt-PA + STL and DSPA + STL

As illustrated in Figure 3, compared with the control group A ($18.2 \pm 5.9\%$), the lysis rate increased significantly for both group B with rt-PA ($26.5 \pm 7.8\%$) and group D with DSPA ($30.5 \pm 6\%$) (each $p < 0.001$). Lysis induced by DSPA was more effective than that induced by rt-PA both with ($p = 0.01$) and without ($p = 0.015$) STL. Lysis increased slightly with exposure to TCCS for group E with DSPA ($32.8 \pm 7.2\%$, $p = 0.127$) and group C with rt-PA ($28.6 \pm 6.6\%$, $p = 0.206$). However, the increases were not statistically significant. The combined treatment with DSPA and STL resulted in significantly enhanced thrombolysis compared with conventional rt-PA treatment (32.8% vs. 26.5% , $p < 0.001$).

Statistical analysis by 2×2 factorial ANOVA did not reveal significant interactions between Medication and Ultrasound with respect to effects on the lysis rate.

DISCUSSION

As previously illustrated for rt-PA, a saturation trend was also observed for *in vitro* experiments with DSPA (Fig. 2). The clot lysis rate increases monotonically as a function of DSPA concentration for a 1-h exposure until $2.0 \mu\text{g/mL}$. For an exposure of 2 h, saturation occurs later at $3.0 \mu\text{g/mL}$. The curve progressions are markedly

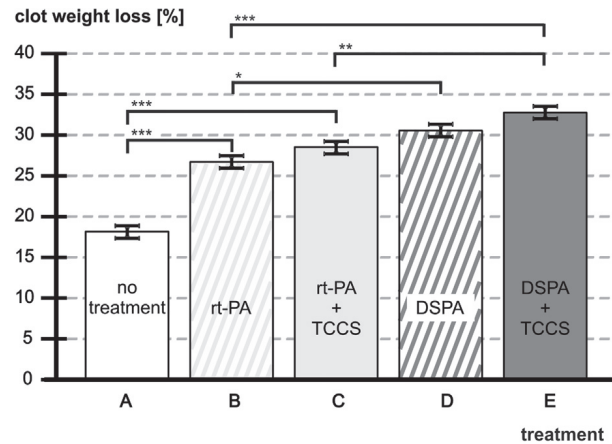


Fig. 3. Results of the lysis experiments. Relative clot weight loss measured after 1 h exposure for five groups ($n = 40$ each). Values are depicted as means \pm standard errors of mean for a more distinct visualization of statistical relations. Group A (control group): $18.2 \pm 0.9\%$. Clots were treated solely with buffered plasma (pH 7.4). Groups B and C: ($26.5 \pm 1.3\%$ and $28.6 \pm 1.1\%$). Clots were treated with rt-PA (60 kU/mL) and, in group C, also with ultrasound (TCCS: 2 MHz , 0.179 W/cm^2). Groups D and E: $30.5 \pm 1\%$ and $32.8 \pm 1.2\%$. Clots were treated with DSPA ($2.0 \mu\text{g/mL}$) and, in group E, also with the same ultrasound as used for group C. TCCS = transcranial color-coded sonography. * $p = 0.015$, ** $p = 0.01$, *** $p < 0.001$.

similar, except for an increased slope in the 2-h exposure. On the one hand, the slope of the measured lysis rate increases with an extended time of exposure that is limited only by the half-life of DSPA. On the other hand, the lysis rate is dependent on the amount of DSPA molecules diffusing through the clot surface. This causes saturation in terms of the DSPA concentration. The dependence on time and DSPA concentration of the measured lysis rates results in similar curve progressions and a rightward shift of the saturation point because small dose-dependent increases in the lysis rate, which were elusive after a 1-h exposure, were enlarged and became detectable with prolonged exposure. The lysis rate increases significantly after a 2-h exposure to DSPA because of its long terminal plasma half-life of approximately 3 h. This enables DSPA to be administered as a single bolus injection in clinical application, whereas rt-PA has to be applied as a bolus injection followed by continuous intravenous infusion because of its short half-life of approximately 4 to 9 min (Bell 2002). Thus, the long half-life of DSPA is a considerable advantage in its clinical use in the emergency room.

On the basis of the findings for the subsequent 1-h lysis experiments with DSPA, a concentration of $2.0 \mu\text{g/mL}$ was chosen. This concentration was consistent with findings obtained from clinical trials (DIAS, DE-DAS and DIAS-2) in which doses of 90 and $125 \mu\text{g/kg}$

DSPA were tested in stroke patients, resulting in better outcomes compared with placebo. Treatment with 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ more often had a significant benefit. However, because of the safety profile across these studies, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DSPA was selected for further development and studies. Assuming a blood volume of 5000 mL, as calculated with Nadler's formula, for a healthy male adult weighing 70 kg and 180 cm tall (Nadler et al. 1962), doses of 90 and 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ equal concentrations of 1.26 and 1.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

As illustrated in Figure 3, our data indicate that the thrombolytic efficacy of DSPA is significantly higher than that of rt-PA. This result corresponds to results of previous *in vitro* studies, which reported equal potency in clot lysis, slightly faster clot clearance and reduced fibrinogenolysis for DSPA compared with rt-PA (Schering 1992a, 1992b; Schleunig et al. 1992). However, these studies cannot be compared readily to our measurements because of the different clot formation protocols. We used clots made from PRP, which are characterized by sufficient stability under physiologic flows and a satisfactory histologic appearance (Roessler et al. 2014). In contrast, previous studies used spontaneously clotted whole blood, which cannot resist even low flows and do not histologically resemble *in vivo* clots (Roessler et al. 2014). Whole blood clots have only rudimentary fibrin meshes, which are the substrate of thrombolytic agents and, in the case of DSPA, also the cofactor. The high lysis rates achieved in our experimental setup, particularly with DSPA, might be the result of the strong fibrin mesh found in PRP clots. Compared with rt-PA, DSPA has increased lytic potency, which results from its longer half-life and better transport of plasminogen to the surface of the clot (Sakharov et al. 1999; Witt et al. 1994). The longer half-life of DSPA most likely results in deeper penetration of its molecules into the clot. According to its clinical usage with a single bolus application, the DSPA solution was maintained unchanged during our *in vitro* experiments. Conversely, the rt-PA-plasma solution was replaced every 15 min to achieve continuous application of rt-PA. More frequent changes are not technically feasible. However, whether even continuous rt-PA application could increase rt-PA lysis rates remains questionable because the low penetration depth of the short-lived rt-PA can be balanced only by quick and complete dissolution of the outer face of the clot. Furthermore, as previously indicated by Sakharov et al. (1999), fibrin-specific agents, such as DSPA, preserve plasminogen in the surrounding plasma pool and thus ensure a subsequent better transport of plasminogen to the surface of the clot.

With respect to the rt-PA concentration chosen, Holland et al. (2008) performed experiments with porcine blood. The amount of endogenous plasminogen is lower

in porcine blood than in human blood. Thus, smaller concentrations of rt-PA might be sufficient for our experiments. On the other hand, experiments performed by Holland et al. (2008) and Onundarson et al. (1992) revealed that the extent of thrombolysis increased with increasing rt-PA concentration only until saturation was achieved. The most frequent concentration reported in the literature was 0.1 mg/mL (60 kU/mL). This concentration was also used in experiments conducted with human blood (Behrens et al. 1999). Thus, we used a previously known rt-PA concentration that exceeded the saturation point to avoid concentration-dependent effects on the measured clot mass loss for rt-PA, as well as an underestimation of the thrombolytic effect of rt-PA compared with DSPA.

Group E had the highest clot lysis rate ($32.8 \pm 7.2\%$). The additional application of TCCS improved the efficacy of DSPA alone ($30.5 \pm 6\%$). The lysis rate was also increased revealed for the combined application of rt-PA and TCCS ($28.6 \pm 6.6\%$) compared with rt-PA alone ($26.5 \pm 7.8\%$). However, the positive effect of ultrasound on thrombolysis was not significant in our measurements. Several studies have reported significantly increased lysis rates after the addition of ultrasound to rt-PA treatment (Eggers et al. 2009b; Holland et al. 2008; Lauer et al. 1992; Prokop et al. 2007). However, other research groups also reported that lysis with ultrasound and rt-PA was not significantly increased compared with that for rt-PA alone (Hitchcock et al. 2011; Petit et al. 2012; Roessler et al. 2014). This finding can be explained by the different experimental conditions, which can result in differences in the lysis rates achieved. The most important influencing variables were ultrasound settings, clot model and method of analysis used. We used a comparatively low ultrasound intensity with a higher frequency. This causes only minor ultrasound-induced streaming and, thus, only low rt-PA diffusion into the clot, resulting in limited enzymatic fibrinolysis (Lauer et al. 1992; Prokop et al. 2007). Furthermore, we used PRP clots instead of clots formed by spontaneously clotted whole venous blood. Because of the stronger fibrin mesh, the additional thrombolytic effect of ultrasound was reduced (Eggers et al. 2009a; Roessler et al. 2014). We decided to use PRP clots because of their histologic features, which were equal to those of clots obtained from thrombectomy of patients who had an acute embolic stroke (Roessler et al. 2014). Importantly, these referential *in vivo* clots resisted previous systemic rt-PA treatment before they were extracted mechanically and are presumably more resistant than the majority of intracranial clots *in vivo*. Thus, our PRP clot models severe cases of thromboembolic AIS. As for other *in vitro* generated clots, our PRP clots do not represent the entire

spectrum of *in vivo* thrombi, but they are convenient test objects for use in improving STL. Ultrasound increases the penetration and binding affinity of thrombolytic drugs *via* the reversible disaggregation of fibrin fibers by mechanical fragmentation, or cavitation (Francis 2001; Francis *et al.* 1995; Siddiqi *et al.* 1998). We hypothesized that these effects were similarly applicable to DSPA. Moreover, the effect of ultrasound correlated with the presence of plasminogen in the outer plasma, suggesting that it is mediated by facilitating the transport of plasminogen to the surface of the clot (Sakharov *et al.* 1999). This finding is supported by DSPA fibrin specificity and, thus, the plasminogen-sparing property. Consistent with this finding, our ultrasound experiments revealed an improved lysis rate. However, there was no significant increase.

From the operating parameters of the ultrasound device used (2 MHz, $I_{SPTA} = 0.179 \text{ W/cm}^2$, MI = 0.6) we can assume that cavitation or thermal mechanisms are not responsible for the increased lysis rates (Deng *et al.* 1996; Soltani *et al.* 2008). Thus, this technique might be safely applied in daily clinical practice.

Against the background of these present results and the favorable safety characteristics of 2-MHz STL and fibrin-selective plasminogen activators, such as DSPA, further investigations should focus on using such combined treatment strategies for cases with an extended time-to-treat window and more resistible occlusions.

Future experiments should use tenecteplase instead of DSPA because of the recent termination of DSPA production. Similar to DSPA and in contrast to rt-PA, tenecteplase is favorable because of its increased specificity for fibrin-bound plasminogen and lack of intrinsic neurotoxicity and damage to the blood–brain barrier, as well its increased half-life, which offers the opportunity to use a single bolus application. Tenecteplase was previously considered to be the gold standard in fibrinolytic treatment of myocardial infarction (Bates 2014), and several clinical studies have been performed to assess its tolerability, feasibility and efficacy in ischemic stroke (Behrouz 2014).

Finally, according to the physics of ultrasound and biological mechanisms of STL, we propose studies to examine the effect of the addition of microbubbles, which enhance the penetration of plasminogen activators. This could enable effective clot lysis with a considerably reduced concentration of the thrombolytic drug, thereby potentially reducing adverse side effects.

CONCLUSIONS

We conclude that the extent of DSPA thrombolysis increases *in vitro* with its concentration until saturation

is reached above $2.0 \mu\text{g/mL}$ in 1 h and that a rightward shift of this saturation point can be observed after a 2-h exposure because of the long half-life of DSPA. For PRP clots, DSPA has significantly higher thrombolytic efficacy compared with rt-PA. The predominance of DSPA can be explained by its unique characteristics: its long half-life and its high specificity for fibrin-bound plasminogen. For PRP clots, the combined treatment with the fibrin-selective plasminogen activator desmoteplase (DSPA) and STL results in significantly enhanced thrombolysis compared with conventional rt-PA treatment (32.8% vs. 26.5%, $p < 0.001$). Further investigations should focus on using such combined treatment strategies for cases with extended time-to-treat windows and more resistible occlusions.

Acknowledgments—We are grateful to Melanie Oberneyer for critical reading of the manuscript and to Dr. Andreas Sprenger for his support with statistics. The authors thank the Department of Transfusion Medicine, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (PD Dr. S. Görg), for allocating blood. We also thank all blood donors for their willingness to support our scientific efforts. Our special thanks go to Bernd Junge for his advice on technical issues. Finally, we thank Fondazione Cassa di Risparmio di Pisa for the financial support of the PhD studies of Zhihua Wang.

REFERENCES

- Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring. *Stroke* 2000;31:610–614.
- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moyé LA, Hill MD, Wojner AW, CLOTBUST Investigators. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2004;351:2170–2178.
- Arnold AE, Brower RW, Collen D, van Es GA, Lubsen J, Serruys PW, Simoons ML, Verstraete M. Increased serum levels of fibrinogen degradation products due to treatment with recombinant tissue-type plasminogen activator for acute myocardial infarction are related to bleeding complications, but not to coronary patency. *European Co-operative Study Groups for rt-PA. J Am Coll Cardiol* 1989;14:581–588.
- Bates ER. Evolution from fibrinolytic therapy to a fibrinolytic strategy for patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2014;130:1133–1135.
- Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:269–273.
- Behrouz R. Intravenous tenecteplase in acute ischemic stroke: An updated review. *J Neurol* 2014;261:1069–1072.
- Bell WR. Present-day thrombolytic therapy: Therapeutic agents—Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med* 2002;3:34–44.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Stroke drops to fourth leading cause of death in 2008. Available at: <http://www.cdc.gov/media/pressrel/2010/r101209.html>; December 9, 2010. Accessed: November 17, 2014.
- Cintas P, Le Traon AP, Larrue V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-MHz transcranial color-coded Doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke* 2002;33:626–628.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, Sedlaczek O, Koroshetz WJ, Hennerici MG. Transcranial

- low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia. *Stroke* 2005;36:1441–1446.
- Deng CX, Xu Q, Apfel RE, Holland CK. In vitro measurements of inertial cavitation thresholds in human blood. *Ultrasound Med Biol* 1996;22:939–948.
- Eggers J, Seidel G, Koch B, König IR. Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA. *Neurology* 2005;64:1052–1054.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and rt-PA in acute middle cerebral artery main stem occlusion: Results from a randomized study. *Stroke* 2008;39:1470–1475.
- Eggers J, Ossadnik S, Hütten H, Seidel G. Sonothrombolysis is effective with recombinant tissue-type plasminogen activator, but not with Abciximab: Results from an in vitro study with whole blood clots and platelet-rich clots. *Thromb Haemost* 2009a;102:1274–1277.
- Eggers J, Ossadnik S, Seidel G. Enhanced clot dissolution in vitro by 1.8-MHz pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2009b;35:523–526.
- Epple G, Schleuning WD, Kettelgerdes G, Kottgen E, Gessner R, Praus M. Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator-mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2. *J Thromb Haemost* 2004;2:962–968.
- Fiebach JB, Al-Rawi Y, Wintermark M, Furlan AJ, Rowley HA, Lindstén A, Smyej J, Eng P, Warach S, Pedraza S. Vascular occlusion enables selecting acute ischemic stroke patients for treatment with desmoteplase. *Stroke* 2012;43:1561–1566.
- Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol* 1995;21:419–424.
- Francis CW. Ultrasound-enhanced thrombolysis. *Echocardiography* 2001;18:239–246.
- Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W, DEDAS Investigators. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS): Evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 2006;37:1227–1231.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 1998;352:1245–1251.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1317–1329.
- Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebach JB, Gruber F, Kaste M, Lipka LJ, Pedraza S, Ringleb PA, Rowley HA, Schneider D, Schwamm LH, Leal JS, Söhngen M, Teal PA, Wilhelm-Ogunbiyi K, Wintermark M, Warach S. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): A prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol* 2009;8:141–150.
- Hitchcock KE, Ivancevich NM, Haworth KJ, Caudell Stamper DN, Vela DC, Sutton JT, Pyne-Geithman GJ, Holland CK. Ultrasound-enhanced rt-PA thrombolysis in an ex vivo porcine carotid artery model. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:1240–1251.
- Holland CK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ. Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res* 2008;121:663–673.
- Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation* 1992;86:1257–1264.
- Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): A unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 2003;34:537–543.
- Lundbeck. Corporate Release No 537: Lundbeck provides update on the development program for desmoteplase. Available at: <http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=856865>; June 27, 2014a. Accessed: November 17, 2014.
- Lundbeck. Corporate Release No 543: Lundbeck presents new efficacy and safety data analysis for desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke. Available at: <http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=878159>; October 25, 2014b. Accessed: November 17, 2014.
- Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962;51:224–232.
- Nasr DM, Brinjikji W, Cloft HJ, Rabinstein AA. Utilization of intravenous thrombolysis is increasing in the United States. *Int J Stroke* 2013;8:681–688.
- Nedelmann M, Brandt C, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, Dieterich M. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:18–22.
- Onundarson PT, Francis CW, Marder VJ. Depletion of plasminogen in vitro or during thrombolytic therapy limits fibrinolytic potential. *J Lab Clin Med* 1992;120:120–128.
- Paciaroni M, Medeiros E, Bogousslavsky J. Desmoteplase. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:773–778.
- Petit B, Gaud E, Colevret D, Arditi M, Yan F, Tranquart F, Allémann E. In vitro sonothrombolysis of human blood clots with BR38 microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:1222–1233.
- Prokop AF, Soltani A, Roy RA. Cavitation mechanisms in ultrasound-accelerated fibrinolysis. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:924–933.
- Pugsley MK, Lipka L, Petersen KU, Soehngen M. A new hope for stroke? Evidence for the use of rDSPA α 1 (desmoteplase) in acute ischemic stroke. *Proc West Pharmacol Soc* 2006;49:1–5.
- Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: A meta-analysis. *Stroke* 2007;38:967–973.
- Ricci S, Dini L, Del Sette M, Anzola P, Mazzoli T, Cenciarelli S, Gandolfo C. Sonothrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD008348.
- Roessler FC, Teichert A, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Tanislav C, Seidel G. Development of a new clot formation protocol for standardized in vitro investigations of sonothrombolysis. *J Neurosci Methods* 2014;237:26–32.
- Sakharov DV, Barrett-Bergshoeff M, Hekkenberg RT, Rijken DC. Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: Comparison of nine plasminogen activators in vitro. *Thromb Haemost* 1999;81:479–667.
- Schering AG. Lysis of human plasma and whole blood clots in vitro by ZK 152 387 (DPSA alpha1), ZK 153 786 (DSPA alpha2), ZK 155 278 (DSPA beta), ZK 153 858 (alteplase), ZK 130 932 (scu-PA), ZK 113 905 (urokinase), and ZK 156 552 (anistreplase). Schering Report A315. Berlin: Author; 1992a.
- Schering AG. Lysis with ZK 152 387 of human whole blood clots in vitro. Schering Report 9752. Berlin: Author; 1992b.
- Schleuning WD, Alagon A, Boidol W, Bringmann P, Petri T, Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Baldus B, Witt W. Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): Unique fibrin specificity. *Ann NY Acad Sci* 1992;667:395–403.
- Siddiqi F, Odriljin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood* 1998;91:2019–2202.
- Soltani A, Volz KR, Hansmann DR. Effect of modulated ultrasound parameters on ultrasound-induced thrombolysis. *Phys Med Biol* 2008;53:6837–6847.
- Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *J Biol Chem* 1998;273:18292–18299.
- Witt W, Maass B, Baldus B, Hildebrand M, Donner P, Schleuning WD. Coronary thrombolysis with *Desmodus* salivary plasminogen activator in dogs: Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation* 1994;90:421–426.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



In vitro examination of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA

Tobias Frühwald¹, Ulrich Gärtner², Nils Stöckmann¹, Jan-Henning Marxsen³, Carolin Gramsch⁴ and Florian C. Roessler^{1,5*}

Abstract

Background: Optimizing thrombolytic therapy is vital for improving stroke outcomes. We aimed to develop standardized thrombolysis conditions to evaluate the efficacy of tenecteplase (TNK) compared to the current gold standard rt-PA (alteplase), with and without additional ultrasound treatment. We also wanted to introduce a new analytical approach to quantify fibrin fiber density in transmission electron microscopy (TEM).

Methods: In vitro clots that are similar to ex vivo clots concerning their histological condition and their durability were generated from whole blood. For five treatment groups we compared relative clot weight loss (each $n = 60$) and fibrin fiber density in TEM (each $n = 5$). The control group (A) was treated only with plasma. Two groups were designated for each rt-PA (B + C) and TNK (D + E). Groups C and E were additionally treated with ultrasound. Dosages were 50 $\mu\text{g/ml}$ for rt-PA and 30 $\mu\text{g/ml}$ for TNK. Results were evaluated by using analyses of variance (ANOVA) and post-hoc t-tests.

Results: Weight loss was increased significantly for all groups compared to the control group. Both TNK groups showed significantly increased weight loss compared to their counterpart rt-PA group ($p \leq 0.001$). For TEM only group D showed significantly decreased fibrin fiber density ($p < 0.05$) compared to both rt-PA groups. Ultrasound did not significantly increase dissolution of clots with either method (best $p = 0.16$).

Conclusions: Tenecteplase dissolved clots more effectively than rt-PA with and without ultrasound. A higher sample size could provide more convincing results for TEM.

Keywords: Stroke, Thrombolysis, Tenecteplase, Ultrasound, Transmission electron microscopy

Background

Stroke remains one of the leading causes of death and serious long time disability in the world. Additionally, projections estimate a 20% increase in prevalence in adults by 2030 in comparison to 2012 [1]. Therefore, stroke is a clinically and epidemiologically highly relevant and impactful disease, and will remain so in the near future.

About 87% of all strokes are ischemic in nature [1] and optimization of interventional or medicinal recanalization

techniques is still substantial to provide better therapeutic options for a large number of patients.

While mechanical thrombectomy promises good results, it is only suitable for proximal vessel occlusions [2]. Therefore, thrombectomy is an addition and not a replacement to intravenous thrombolytic therapy. Concerning thrombolytic drugs, rt-PA (Actilyse®) remains the standard treatment within 4.5 h of stroke onset, regardless of severity. Rt-PA however, offers significant drawbacks, such as the risk of intracranial hemorrhages following treatment and a still limited time window for treatment post onset of symptoms [3] even if this time window is likely to open further [4]. However, up to now, even with rising treatment numbers only 3.5% of all stroke patients are eligible for treatment [5]. Even

* Correspondence: florian.roessler@neuro.med.uni-giessen.de

¹Department of Neurology, Justus-Liebig-University Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany

⁵Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Standort Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



with treatment, morbidity rates remain at around 50% with mean mortality rates at about 12% [5].

Therefore, it is crucial to find new and improved methods of treatment providing greater efficacy as well as not increasing the intensity and prevalence of side effects.

Alternative fibrinolytic drugs to rt-PA may provide these benefits.

Tenecteplase (TNK, Metalyse®) is one of them. Current guidelines suggest TNK as alternative to alteplase in patients with minor neurological impairment and no major intracranial occlusion [6]. In addition, studies proved TNK at least to be equally effective in large vessel occlusions [7].

Mutations in three parts of the original alteplase molecule raise TNKs specificity to fibrin by a factor of 14–15 and its resistance towards plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a factor of 80 [8, 9]. Furthermore, TNK has a longer half-life of about 22 min [8, 9] compared to a short half-life of 4–9 min of rt-PA [10]. This should lead to a higher affinity to fibrin-rich clots and a more potent and faster clot lysis. Because of the extended half-life, TNK can be given as a single i.v. bolus [9]. This fast and simple route of administration might shorten door-to-needle times and possibly increase thrombolysis rates. Finally, due to less consumption of fibrinogen, plasminogen, and α_2 -antiplasmin TNK has a low systemic fibrinolytic effect and therefore less risk for bleeding [9].

For stroke patients the first randomized controlled trial (RCT) that demonstrated superiority of TNK over rt-PA in terms of clinical efficacy was published in 2012. The effect of 0.1 and 0.25 mg/kg TNK was compared to 0.9 mg/kg rt-PA (only $n = 25$ for each group) less than 6 h after symptom onset. TNK was associated with a significantly better reperfusion and clinical outcome. Stroke patients were selected because of CT perfusion imaging. There was no significant difference in the incidence of intracranial hemorrhages [11]. The validity of these results is limited due to a small sample size, inclusion criteria based on perfusion imaging, and exclusion of patients with mild stroke.

Previously, another double RCT [12] was forced to halt prematurely, because TNK 0.4 mg/kg showed inferiority concerning improvement of NIHSS within 24 h compared to TNK 0.1 and 0.25 mg/kg and a significantly increased frequency of symptomatic intracerebral hemorrhage (sICH). There were no differences in functional outcome at 3 months between either of the TNK groups compared to the rt-PA group.

ATTEST (Alteplase-Tenecteplase Trial Evaluation for Stroke Thrombolysis) [13] found no difference in the percentage of salvaged penumbra at 24–48 h after thrombolysis between TNK 0.25 mg/kg and rt-PA 0.9 mg/kg. Secondary outcomes including clinical improvement at 24 h and functional outcome after 3 months as well as increased risk of sICH or serious adverse events showed also similar results.

Up to now, the NOR-TEST study is the largest ($n = 1100$) RCT [14]. This multicenter trial compared TNK 0.4 mg/kg to rt-PA 0.9 mg/kg in stroke patients within 4.5 h of onset, using only CT for imaging selection. No difference was found with respect to either safety or frequency of gained excellent functional outcome defined as mRS ≤ 1 at 3 months. Interpretation is difficult due to the predominance of mild strokes (median NIHSS at baseline was 4) and high proportions of TIAs and stroke mimics.

The most recently published EXTEND-IA TNK trial showed that given before thrombectomy TNK 0.25 mg/kg was associated with a significantly increased incidence of reperfusion and a better 90-day functional outcome than rt-PA 0.9 mg/kg. The incidence of recovery to independent function did not differ significantly as well as the incidence of symptomatic intracerebral hemorrhage [7]. This study lacks an adequate amount of cases ($n = 202$).

There are many reasons for these inhomogeneous results. Of particular importance are varied TNK doses, various approaches to imaging selection, and different endpoints and case numbers resulting in inconsistent statistical analyses. Coutts et al. provide an overview of the current study situation [15].

A possible addition to any fibrinolytic drug could be ultrasound. As already known, vessels recanalization is facilitated by local application of diagnostic ultrasound when it is applied concurrently with systemic thrombolytic drugs [16–18]. Depending on energy and frequency, ultrasound leads to mechanical fragmentation and cavitation. Both mechanisms increase the penetration and binding affinity of thrombolytic drugs due to reversible disaggregation of fibrin fibers [19]. Systemic adverse reactions such as bleeding are not to be feared due to the local application of ultrasound. Symptomatic intracerebral hemorrhage can be avoided by adjusting the ultrasound parameters to diagnostic settings [17, 20]. However, the occluded vessel has to be depicted using ultrasound imaging to ensure sufficient application of the administered ultrasound energy.

Our aim was to conduct in vitro experiments using a standardized thrombolysis protocol for a reproducible comparison of the thrombolytic efficacy of tenecteplase and rt-PA in either case at their maximum capacity. Furthermore, we investigated the additional effect of therapeutic ultrasound. Finally, in addition to the already established weight loss measurements we introduce a new analytical approach to quantify fibrin fiber density in transmission electron microscopy (TEM).

Methods

Clot preparation

All clots were prepared using blood of healthy, human donors, who gave informed consent. After approval of the Ethics Committee of Justus-Liebig-Universität Gießen

(reference number: 206/14) sampling was randomly performed by the local department of transfusion medicine.

Clots were generated using the clot formation protocol developed by Roessler et al. [21]. This protocol ensured a reliable and reproducible preparation of clots staying stable under physiological flow conditions while still retaining adequate lysis rates in experiments. Additionally, clots generated by this protocol showed very similar histological properties to ex vivo clots obtained by thrombectomy [21].

Blood from individual participants were drawn into citrate tubes and centrifuged at two different speeds: 180 *g* for 10 min (Benchtop centrifuge, Allegra 64R, Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany) to produce platelet rich plasma (PRP) and 2570 *g* for 10 min (EBA 8S, Hettich, Tuttlingen, Germany) to generate platelet free plasma (PFP).

The resulting supernatants containing PRP and PFP respectively were removed via aspiration. Compensating for individual differences in blood consistency and coagulation quality, plasma from donors of the same blood group was pooled before proceeding. Then, 2.0 ml of PFP and 1.5 ml of PRP were mixed in plastic tubes (REF 55.468.001, Sarstedt) with the addition of 0.5 ml of boundary layer found in PRP tubes between the supernatant and erythrocyte layer. Initiating the clotting process, 0.64 ml of 0.1 mol/l CaCl_2 -solution were added (final concentration: 13.8 mmol/l), and the resulting mixture was incubated in 37 °C for one hour. Afterwards, the resulting clots were placed in new plastic tubes with a blood substitute (Ringer solution, Berlin Chemie Menarini, Berlin, Germany) at 37 °C overnight to ensure full clot retraction and avoid autolytic dissolution that can be observed in clots stored in plasma. At last, the clots were cut to a weight of 300 \pm 100 mg, in order to generate more comparable lysis rates.

Static model

We used a static model our workgroup previously described in other publications for reproducible clot dissolution [22, 23]. For experiments, the model was submerged in 37 °C degassed water. A pump circulating the water prevented heat accumulation. The model we used consisted of a custom-built holding device made out of polyoxymethylene capable of holding up to five Eppendorf pipettes (Safe Seal Gefäß 1,5 ml, REF 72.706, Sarstedt) simultaneously.

The two lateral slots were separated from the others by baffles, allowing for the application of ultrasound to one specific pipette, while shielding the others from unwanted dispersion. To prevent reflection, sound absorbing foamed plastic (SH002, aixFOAM, Eschweiler, Germany), was placed beneath the holders.

Dose finding experiments

The dose finding was conducted similar to in vitro experiments performed by Holland et al. [24]. The weight loss of clots treated with pooled buffered plasma (pH = 7.4) and TNK or rt-PA respectively (each $n = 10$) was determined by using an analytical balance (Mettler AB104-S Analytical Balance, Mettler-Toledo, Columbus, USA) after 1 h and 2 h for concentrations varying between 0 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for rt-PA and between 0 and 40 $\mu\text{g/ml}$ IU for TNK.

Quantitative weight loss experiments

The same analytical balance was used to determine the percentage of mass loss in an one hour experiment. The experiment was conducted in 5 groups (each $n = 60$). In the control group A clots were treated without a fibrinolytic agent, but solely with buffered plasma (pH = 7.4).

Groups B and C were treated with rt-PA at a dosage of 50 $\mu\text{g/ml}$ and additional ultrasound in group C. For the duration of the experiment, each clot was placed into a new container with fresh rt-PA and plasma every 15 min. This renewal procedure accounted for the short half-life of rt-PA and simulated a clinical situation with continuous rt-PA-application.

Groups D and E were treated with TNK at a dosage of 30 $\mu\text{g/ml}$. As TNK has a longer half-life and can therefore be applied as a single bolus injection, the renewal process from groups B and C was only simulated by lifting the clots out of their container and then placing them back into it every 15 min during the experiment. The same procedure was performed with clots of the control group A. This ensured that every clot undergoing a lysis procedure was exposed to the same mechanical effects that might influence the results of the weight loss experiment.

Exposure to therapeutic ultrasound (sonothrombolysis, STL)

In addition to the treatment with their respective fibrinolytic agents, groups C and E were exposed to pulsed wave ultrasound (US) (Sonos2500, Hewlett-Packard, Andover, MA, USA) for one hour operating at 2.0 to 2.5 MHz. We used TCCS (transcranial color-coded mode) with an anti-aliasing threshold of 0.25 m/s and a power threshold of 100%. Spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA}) was 0,179 W/cm^2 . The mechanical index was 0.6. This system is equivalent to commonly used transcranial diagnostic imaging systems in a clinical setting. Clots and transducer were immersed in degassed water at 37 °C fixed to each other at a distance of 50 mm, with the clot centered within the focal volume of the ultrasound beam to ensure maximum efficacy.

Electron microscopy

For electron microscopy, clots were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% formaldehyde in 0.15 M HEPES.

Clots were transferred into 20% sucrose solution to avoid squeezing artifacts during further processing. After complete immersion, they were subsequently frozen at -26°C . Then, they were broken into small pieces and processed. For these experiments, clots were prepared without boundary layer to prevent that red blood cells conceal the fibrin mesh. For transmission electron microscopy (TEM), samples were postfixated in 1% osmium tetroxide in aqua bidest., stained in half-saturated water uranyl acetate (Merck Darmstadt Germany), dehydrated in an ascending ethanol series and finally embedded in agar 100 resin (Agar scientific Ltd. UK). Five clots from each treatment group (A-E) were processed. For each clot, five ultrathin slices were cut using an ultramicrotome (Reichert Ultracut E ultramicrotome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and examined in a transmission electron microscope (Zeiss EM 902, Carl Zeiss AG, Oberkochen Germany). Corresponding to histological evaluation out of these slices one representative cutout with a defined size ($5 \times 5 \mu\text{m}$) was chosen and captured with a slow-scan digital 2 K CCD camera (TRS, Tröndle, Moorenweis, Germany). Then, the contrast of all chosen cutouts was adapted to each other by choosing the same setting of tone histogram (mean value: 1.0; tonal range: 0–255) using a commercial image processing software (Adobe Photoshop CS6 Extended). Finally, these color-corrected cutouts were uploaded by an open source software (ImageJ, Java V.1.8.0_77). Its feature *IMAGE / ADJUST / THRESHOLD* performs an automatic marking of the fibrin fibers and calculates the relation of the marked area to the total image size.

Calculations and statistics

We performed analyses of variance (ANOVA) and post-hoc t-tests to evaluate statistical differences in quantitative weight loss and fibrin fiber density between treatment groups A-E, in order to determine differences for the factors TREATMENT (with or without thrombolysis), MEDICATION (rt-PA or TNK) and ULTRASOUND (none or application of ultrasound).

Calculations and statistics were performed using IBM SPSS statistics (Version 21.0.0.0, IBM, Armonk, New York, U.S.A.)

Results

Dose finding experiments

The weight loss without any thrombolytic treatment was 15.3% after 1 h and 27.7% after 2 h of treatment.

For rt-PA we observed a plateau of weight loss between 40 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 1). Maximum weight loss was 48.6% after 1 h at 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 72.9% after 2 h at a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In accordance with the observed plateau, we used a rt-PA dosage of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all following experiments.

For TNK maximum weight loss was 38.3% after 1 h at a dosage of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 68.1% after 2 h at a dosage of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 2). We used a TNK dosage of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all following experiments.

Quantitative weight loss experiments

The measured values are listed in Table 1 and depicted in Fig. 3. Compared to control group A with a weight loss of $17.3 \pm 7.4\%$ all other groups showed a significantly increased weight loss (each $p < 0.001$).

Additionally, both TNK groups D and E showed significantly increased weight losses in comparison to their respective rt-PA counterparts group B and C. Weight loss in group B was $28.3 \pm 9.6\%$ compared to group D with $34.5 \pm 8\%$ ($p = 0.001$). Weight loss in group C was $31.6 \pm 10\%$ compared to group E with $38.1 \pm 6.7\%$ ($p < 0.001$).

Both groups with additional STL (C and E) had higher mean weight losses than their corresponding groups without STL (B and D). But this effect did not meet statistical significance. Group C had 3.3% more weight loss than group B ($p = 0.23$). Group E had 3.6% more weight loss than group D ($p = 0.16$).

Transmission electron microscopy

For TEM the threshold value for the percentage of area covered by fibrin fibers ranged from a maximum of 58% for the control group to a minimum of 42.3% for TNK alone (TNK with STL: 45.1%) (Fig. 4). Values for rt-PA and rt-PA with STL were 54.7 and 52.9%, respectively. All weight loss and fibrin fiber density values were collected in Table 1. Figure 5 depicts representative cutouts. While these results show a trend fitting to the results of the quantitative weight loss experiments, statistical significance for differences from the control group was only proved for both TNK groups ($p = 0.001$ for TNK and $p = 0.006$ for TNK with STL). Group D (TNK) exhibited the lowest density in fibrin fibers, showing an additional significant difference to groups B ($p = 0.008$) and C ($p = 0.03$).

Discussion

Dose finding experiments

Our experiments were designed to combine maximum effects of the two different thrombolytics and the influence of additional ultrasound application. Therefore, results cannot be transferred directly to clinical situation.

We used rt-PA at a dosage of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This corresponds to about 3.6 mg/kg bodyweight assuming a blood volume of 5000 ml as calculated by the Nadlers formula for a healthy male adult with a body weight of 70 kg and a height of 180 cm. In daily clinical practice, rt-PA is used with a dosage of 0.9 mg/kg bodyweight. TNK was used at a dosage of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ corresponding to approximately 2.1 mg/kg bodyweight. Studies suggest a maximum suitable TNK dosage of 0.4 mg/kg bodyweight [8, 14, 25].

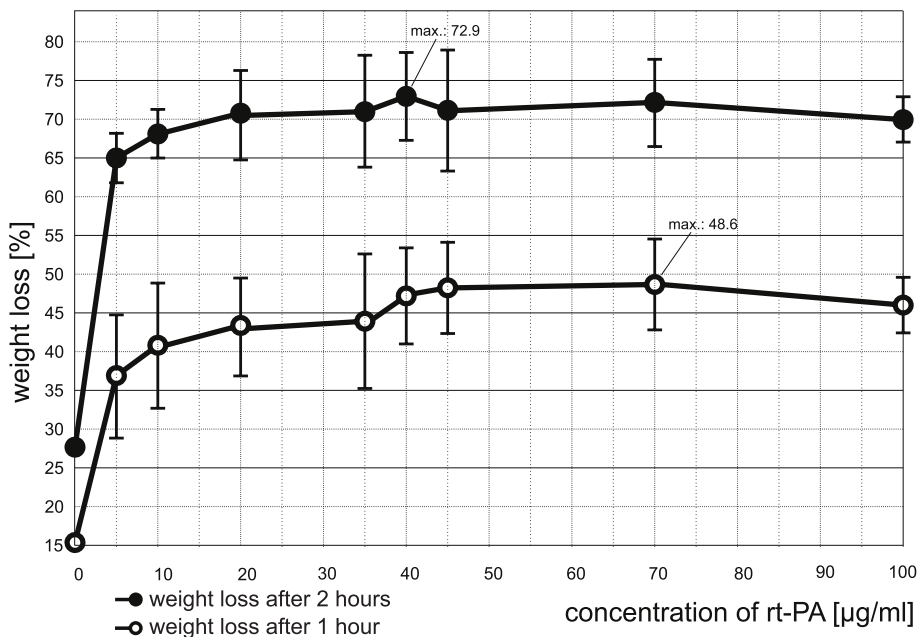


Fig. 1 Results from dose finding experiments with rt-PA: Weight loss measurements after 1 and 2 h of treatment with escalating dosages from 0 to 100 µg/ml rt-PA (n = 10 for every dosage) were performed to determine the maximum effective dosage for rt-PA. Bars reflect the standard deviation (SD) from the mean. For reasons of clarity, we omitted the SD of the control group (SD for 1 h: 5.7%; SD for 2 h: 7.4%)

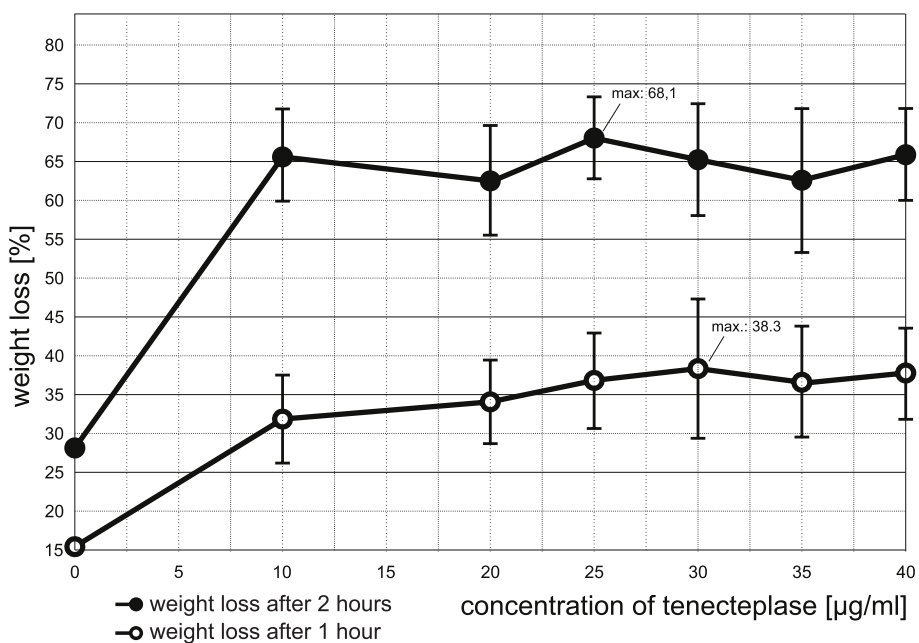


Fig. 2 Results from dose finding experiments with tenecteplase (TNK): Weight loss measurements after 1 and 2 h of treatment with escalating dosages from 0 to 40 µg/ml TNK (n = 10 for every dosage) were performed to determine the maximum effective dosage for TNK. Bars reflect the standard deviation (SD) from the mean. For reasons of clarity, we omitted the SD of the control group (SD for 1 h: 5.7%; SD for 2 h: 7.4%)

Table 1 Values of lysis experiments as depicted in Fig. 3 and TEM experiments as depicted in Fig. 4

	A control	B rt-PA	C rt-PA + US	D TNK	E TNK + US
weight loss \pm SD [%]	17.3 \pm 7.4	28.3 \pm 9.6	31.6 \pm 10	34.5 \pm 8	38.1 \pm 6.7
area covered by fibrin \pm SD [%]	58 \pm 5.2	54.7 \pm 3.6	52.9 \pm 6.5	42.3 \pm 6	45.1 \pm 2.3

Results for measured relative clot weight loss of different treatment groups (A-E) as well as for relative area covered by fibrin in TEM for the different treatment strategies are combined. SD: standard deviation from the mean. TNK: tenecteplase; US: color-coded sonography (2 MHz, 0.179 W/cm²)

Therefore, the administered dosages in our in vitro experiments exceed therapeutic dosages with a factor of 4 for rt-PA and of 5.25 for TNK.

It has to be mentioned that the translation of the used in vitro drug concentration to drug dosages given in clinical settings by the Nadlers formula is only a rough estimation that disregards all pharmacological and pharmacokinetic differences between the in vitro and the in vivo set up. The validity of our study cannot be derived from this.

There are hardly any references about in vivo concentrations for rt-PA or TNK in blood after their application in clinical settings. We found one study performed on patients with acute myocardial infarction, showing rt-PA concentration to be at about 3 μ g/ml at the steady state after intravenous administration [26]. However, in this study, different dosages of rt-PA were used and sample size was only 4. These results can hardly be transferred to clinical settings of patients with acute ischemic strokes. It is a widespread approach to compare the effect of different drugs in vitro in the range of their

saturation point to avoid concentration-dependent effects and underestimation. That is what we did in our study. For rt-PA, we found the same saturation value as Holland et al. [24].

Animal experiments and clinical studies are needed to determine a suitable dosage for both thrombolytics regarding safety and efficacy.

Quantitative weight loss experiments

All treatment groups showed a significantly increased weight loss in comparison to the control group.

In our in vitro experiments, TNK is significantly more effective than rt-PA even if both drugs are used with an additional application of ultrasound. Appropriately, first clinical studies point out that TNK is associated with significantly better reperfusion and clinical outcomes than rt-PA in patients with acute ischemic stroke [7, 11]. This might result from TNKs higher specificity to fibrin.

A statistically significant effect of ultrasound cannot be demonstrated, even though both US groups exhibited more weight loss than their counterpart without US did.

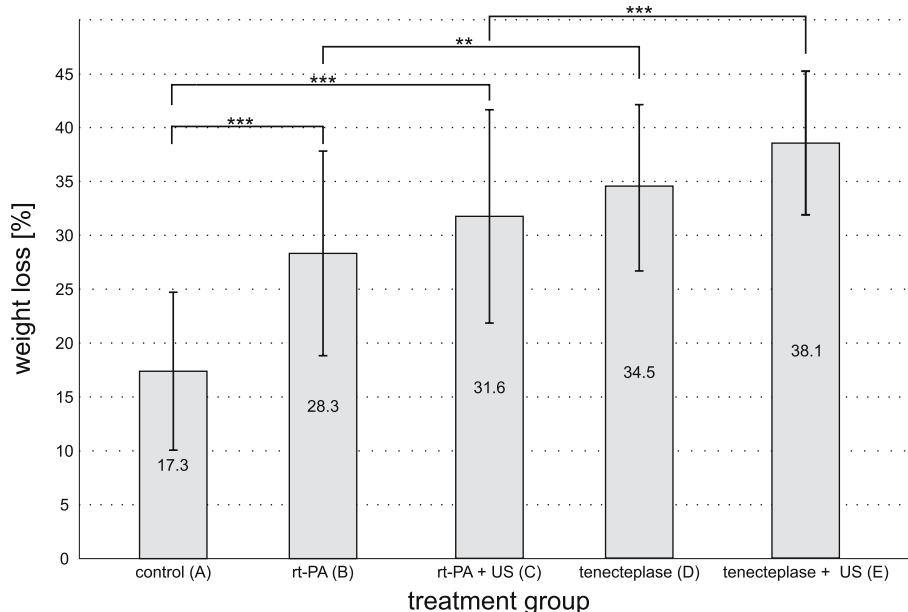


Fig. 3 Results from quantitative weight loss experiments. Clot weight loss after 1 h in 5 different treatment groups (each $n = 60$). Group A acted as the control (clots treated only with buffered plasma). Groups B and C were treated with rt-PA (50 μ g/ml), groups D and E with TNK (30 μ g/ml). Groups C and E additionally received ultrasound application (2 MHz, 179 W/cm²). Values are depicted as mean relative weight loss with standard deviation from the mean. Values can be looked up in Table 1. *** $p < 0.001$, ** $p = 0.001$

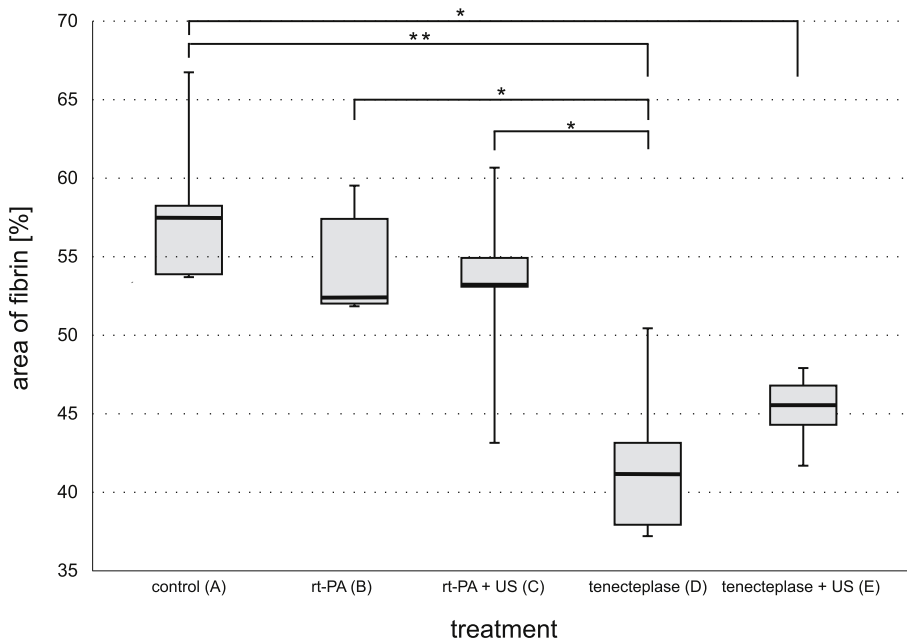


Fig. 4 Boxplot for percentage of area covered by fibrin. Semi quantitative analysis was performed on the 5 treatment groups (each $n = 5$) and depicted with representative TEM cutouts. The duration of the treatment was 1 h for each treatment. Values can be looked up in Table 1. * $p < 0.05$, ** $p = 0.001$

This finding is in line with other in vitro studies and reflects the heterogeneous picture drawn by recent clinical trials and meta-analyses. Several in vitro studies found significantly increased lysis rates after the addition of ultrasound to rt-PA treatment [24, 27], whereas other in vitro studies showed no significant effect [21, 22, 28].

Clinical studies revealed significantly increased recanalization rates, but failed in proving significantly increased recovery from stroke [16, 17]. Only a subgroup analysis of the CLOTBUST trial (patients with pre-treatment NIHSS scores ≥ 10 points and proximal intracranial occlusions) showed a significantly increased number of

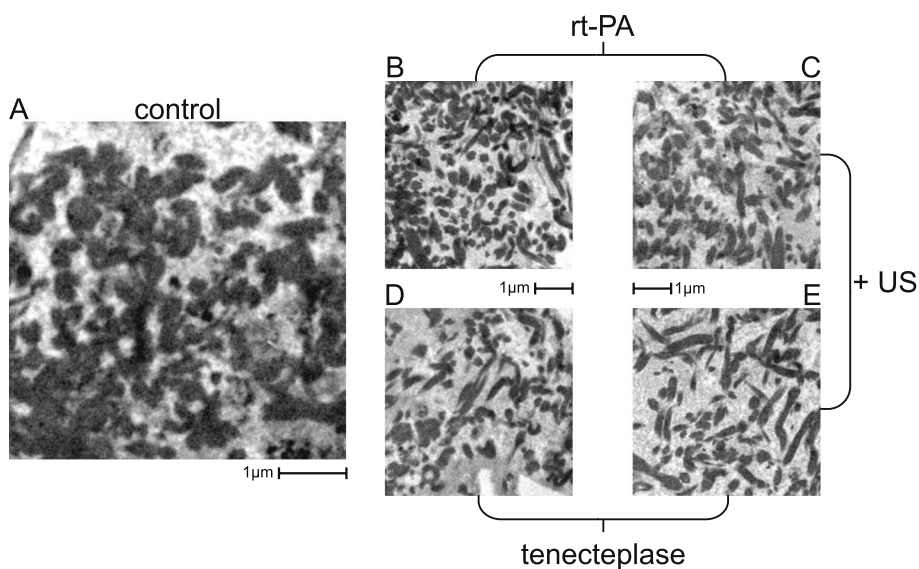


Fig. 5 TEM cutouts. Examples of TEM cutouts used for semi quantitative analysis. Treatment group: **a** control group (solely buffered plasma (pH = 7.4). **b** rt-PA (50 $\mu\text{g/ml}$ in buffered plasma). **c** rt-PA (50 $\mu\text{g/ml}$ in buffered plasma) with additional US. **d** TNK (30 $\mu\text{g/ml}$ in buffered plasma). **e** TNK (30 $\mu\text{g/ml}$ in buffered plasma) with additional US. US: 2.0 to 2.5 MHz transcranial color-coded ultrasound (spatial-peak temporal-average intensity: 0,179 W/cm^2 ; mechanical index = 0.6)

sustained complete recanalization and of functional independence at 90 days in the sonothrombolysis group [29]. The Cochrane Stroke Group identified five eligible studies with a total of 223 patients and found that failure to recanalize was lower without clear hazard in the sonothrombolysis group and patients treated with ultrasound and rt-PA were less likely to be dead or disabled at three months [30]. According to a meta-analysis of 10 phase II trials, patients with visible intracranial occlusion treated with sonothrombolysis ($n = 345$) have more than two-fold higher likelihood of achieving both complete recanalization at 2 h and favorable functional outcome ($mRS \leq 2$) at three months compared to patients not receiving sonothrombolysis ($n = 275$) [31]. The major limitations of the pooled trials are small sample sizes and no double blindness in randomization and clinical follow-up. The CLOTBUST-ER trial, a double-blind, multicenter, phase III, randomized controlled trial that aimed to investigate efficacy and safety of sonothrombolysis (2 h of 2 MHz pulsed-wave ultrasound) vs rt-PA alone in patients with acute ischemic stroke with NIHSS-scores of 10 or higher, showed that sonothrombolysis is safe but does not improve functional outcome at 90 days compared to rt-PA alone [32]. Results might be affected by three main factors: First, documentation of proximal intracranial occlusion was not required. Second, the operator-independent ultrasound device might have provided less efficient ultrasound exposure. Third, the trial was stopped early because of futility leading to incomplete data concerning functional outcome at 90 days. Accordingly, a new sonothrombolysis trial (TRUST; NCT03519737) has been initiated. This trial investigates recanalization rates before thrombectomy on patients with large-vessel occlusions being transferred from primary to secondary stroke centres randomized to either ultrasound or no ultrasound using an optimized device.

Papadopoulos et al. performed an in vitro experiment that is very similar to ours [33]. In accordance with our results thrombolysis increased with increasing concentration of TNK, which was more effective than thrombolysis in untreated clots or in clots solely treated with ultrasound. The additional application of ultrasound encouraged the thrombolytic efficacy of TNK. This finding substantiates the assumption that ultrasound increases the penetration and binding affinity of thrombolytic drugs due to reversible disaggregation of fibrin fibers by mechanical fragmentation. Ultrasound alone has no meaningful thrombolytic effect. In contrast to our results, in the experiments of Papadopoulos et al. clots treated with TNK and additional ultrasound exhibited a significant greater thrombolysis degree of 25% compared with clots treated with TNK alone. This could be explained by the following differences of the experimental approach:

- 1) Papadopoulos et al. generated clots by natural coagulation of fresh porcine blood. These clots are very soft and less resistant to thrombolysis especially under flow conditions [34]. Thus, spontaneous lysis of the whole blood clots was about 30% after 30 min. This basically corresponds to the lysis rate of our PRP-clots after two hours. Due to our own experiences, whole blood clots are not suitable for thrombolysis experiments [21].
- 2) Papadopoulos et al. used a totally different ultrasound setting. The middle frequency of their ultrasound probe was 1 MHz. The bandwidth of our phased-array ultrasound transducer was 2.0 to 2.5 MHz. We used a spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA}) of 0,179 W/cm² and a mechanical index of 0.6. Papadopoulos et al. indicate an acoustic power of 20 W sent to the transducer's surface. It is important to note, that the upper approved limit for diagnostic purposes is 0.72 W/cm². This suggests a markedly lower energy transmission in our experiments derived from commonly used transcranial diagnostic imaging systems in a clinical setting.

Finally, a comparison of the numerical values of the gained results is hampered by the fact, that there are many other differences concerning the experimental setup and the number of conducted experiments for each group (Papadopoulos et al.: $n = 5$; present investigation: $n = 60$).

Transmission electron microscopy

Corresponding to the quantitative weight loss experiments we demonstrated a loosening of the fibrin network by TEM imaging. Both rt-PA groups did not differ significantly from the control and in contrast to our weight loss experiments fibrin networks showed more loosening for TNK than for TNK combined with ultrasound. Both findings are likely to be due to the small sample size of 5 for each treatment group. We assume that acoustic streaming leads to increased enzymatic fibrinolysis when thrombolytic agents are combined with ultrasound [35, 36]. Evidence suggests that ultrasound reduces clot density by disrupting cross-linked fibrin fibers [37]. This process – although reversible and of short duration – allows fibrinolytic agents to penetrate into the clot more effectively because of an increased contact surface and therefore additional binding sites. The resulting rarefaction of the fibrin mesh is irreversible. [37]. This mechanism should be more effective for drugs with an increased specificity to fibrin such as TNK. For a better observation of the rarefaction of fibrin meshes, we decided to generate clots without boundary layer to prevent that red blood cells conceal

the fibrin mesh. Therefore, we are not able to confirm observations made by Auboire et al. that the main impact of ultrasound is the removal of red blood cells from the clot [38]. Also Petit et al. found that ultrasound alone induces only clot hemolysis without degrading the fibrin network [39]. Presumably, the thrombolytic effect of ultrasound comprises both mechanisms.

Our results confirm that the TEM can be effectively used as an additional method of assessing thrombolysis quality. We are confident that further analyses with larger sample sizes and more optimized selection can enhance the validity of this procedure and provide deeper insights into the mode of action of thrombolysis.

Limitations of our experimental setup

Investigations of different lysis strategies require a standardized experimental setup. Otherwise, lysis rates of different treatment strategies cannot be compared, which is counterproductive to progress in research and therapy. On the other hand, reproducible in vitro experiments suffer from inevitable limitations in comparison to in vivo therapy. In the case of our model, we must point out the following disadvantages:

- 1) To prevent further clotting during experimentation we used blood plasma as a blood substitute, nevertheless all blood components that are necessary for performing valid thrombolysis experiments are contained in the experimental setup.
- 2) Our static model does not factor in the mechanical impact of physiological blood flow on thrombolysis. This however, enables reproducible analysis of enzymatic thrombolysis.
- 3) In clinical settings of transcranial sonography ultrasound becomes attenuated on its way through the skull and brain tissue. In the present model the attenuation is smaller leading to a higher energy of the insonated ultrasound and therefore to an overestimated thrombolytic effect of the ultrasound. However, we found no statistically significant effect of ultrasound. Therefore, our results may not be strongly falsified.
- 4) The model cannot consider the complex interaction between clot and endothelium of the sealed vessel nor the mutual influences between coagulation, fibrinolysis, and inflammatory processes. Not much is known about these interactions [40]. Probably vessel occlusion leads to immediate activation of the inflammatory cascade, especially in ischemic areas that are completely occluded and therefore hypoxic, with activation of the complement system, blood platelets and endothelial cells [41]. However, the whole immunological response extends over a

time period of weeks [42]. Therefore, simplifications of our model concerning this field are acceptable, because our experiments are centered around acute treatment of stroke.

- 5) No in vitro clot formation protocol will ever reflect the natural process of in vivo clotting in detail. Our results just apply to PRP-clots. However, previous publications conducted by our workgroup showed that PRP-clots are histologically similar to ex vivo clots gained from patients who underwent thrombectomy [21].
- 6) The initial mass of the analyzed clot types vary considerably. Throughout our experiments, heavier clots with a greater surface show higher lysis rates probably because of their increased contact surface with the surrounding fluid. Therefore, all data are calculated as relative measures to reduce this source of error.
- 7) The dosages of thrombolytics we used exceed clinically used dosages by a factor of 4 and 5.25, respectively. As we looked for a plateau of the lysis effect in our dose finding, we are confident that both treatments could unfold their full thrombolytic potential on the one hand without overestimating their efficacy on the other hand. However, our experiments cannot factor in any side effects of treatment, like intracranial hemorrhage.
- 8) Because of the different half-lives of rt-PA and TNK, the solution of buffered plasma and rt-PA was renewed every 15 min during the lysis experiments. In contrast, the solutions of TNK were kept the same during the whole treatment. Finally, this is also only an approximation.
- 9) The semi-quantitative analysis of the area of fibrin in the TEM images is based on a small sample number. Furthermore, image selection and data processing can potentially skew results. TEM experiments with a larger sample size would further solidify the validity of this particular method for evaluating the quality of thrombolysis.

Despite all these limitations and the restricted transferability of our results to patient treatment an increased thrombolytic potential of TNK compared to rt-PA can be derived from our experiments.

Conclusions

In our experimental setup TNK is more effective than rt-PA both with and without ultrasound as measured by relative weight loss of the clots. Measured by fibrin fiber density in TEM imaging efficacy of TNK alone is also higher than that of rt-PA alone or in combination with ultrasound. Our standardized experiments confirm the hypothesis of TNK being a more potent alternative to rt-

PA due to its increased specificity to fibrin. In contrast, ultrasound causes neither significantly increased weight loss nor reduction of fibrin fiber density in TEM imaging. Future studies should focus on improved ultrasound settings. TEM imaging provides deeper insights into the mode of action of (sono)thrombolysis.

Abbreviations

CT: Computed tomography; mRS: modified Ranking scale; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; PFP: Platelet free plasma; PRP: Platelet rich plasma; RCT: Randomized controlled trial; rt-PA: Recombinant tissue plasminogen activator (alteplase); sICH: Symptomatic intracerebral hemorrhage; STL: Sonothrombolysis; TCCS: Transcranial color-coded mode; TEM: Transmission electron microscopy; TIA: Transient ischemic attack; TNK: Tenecteplase; US: Ultrasound

Acknowledgements

We are grateful to Stefanie Ruhrig-French and Petra Dietz-Ruckstuhl for critical reading of the manuscript. We thank Helge Hudel from the Institute of Medical Statistics and Informatics of the Justus-Liebig-University Gießen for his support in statistical affairs. Finally, the authors thank the Department of Transfusion Medicine at the UKGM Clinic in Giessen (Prof. Dr. G. Bein) for allocating blood and all blood donors for their attendance in support of our scientific efforts.

Authors' contributions

TF carried out all experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the article together with FR. UG performed all electron microscopy images. NS assisted TF in doing the experiments. J-HM supported our group in all hemostasiological affairs. CG supported data analysis. FR organized the laboratory, conceived the experimental design, built up the static model, analyzed and interpreted the data, and wrote the article together with TF. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Boehringer Ingelheim provided tenecteplase used in our experiments. Otherwise, this research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

The datasets that were used for the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee of Justus-Liebig Universität Gießen approved the protocol of this study (reference number: 206/14). Participants provided their written informed consent for participation.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Neurology, Justus-Liebig-University Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany. ²Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University Gießen, Aulweg 123, 35392 Gießen, Germany. ³Oncology Practice Am Marien-Krankenhaus, Parade 5, 23552 Lübeck, Germany. ⁴Department of Neuroradiology, Justus-Liebig-University Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany. ⁵Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Standort Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany.

Received: 27 December 2018 Accepted: 18 July 2019

Published online: 02 August 2019

References

- Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke

- Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018; <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>.
- Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2005. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000171066.25248.1d>.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>.
- Ma H, Parsons MW, Christensen S, Campbell BC, Churilov L, et al. A multicentre, randomized, double-blinded, placebo-controlled Phase III study to investigate Extending the time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits (EXTEND). *Int J Stroke*. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2011.00730.x>.
- Nasr DM, Brinjikji W, Cloft HJ, Rabinstein AA. Utilization of intravenous thrombolysis increasing in the United States. *Int J Stroke*. 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00844.x>.
- Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;2018. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000158>.
- Campbell BCV, Mitchell PJ, Churilov L, Yassi N, Kleinig TJ et al. Tenecteplase versus alteplase before thrombectomy for ischemic stroke. *N Engl J Med* 2018; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716405>.
- Logallo N, Kvistad CE, Thomassen L. Therapeutic potential of tenecteplase in the management of acute ischemic stroke. *CNS Drugs*. 2015. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0280-9>.
- Tanswell P, Modi N, Combs D, Danays T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction. *Clin Pharmacokinet*. 2002. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241150-00001>.
- Bell WR. Present-day thrombolytic therapy: therapeutic agents-pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3:534-44.
- Parsons M, Spratt N, Bivard A, Campbell B, Chung K, et al. A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2012. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109842>.
- Haley EC Jr, Thompson JL, Grotta JC, Lyden PD, Hemmen TG et al; Tenecteplase in Stroke Investigators Phase IIB/III trial of tenecteplase in acute ischemic stroke: results of a prematurely terminated randomized clinical trial. *Stroke* 2010; <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572040>.
- Huang X, Cheripelli BK, Lloyd SM, Kalladka D, Moreton FC, et al. Alteplase versus tenecteplase for thrombolysis after ischaemic stroke (ATTEST): a phase 2, randomised, open-label, blinded endpoint study. *Lancet Neurol*. 2015. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70017-7).
- Logallo N, Novotny V, Assmus J, Kvistad CE, Altheheld L, et al. Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *Lancet Neurol*. 2017. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30253-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30253-3).
- Coutts SB, Berge E, Campbell BC, Muir KW, Parsons MW. Tenecteplase for the treatment of acute ischemic stroke: a review of completed and ongoing randomized controlled trials. *Int J Stroke*. 2018. <https://doi.org/10.1177/1747493018790024>.
- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041175>.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. 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*. 2008. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.503870>.
- Sakharov DV, Barrert-Bergshoeff M, Hekkenberg RT, Rijken DC. Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro. *Thromb Haemost*. 1999;81(4):605-12.
- Meairs S, Alonso A, Hennerici MG. Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke*. 2012. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.636332>.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, et al. 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*. 2005. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000170707.86793.1a>.

21. Roessler FC, Teichert A, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, et al. Development of a new clot formation protocol for standardized in vitro investigations of sonothrombolysis. *J Neurosci Methods*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.025>.
22. Roessler FC, Wang Z, Schumacher S, Ohlrich M, Kaps M, et al. In vitro examination of the thrombolytic efficacy of desmoteplase and therapeutic ultrasound compared with rt-PA. *Ultrasound Med Biol*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2015.07.007>.
23. Roessler FC, Schumacher S, Sprenger A, Gärtner U, Al-Khaled M, et al. Clot formation in the presence of acetylsalicylic acid leads to increased lysis rates regardless of the chosen thrombolysis strategy. *J Vasc Res*. 2016. <https://doi.org/10.1159/000449386>.
24. Holland CK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ. Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res*. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.07.006>.
25. Haley EC Jr, Lyden PD, Johnston KC, Hemmen TM; TNK in Stroke Investigators. A pilot dose-escalation safety study of tenecteplase in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2005; <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000154872.73240.e9>.
26. Tanswell P, Tebbe U, Neuhaus K-L, Gläse-Schwarz L, Wojcik J, Seifried E. Pharmacokinetics and fibrin specificity of alteplase during accelerated infusions in acute myocardial infarction. *IACC*. 1992;19(5):1071–5.
27. Eggers J, Ossadnik S, Seidel G. Enhanced clot dissolution in vitro by 1.8-MHz pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2009; <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.09.009>.
28. Hitchcock KE, Ivancevich NM, Haworth KJ, Caudell Stamper DN, Vela DC, et al. Ultrasound-enhanced rt-PA thrombolysis in an ex vivo porcine carotid artery model. *Ultrasound Med Biol*. 2011;37(8):1240–51.
29. Barlinn K, Tsvigoulis G, Barreto AD, Alleman J, Molina CA, et al. Outcomes following sonothrombolysis in severe acute ischemic stroke: subgroup analysis of the CLOTBUST trial. *Int J Stroke*. 2014. <https://doi.org/10.1111/ijvs.12340>.
30. Ricci S, Dinia L, Del Sette M, Anzola P, Mazzoli T, et al. Sonothrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008348.pub3>.
31. Saqqur M, Tsvigoulis G, Nicoli F, Skoloudik D, Sharma VK, et al. 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*. 2014. <https://doi.org/10.1111/jon.12026>.
32. Alexandrov AV, Köhrmann M, Soinne L, Tsvigoulis G, Barreto AD, et al. CLOTBUST-ER trial investigators. Safety and efficacy of sonothrombolysis for acute ischaemic stroke: a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2019;18(4):338–47. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30026-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30026-2).
33. Papadopoulos N, Damianou C. In vitro evaluation of focused ultrasound-enhanced TNK-tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.051>.
34. Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Sprenger A, et al. The platelet-rich plasma clot: a standardized in-vitro clot formation protocol for investigations of sonothrombolysis under physiological flows. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3283468a60>.
35. Braaten JV, Goss RA, Francis CW. Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *ThrombHaemost*. 1997;78(3):1063–8.
36. Masomi-Bornwasser J, Winter P, Müller-Werkmeister H, Strand S, König J et al. Combination of ultrasound and rtPA enhances fibrinolysis in an in vitro clot system. *PLoS One* 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188131>. eCollection 2017.
37. Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol*. 1995;21(3):419–24.
38. Auboire L, Tranquart F, Ossant F, Sennoga C, Bouakaz A. Impact of sonothrombolysis on in vitro blood clot: pictographic validation with electron microscopy. *Ultraschall Med*. 2017. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1553322>.
39. Petit B, Bohren Y, Gaud E, Bussat P, Arditi M, et al. Sonothrombolysis: the contribution of stable and inertial cavitation to clot lysis. *Ultrasound Med Biol*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.12.007>.
40. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>.
41. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, et al. Thromboinflammation in stroke brain damage. *Stroke*. 2016. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011238>.
42. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and stroke: an overview. *Neurotherapeutics*. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Clot Formation in the Presence of Acetylsalicylic Acid Leads to Increased Lysis Rates Regardless of the Chosen Thrombolysis Strategy

Florian C. Roessler^a Sabrina Schumacher^c Andreas Sprenger^d Ulrich Gärtner^b
Mohamed Al-Khaled^c Jürgen Eggers^e

^aDepartment of Neurology and ^bInstitute of Anatomy and Cell Biology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Departments of ^cNeurology and ^dPsychology, University Hospital of Schleswig-Holstein, and ^eDepartment of Neurology, Sana Kliniken Lübeck GmbH, Lübeck, Germany

Key Words

Stroke · Acetylsalicylic acid · Thrombolysis · Ultrasound · Fibrin network · Scanning electron microscopy

Abstract

Background: Patients with acute ischemic strokes frequently take an acetylsalicylic acid (ASA) premedication. We determined the impact of ASA on different thrombolysis strategies in vitro. **Methods:** For two clot types made from platelet-rich plasma (one with and one without ASA) lysis rates were measured by weight loss after 1 h for five different groups: in control group A clots were solely placed in plasma; in groups B and C clots were treated with rt-PA (60 kU/ml), and in groups D and E clots were treated with desmoteplase (DSPA; 2 µg/ml). Ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²) was included in groups C and E. The fibrin mesh structures of the clots were investigated by electron microscopy. **Results:** For both clot types lysis rates increased significantly for all treatment strategies compared to their control group (each $p < 0.001$). The addition of ASA significantly increased the lysis rate in all 5 groups (each $p < 0.001$) and led to a ceiling effect concerning the treatment. A semiquantitative analysis of transmission electron micrographs revealed a decreased fibrin density for clots with ASA. For both clot types

DSPA and ultrasound led to a significant dissolution of the fibrin mesh (both $p = 0.029$). **Conclusions:** In vitro ASA pre-treatment leads to significantly increased lysis rates due to a weaker fibrin mesh in platelet-rich plasma clots.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

Acute ischemic stroke (AIS) is the fourth most frequent cause of mortality and a leading cause of permanent disability in developed countries [1]. In the USA, 87% of all stroke patients suffer from AIS [2]. The therapy of thromboembolic AIS focuses on limiting the severity of ischemic injury by early recanalization of the occluded vessels [3]. To date, intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) at 0.9 mg/kg administered within 4.5 h after the onset of stroke is the only FDA-approved treatment [4, 5].

Desmoteplase (DSPA) is one of the plasminogen activators that selectively activate fibrin-bound plasminogen. DSPA has unique characteristics when compared to rt-PA. These include its high specificity for fibrin-bound plasminogen, its ineffectiveness in the presence of fibrinogen that avoids extensive plasminogen activation and

therefore systemic bleedings [6], its lack of neurotoxicity, and its long half-life of approximately about 3 h caused by its relative PAI-1 resistance that enables a single bolus application [7].

The local application of diagnostic ultrasound accelerates the recanalization of vessels when it is applied together with a systemic thrombolytic treatment [8–10]. Depending on the energy and frequency, ultrasound increases the penetration and binding affinity of thrombolytic drugs due to reversible disaggregation of fibrin fibers by mechanical fragmentation, or by cavitation [11]. Due to its local application ultrasound does not have any systemic adverse reactions such as bleeding. As the only requirement, the occluded vessel has to be depicted using ultrasound imaging to ensure sufficient application of the administered ultrasound energy. Furthermore, ultrasound parameters need to be adjusted to diagnostic settings to avoid symptomatic intracerebral hemorrhage [9, 12].

Secondary prevention of cerebral ischemic strokes and other cardiovascular events is dominated by the regulation of modifiable risk factors and, in the case of arteriosclerosis, by antiplatelets (AP). Within the AP group, acetylsalicylic acid (ASA) is still the gold standard with a well-proven effectiveness [13]. ASA is not efficient for the primary prophylaxis of stroke. However, due to the high prevalence of cardiovascular and cerebrovascular diseases in industrialized countries, many patients suffering from AIS have an ASA premedication. In different studies performed within 2008 and 2013, 21.6–33.6% of AIS patients were pretreated with ASA [14–17]. In the current guidelines of the American Heart Association and of the European Stroke Organisation, AP pretreatment is not a contraindication for rt-PA treatment [18, 19].

Some clinical studies have already shown that prior use of AP therapy is associated with a more favorable outcome [14, 20] in patients suffering from AIS treated with rt-PA. However, inconsistent results were found concerning the rate of early vessel recanalization in those patients [15, 16]. Apart from these clinical observations it is known from several experiments that ASA alters the structure of *in vitro*-generated clots [21–23]. However, in these *in vitro* experiments the effect of ASA was not investigated in combination with thrombolysis.

Considering the importance of ASA in preventing and of thrombolysis in treating AIS, the aim of this *in vitro* study was to investigate the impact of ASA premedication on the effect of different thrombolysis strategies in a standardized experimental setting, and to examine whether there is a mechanism that might serve as a link between *in vitro* findings concerning the effect of ASA on clot

structure and reported clinical results concerning the impact of rt-PA in ASA-pretreated patients. Thrombolysis was performed using either rt-PA or DSPA, each with or without the additional application of therapeutic ultrasound.

Methods

Clot Preparation

The clot formation protocol used attaches great importance to the role of platelets in the clotting process. It provides clots that show sufficient stability under physiological flow on the one hand, and on the other hand suitable lysis rates, and leads to clots that histologically resemble those *in vivo* [24]. Two types of clots were made: one clot type contained ASA (ASA-clots) and the other did not (no-ASA-clots).

For both clot types human venous blood was drawn into citrate tubes (S-Monovette®, 02.1067.001; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) from different healthy donors who had not taken anticoagulants or antithrombotic medications during the previous 2 weeks. Blood with the same blood group was pooled to avoid individual differences concerning the blood consistency and its quality of clotting. Then, only for ASA-clots, ASA was added in a final concentration of 0.05 mg/ml.

The remaining clot preparation procedure was again identical for both clot types. The pooled blood was divided into two parts. The first part was centrifuged at 180 g for 10 min (Multifuge® 1S-R; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany). Platelet-rich plasma (PRP) was removed by aspiration of the supernatant just like a boundary layer, which had formed between the supernatant and the erythrocyte layer.

The second part of the pooled blood served for the preparation of platelet-free plasma (PFP) by aspirating the supernatant after centrifugation at 2,570 g for 10 min (EBA 8s; Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany).

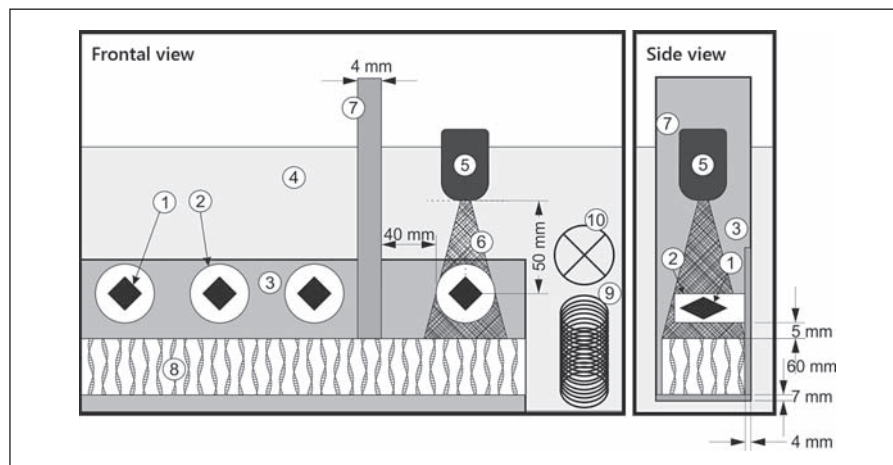
For both clot types, 1.5 ml of PRP, 2.0 ml of PFP, and 0.5 ml of boundary layer were mixed. Thereby, with regard to the blood cell count of the original whole blood, the white and red cell counts were reduced significantly in contrast to the platelet count [24]. Finally, clot formation of the gained mixture was initiated by the addition of CaCl₂ to a final concentration of 13.8 mmol/l, and incubation at 37°C for 1 h in plastic tubes (55.468.001; Sarstedt).

The cylindrical clots (diameter 4–5 mm) were cut to an average weight of 250 ± 150 mg and stored in plastic tubes with a blood substitute (Ringer solution; Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Germany) at 37°C overnight to ensure complete clot retraction. Blood sampling was approved by the ethics committee of the University of Lübeck and was performed at the local Department of Transfusion Medicine within the blood donation program. All donors provided informed consent.

Static Model

A static model was generated (fig. 1). Clots were stored in Eppendorf™ pipettes (72.690.001; Sarstedt) fully surrounded by fluid. The pipettes were fixed in a custom-built holder made of plastic (polyoxymethylene) standing in a tank filled with degassed water. The water was maintained at 37°C using a temperature-controlled

Fig. 1. Experimental setup. Clots (1) were placed within pipettes (2) that were fixed in a custom-built holder made of polyoxymethylene (3); also represented are: degassed water (4), ultrasound device (5), applied ultrasound (6), baffles made of polyoxymethylene (7), ultrasound absorber (8), temperature-controlled heater (9), and circulation pump (10). Clots treated with ultrasound were fixed 50 mm perpendiculary underneath the transducer face. They were located exactly within the sample volume of the pulsed wave ultrasound.



heater (Julabo ED v.2 class 1; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany). Heat accumulation was prevented by a pump circulating the water. Clots that were intended to be exposed to a continuous 2-MHz pulsed wave ultrasound with an intensity of 0.179 W/cm^2 (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Andover, Mass., USA) were fixed 50 mm perpendiculary underneath the transducer face. The remaining clots were separated by baffles to ensure that lysis was unaffected by ultrasound. The sound absorber consisted of foamed plastic (SH002; aixFOAM, Eschweiler, Germany).

Lysis Measurement

For each of the two clot types (one with and one without ASA), five different treatment groups were defined. In control group A the clots were solely treated with buffered PFP (pH = 7.4). In groups B and C the clots were treated with a solution of buffered PFP and rt-PA (final rt-PA concentration was 0.1 mg/ml corresponding to 60 kU/ml); in group C ultrasound was additionally applied. In groups D and E the clots were stored in a solution of buffered PFP and DSPA (final concentration of $2.0 \text{ }\mu\text{g/ml}$); in group E ultrasound was additionally insonated as was used in group C. It was already known that the doses of rt-PA and DSPA used lead to the saturation of lysis rates in vitro [25, 26].

For the lysis experiments PFP was harvested in the same way as it was gained for blood clot preparation. ASA was not added. Rt-PA has a short half-life of approximately 4–9 min [27] caused by a very rapid inhibition by PAI-1 [28]. Therefore, in groups B and C, the solution of buffered plasma and rt-PA was renewed every 15 min over a period of 1 h of exposure. Solutions of the DSPA groups D and E were kept the same because DSPA has a relative PAI-1 resistance that leads to a terminal plasma half-life of approximately 3 h [7, 29]. This proceeding corresponds to clinical practice, where the mean part of the applied rt-PA has to be perfused continuously, whereas DSPA can be applied as a single intravenous bolus. Clot weight was measured using an analytical balance (Kern 770; Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany) before and after 1 h of treatment to determine the percent mass loss.

Therapeutic Ultrasound Exposure

The clots of groups C and E were exposed to pulsed ultrasound for 1 h using a clinical ultrasound system (Sonos 2500; Hewlett-

Packard, Andover, Mass., USA) in the 2-MHz pulsed wave color-coded mode, which is used in our clinic for routine transcranial diagnostic imaging. The transmit power and antialiasing threshold was set to 100% and 0.25 m/s, respectively. According to the manufacturer, the spatial-peak temporal-average intensity (ISPTA) at that setting was 0.179 W/cm^2 . The bandwidth of the phased-array ultrasound transducer employed was 2.0–2.5 MHz (21202A; Hewlett-Packard). The ultrasound probe was immersed in a degassed water bath and positioned 50 mm from the surface of the clot, as depicted in the experimental setup shown in figure 1. The clots were located within the pulsed Doppler 'sample volume' or focal volume of the ultrasound beam. The mechanical index (MI on-screen) was 0.6.

Electron Microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), the clots were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% formaldehyde in 0.15 M HEPES buffer solution and afterwards dissected. Samples were postfixed in 1% osmium tetroxide (Merck, Darmstadt, Germany), washed in distilled water, dehydrated in ascending grades of ethanol, and critical point dried by CO_2 treatment. After mounting, specimens were sputtered with gold and examined using a scanning electron microscope (Philips/FEI XL30 Deutschland GmbH). For this investigation the clots were generated without the boundary layer that mainly contains erythrocytes in order to view details of the fibrin mesh.

For transmission electron microscopy (TEM), clots were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% formaldehyde in 0.15 M HEPES buffer solution, postfixed in 1% osmium tetroxide in aqua bidest, stained in half-saturated watery uranyl acetate (Merck), dehydrated in an ascending ethanol series, and finally embedded in Agar 100 resin (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK). Ultrathin sections were cut using an ultramicrotome (Reichert Ultracut E, Leica) and examined in a transmission electron microscope (Zeiss EM 902). Digital images were captured with a slow-scan 2K CCD camera (TRS; Tröndle, Moorenweis, Germany). Semiquantitative assessment of the density of fibrin fibers was performed by determining the area percentage of fibrin with ImageJ software [30].

Table 1. Values of the lysis experiments (as depicted in figure 2)

	Mean, %	Standard deviation of mean, %	Standard error of mean, %	n
Clots without ASA				
A: no treatment	18.18	5.89	0.94	40
B: rt-PA	26.54	7.82	1.25	40
C: rt-PA + US	28.63	6.61	1.06	40
D: DSPA	30.45	5.95	0.95	40
E: DSPA + US	32.75	7.16	1.15	40
Clots with ASA				
A: no treatment	24.37	10.05	1.55	42
B: rt-PA	40.76	11.21	1.36	68
C: rt-PA + US	40.40	11.87	2.17	30
D: DSPA	40.85	8.60	1.04	68
E: DSPA + US	43.02	7.52	1.37	30

The data relate to the relative clot weight loss of the different lysis groups (A–E) for clots made with or without ASA. Data for the weight loss of clots generated without ASA application were published previously [25]. US = Color-coded sonography (2 MHz, 0.179 W/cm², MI 0.6).

Calculations and Statistics

For the quantitative analysis of the clot weight loss, analysis of variance (ANOVA) and post hoc t tests were performed to determine the statistical significance between the factors CLOTTYPE (clot formation with or without ASA), TREATMENT (no or admitted thrombolysis), MEDICATION (DSPA or rt-PA), and ULTRASOUND (no or present application of ultrasound) with regards to the lysis rates.

Due to the small number of data sets and lack of normal distribution, for the semiquantitative analysis of the percentage area of fibrin in the TEM images a nonparametric ANOVA for independent samples was chosen (Kruskal-Wallis test) followed by nonparametric post hoc group comparisons (Wilcoxon rank sum tests).

All analyses and statistics were performed using IBM SPSS Statistics (version 21.0.0.1; IBM, Armonk, N.Y., USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

The addition of ASA to blood at the beginning of the clot formation protocol significantly increased the weight loss for all types of treatment (table 1) compared to clots that were generated without the application of ASA. A main effect was found for CLOTTYPE ($F(1, 423) = 149.6$, $p < 0.001$) and for TREATMENT ($F(4, 423) = 45.0$, $p < 0.001$) with a significant interaction between CLOTTYPE and TREATMENT ($F(4, 423) = 2.5$, $p = 0.044$). Even in

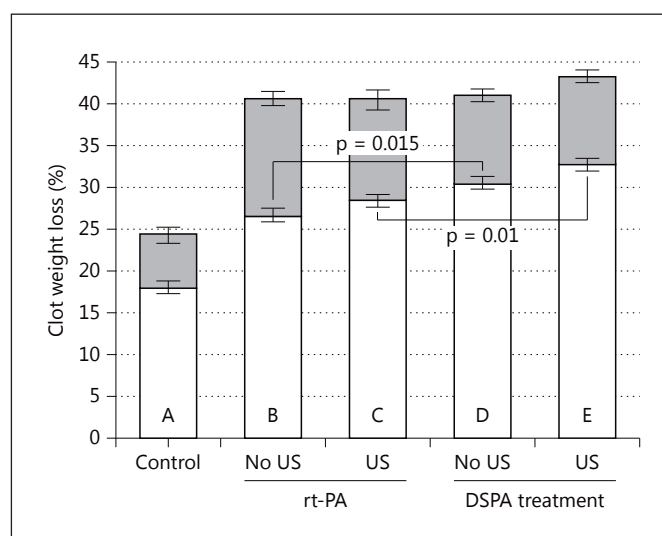


Fig. 2. Results from lysis experiments. Clot weight loss was measured after 1 h in 5 groups, in each case in clots made with (gray) or without (white) ASA. Group A served as the control group. Here clots were solely treated with buffered plasma (pH = 7.4). Clots in groups B and C were treated with rt-PA (60 kU/ml). Clots in groups D and E were treated with DSPA (2.0 µg/ml). In groups C and E ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²) was applied. Values are depicted as the mean ± standard error of the mean and are presented in table 1. US = Color-coded sonography.

the cases of no treatment (control group A) ASA led to a significantly increased lysis rate ($p < 0.001$).

Separate analyses of variance for CLOTTYPE revealed that treatment with DSPA, rt-PA, or ultrasound induced a significant clot weight loss compared to no treatment [no-ASA-clots: $F(4, 190) = 27.0$, $p < 0.001$, post hoc comparisons (Scheffé) no treatment vs. any treatment: all $p < 0.001$; ASA-clots: ($F(4, 233) = 24.6$, $p < 0.001$, post-hoc comparisons (Scheffé) no treatment vs. any treatment: all $p < 0.001$].

In order to focus on the distinct effects of MEDICATION or ULTRASOUND we performed separate analyses for clot preparation leaving out data for no treatment. A three-factorial ANOVA for the factors CLOTTYPE, MEDICATION, and ULTRASOUND revealed a significant main effect for CLOTTYPE ($F(1, 352) = 142.9$, $p < 0.001$) and for MEDICATION ($F(1, 352) = 7.6$, $p = 0.006$), but no main effect for ULTRASOUND or interactions (fig. 2).

Data for the weight loss of clots produced from blood without ASA application were previously published [25]. Significant main effects were found for MEDICATION ($F(1, 152) = 13.2$, $p < 0.001$) and for ULTRASOUND ($F(1,$

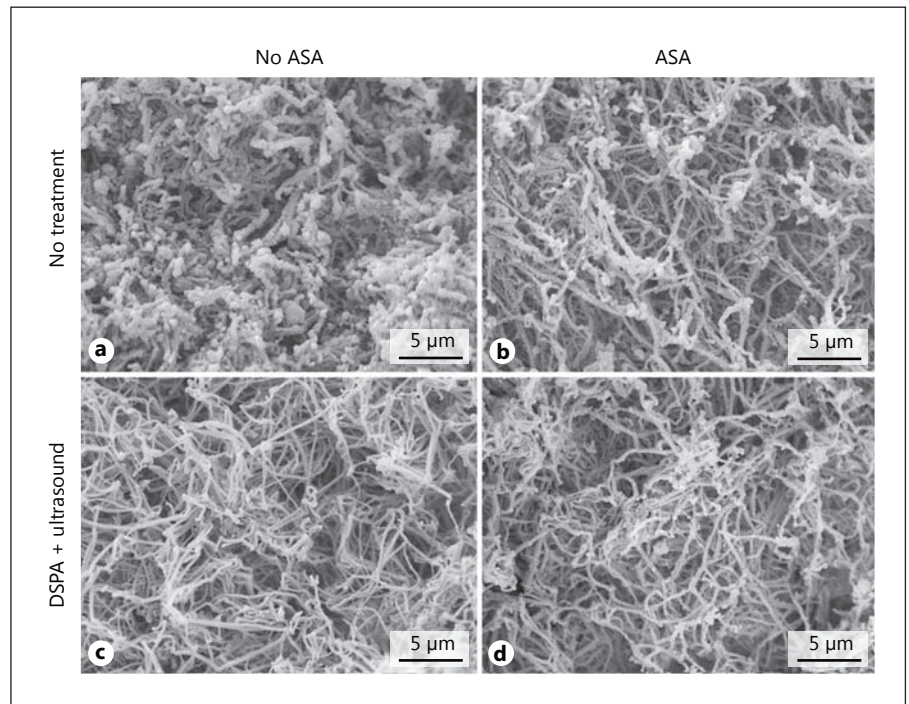


Fig. 3. SEM of different clots generated without (**a, c**) or with ASA (0.05 mg/ml; **b, d**). **a, b** Clots were solely placed in plasma (pH = 7.4). **c, d** Clots after a combined treatment with DSPA (2.0 μg/ml) and ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²).

152) = 3.9, $p = 0.049$), but no interaction of both factors was detected. Post hoc analyses showed that the lysis rate increased significantly for group D (DSPA) compared to group B (rt-PA) without ultrasound ($T(76) = 2.49$, $p = 0.015$) as well as for group E compared to group C with ultrasound application ($T(76) = 2.6$, $p = 0.01$). The additional application of ultrasound showed no significantly improved lysis rates for clots with DSPA ($p = 0.127$) and for clots with rt-PA ($p = 0.206$).

Electron micrographs (fig. 3, 4) demonstrated a looser three-dimensional fibrin mesh structure for ASA-clots compared to clots generated without ASA. Clots treated for 1 h with DSPA (2.0 μg/ml) and additional ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²) showed a clearly dissolved fibrin mesh compared to clots that did not undergo any thrombolytic treatment. Semiquantitative analysis consistently revealed that the percentage area of fibrin of the TEM images differed significantly across all groups ($p = 0.005$). Post hoc pairwise comparisons showed that the ASA-dependent decrease was only significant for untreated clots ($p = 0.029$). From a qualitative point of view we also assume such a decrease for the treated clots (fig. 4), but this was not confirmed statistically. For ASA-clots as well as no-ASA-clots the combined treatment of DSPA and ultrasound also led to a significant decrease of the fibrin density (no-ASA-clots, $p = 0.029$; ASA-clots, $p = 0.029$).

Discussion

Regardless of ASA, for both clot types all lysis treatments led to a significantly increased mass loss compared to the control groups (each $p < 0.001$). The thrombolytic power of rt-PA is indisputable and the basis for its clinical use as standard therapy of AIS [31]. As shown in figure 2, in the absence of ASA, the thrombolytic efficacy of DSPA is significantly higher compared to rt-PA (without ultrasound, $p = 0.015$; with ultrasound, $p = 0.01$) caused by the longer half-life of DSPA and its specificity for fibrin-bound plasminogen. This result is confirmed by other in vitro and animal models [25, 32, 33]. However, study results concerning the benefit of DSPA given 3–9 h after stroke onset were inconsistent [34–38]. The efficacy of DSPA and rt-PA is not significantly improved by the additional application of 2-MHz ultrasound. These results were discussed in detail in a previous publication [25] and comply with other in vitro studies [32, 39–42].

Clots generated under the influence of ASA show significantly increased lysis rates in all groups compared to the corresponding groups of no-ASA-clots (each $p < 0.001$).

ASA irreversibly inhibits the interaction of platelets by the acetylation of their cyclooxygenase (COX), especially COX-1. Inhibition of COX-1 blocks the biosynthesis of

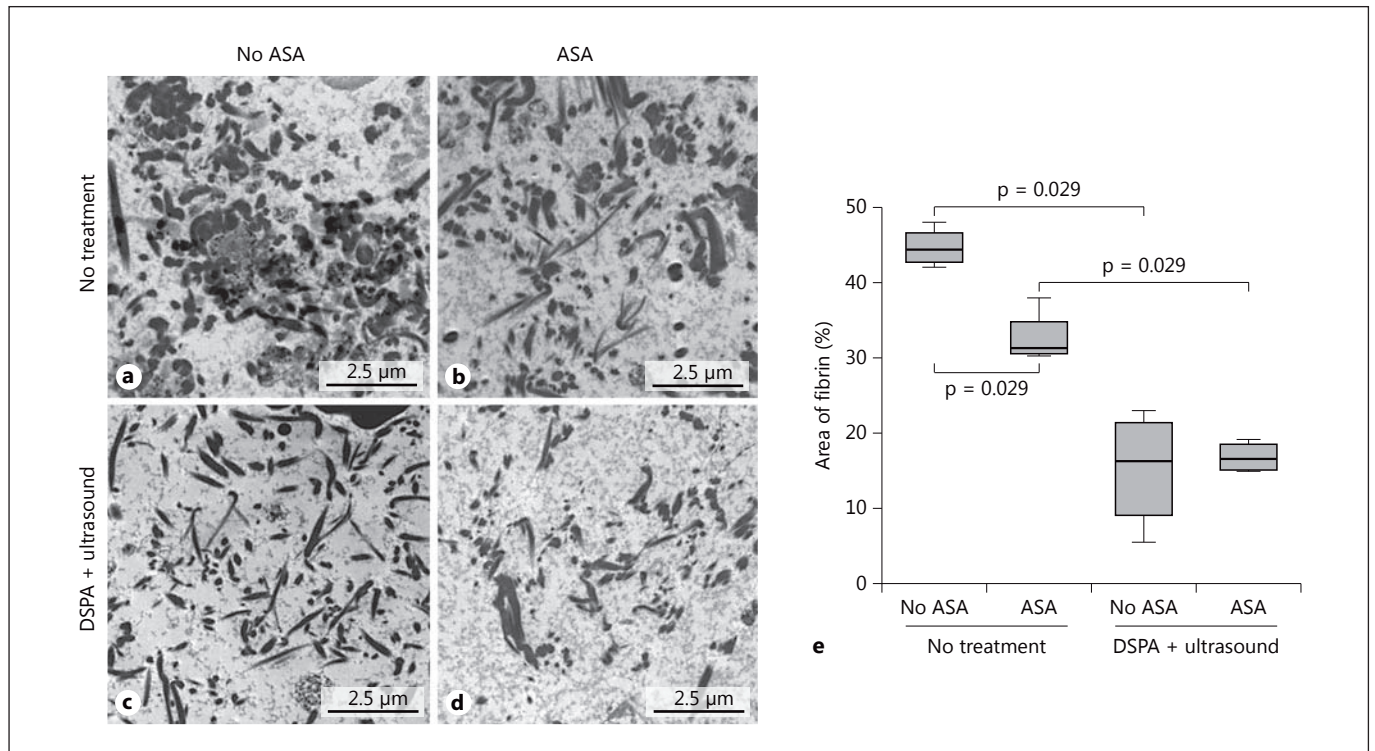


Fig. 4. Typical TEM images are shown for no-ASA-clots (**a, c**) and for clots generated under the influence of 0.05 mg/ml of ASA (**b, d**). **c, d** Clots after 1 h of combined treatment with DSPA (2.0 µg/ml) and ultrasound (2 MHz, 0.179 W/cm²). **a, b** Clots solely placed

in plasma (pH = 7.4). **e** Boxplot of the percentage area of fibrin. Semiquantitative analysis was performed in TEM images for the 4 clot groups depicted on the left side (each n = 4). p values were calculated by nonparametric post hoc group comparisons.

thromboxane A₂ within the platelets. Thromboxane A₂ is a highly active stimulator of platelet activation and aggregation, and also of clot retraction. Thus, ASA-clots are larger and less rigid than no-ASA-clots [21, 22].

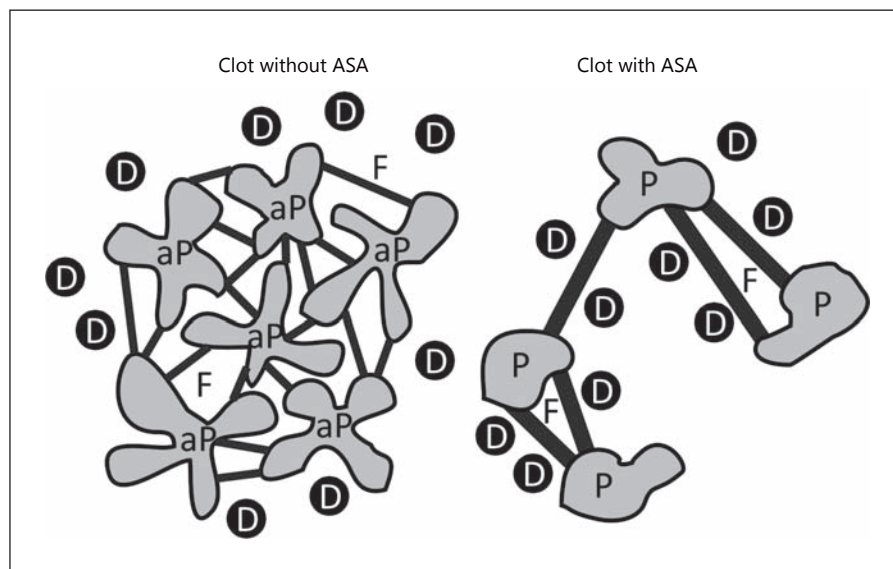
Furthermore, ASA directly affects fibrinogen and factor XIII, and thus also clot formation and fibrinolysis [21, 43]. Mediated by thrombin, fibrinogen converts into a three-dimensional network of fibrin fibers. This network is crosslinked and stabilized by thrombin-activated factor XIII [21, 44]. ASA acetylates the lysine residues of fibrinogen at sites critical for fibrin network formation and crosslinking [45, 46]. This leads to a disturbance of charge distribution on the protein surface, which gives rise to an enhancement in the thickness of fibrin fibers [22]. Increased fiber thickness is known to be important for forming a looser fibrin network [47, 48]. Moreover, incorporation of acetyl groups by ASA into fibrin might interfere with factor XIII activation [43], causing incomplete fibrin crosslinking and an increased porosity of the fibrin network [22]. Therefore, acetylation leads to fibrin networks that are less resistant to fibrinolysis [46].

We hypothesize that plasminogen activators like rt-PA and DSPA can penetrate more deeply into the ASA-clot due to its loosened structure. This leads to a larger clot area susceptible to enzymatic attack and, therefore, to an increased lysis rate for ASA-clots (fig. 5). In particular, fibrin-specific agents such as DSPA should benefit from a looser fibrin network with an increased area of exposed fibrin-binding sites because DSPA selectively activates fibrin-bound plasminogen. Fibrin is not only the substrate but is also a cofactor for DSPA. Alternatively, acetylated fibrinogen may affect the rate of conversion of plasminogen to plasmin by tissue plasminogen activators, or it may increase affinity to plasminogen activators or plasmin, resulting in an increased rate of lysis [21].

However, our results indicate that the impact of ASA causes a ceiling effect for the factors MEDICATION and ULTRASOUND. ASA increases lysis rates so much that the differences between the specific lysis strategies are nullified.

Our results are consistent with the findings of other research groups. In vitro [21–23, 49] and in vivo studies

Fig. 5. Schematic depiction of the impact of ASA on the clot structure. Activated platelets (aP) and lesser activated platelets (P) are connected by fibrin (F). ASA inhibits cyclooxygenase (COX) and therefore the formation of thromboxane A₂. This leads to a lesser recruitment and activation of platelets and therefore to a weaker clot. Furthermore, ASA causes the acetylation of lysine residues of fibrinogen which gives rise to a looser and incompletely cross-linked fibrin network. Therefore, thrombolytic drugs (D) can penetrate more deeply into the porous ASA-clot, leading to an increased lysis rate.



[50, 51] suggest that ASA-clots display a looser clot structure, which is easier to lyse. SEM performed by Ajjan et al. [21] confirmed a looser clot structure with an increased fiber thickness of ASA-clots. Our qualitative and semi-quantitative SEM and TEM assessments also show a looser fibrin network with larger pores for ASA-clots and a pronounced thrombolytic effect of DSPA (fig. 3, 4).

We used an *in vitro* model to investigate the impact of ASA premedication on the effect of different thrombolysis strategies in a standardized way. This *in vitro* model inherently has inevitable limitations, as outlined below.

Our experiment should model thrombolysis scenarios performed in a patient with a regular ASA medication up to a few hours before AIS occurs. In fact, the drug response or drug kinetics should be different *in vitro* and *in vivo*. Consequently, we were restricted to suitable assessments. COX-1 cannot be resynthesized in the platelets once it is irreversibly deactivated by ASA. Thus, after a single bolus the effect of ASA lasts for the entire life span of the platelets, which is 5–12 days [52, 53]. On the other hand, the half-life for ASA in plasma is approximately 15–20 min [54]. Therefore, ASA-clots were generated with a single bolus application of ASA. In contrast, ASA was not added to the used plasma for the lysis experiments.

The authors want to emphasize that they investigated the *in vitro* effect of ASA pretreatment on different thrombolysis strategies and not the effect or risk of the additional use of ASA during thrombolysis. In fact, the above-discussed effects of ASA should be of no impor-

tance in cases of an already developed clot. Following the current guidelines, ASA should not be initiated within 24 h after thrombolytic therapy due to an increased risk of symptomatic intracerebral hemorrhage [18, 19].

The dosages of the used drugs had to be estimated. Certainly, for our investigation, the doses of ASA and of the thrombolytic drugs had to be chosen in such a way that the effect of ASA would not be overestimated and the effect of rt-PA and DSPA would not be underestimated.

In daily stroke management, we apply 250 mg of ASA as a single intravenous bolus to achieve a sufficient saturation of platelets in ASA-naïve patients. By Nadler's formula a blood volume of 5,000 ml can be assumed for a healthy male adult with a body weight of 70 kg and a height of 180 cm [55]. Analogous to this, we administered 0.05 mg/ml of ASA to obtain sufficient saturation in our experimental setup. He et al. [22] investigated dose-dependent effects of ASA for concentrations between 0.007 and 0.4 mg/ml *in vitro*, and observed the shortest plasmin-induced fibrin-clot lysis time for 0.012 mg/ml. The fact that higher doses of ASA produce greater amounts of salicylic acid blocking the acetylation of fibrinogen to a greater extent [22] might serve as an explanation of why such a low ASA concentration provided the strongest effect on the fibrin network. Our aspired ASA concentration (0.05 mg/ml) is more than twice the concentration of 0.02 mg/ml that was found by He et al. [22] in human circulation between a few minutes and 2 h after the oral

intake of a concentration of 650 mg. In view of the already mentioned dose-dependent effects of ASA, we assume that in our experiments the effect of ASA is not overestimated.

Concerning rt-PA, a previously known concentration for *in vitro* experiments with human blood was used [26, 56]. This concentration exceeded the saturation point [26] and the expected concentration in AIS patients treated with rt-PA [57] to avoid concentration-dependent effects on the measured clot mass loss for rt-PA.

For DSPA we performed dose-finding experiments and found that clot lysis achieves saturation above DSPA concentrations of 2.0 µg/ml after 1 h [25]. On the basis of these results, a DSPA concentration of 2.0 µg/ml was applied in all of the subsequent lysis experiments using the static model. This concentration is in the same range as doses tested in clinical trials in stroke patients [34, 36]. The chosen concentration of rt-PA is comparatively higher than the chosen concentration of DSPA. This highlights our finding that the thrombolytic efficacy of DSPA is significantly higher compared to rt-PA for the no-ASA-clots.

Due to the different half-lives of rt-PA (approximately 4–9 min) and DSPA (approximately 3 h) in clinical practice, the mean part of the applied rt-PA has to be perfused continuously, whereas DSPA can be applied as a single intravenous bolus. Therefore, the solution of buffered plasma and rt-PA was renewed every 15 min during the lysis experiments. The solutions of the DSPA were kept the same. It should also be considered that this is only an approximation.

To enable reproducible measurements, we were confined to one clot formation protocol. Compared to the original whole blood the mixture that was used for PRP clot preparation had significantly reduced white and red cell counts in contrast to the platelet count [24]. This redistribution of blood cells reflects the Fahraeus-Lindqvist effect causing high concentrations of platelets close to the inner wall of the blood vessel where clotting occurs. Furthermore, the used PRP clots are distinguished by their sufficient stability, suitable lysis rates, and histological resemblance to *in vivo* clots [24]. Despite this cautious choice of the used clot formation protocol, it has to be noted that our results only apply to these PRP clots. The effect of ASA-induced platelet inhibition might be higher in these clots because of the high concentration of platelets.

Our model is not able to simulate the complex interaction between the clot and the endothelium of the sealed vessel. The mutual influences between coagulation and

fibrinolysis on the one hand and inflammatory processes on the other hand cannot be considered.

Finally, the semiquantitative analysis of the area percentage of fibrin in the TEM images is based on a small sample number, and hence an assumption about normal distribution in the population was not made. This was taken into account by using a nonparametric ANOVA for independent samples (Kruskal-Wallis test) followed by nonparametric post hoc group comparisons (Wilcoxon rank sum tests). In the group of no-ASA-clots that were treated with DSPA and ultrasound, a single very small value of the percentage area of fibrin was derived from one image (5.3%). That value deviates considerably from the mean value (15.1%). This is considered the reason why the qualitatively assumed ASA-dependent decrease of the percentage area of fibrin failed to show statistical significance for the treated clots. In all other groups no such outliers were found.

Within all these limitations, the model contributes to a better understanding of the mechanism of increased thrombolysis in ASA-pretreated patients. Two conclusions can thus be drawn, as outlined below.

In vitro ASA pretreatment leads to higher lysis rates for all performed lysis strategies due to the loosening effect of ASA concerning the clot structure of PRP clots. Most likely, this effect is also the reason for the correlation between prior AP therapy and a significantly more effective recanalization and favorable outcomes shown by some clinical studies [14, 16, 20].

Conversely, Ibrahim et al. [15] found that patients on ASA had a lower recanalization rate compared to those not on ASA and that more patients naïve to AP achieved a better long-term outcome than patients with a prior AP therapy. However, in contrast to other studies, Ibrahim et al. [15] determined recanalization by transcranial Doppler instead of DSA. Furthermore, these authors assessed recanalization at 2 h following rt-PA bolus and not 2 h after the end of rt-PA infusion.

In vitro, a ceiling effect was found concerning the lysis rates of different thrombolysis strategies for PRP clots that were generated under the influence of ASA. Due to the abovementioned limitations, it cannot be decided whether the choice of a specific thrombolytic drug or the additional application of ultrasound is only of secondary importance in the case of some ASA-pretreated patients or not.

Finally, our results point to the fact that the histochemical architecture of clots is influenced by many factors (ASA in this case). This might be relevant for their lysis rates and for the choice of a suitable treatment strategy.

Conclusions

Modelling a premedication with ASA in AIS patients with PRP clots shows increased lysis rates for thrombolytic scenarios with rt-PA and DSPA, each with or without additional ultrasound application (each $p < 0.001$). With regard to rt-PA, this finding corresponds to several *in vivo* studies.

It is well known that the impact of ASA is caused by the acetylation of cyclooxygenase in platelets and of lysine residues of fibrinogen. As shown in our SEM and TEM assessments, both effects lead to less rigid clots with a looser and incompletely crosslinked fibrin network. This causes larger clot areas susceptible to enzymatic attack and increased lysis rates.

Furthermore, our *in vitro* results indicate that for PRP clots ASA premedication causes a ceiling effect for different thrombolytic therapies. The predominance of DSPA over rt-PA as well as the nonsignificantly supporting effects of 2-MHz ultrasound are abolished by ASA.

Thereby, we created a possible link between *in vitro* findings concerning the effect of ASA on clot structure and reported clinical results concerning the impact of rt-PA in ASA-pretreated patients. Mindful of the abovementioned

limitations, the model suggests that in some ASA-pretreated patients the conventional rt-PA treatment might not differ from potentially increased lysis rates achieved with DSPA. Finally, it becomes apparent that the lysis rate of clots critically depends on the special circumstances of their creation and, therefore, of their histochemical composition.

Acknowledgments

The DSPA used was provided by Lundbeck. We are grateful to Michael Schumacher and Mrs. Dietz-Ruckstuhl for their critical reading of the manuscript and to Jan Henning Marxsen for supporting us in all hemostaseological issues. We thank Reinhard Bentrup for his support in statistical affairs. Finally, the authors thank the Department of Transfusion Medicine at the University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany (PD Dr. S. Görg) for allocating blood, and all of the blood donors for their attendance in support of our scientific efforts.

Disclosure Statement

The authors declare that there are no known conflicts of interest associated with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

- Centers for Disease Control and Prevention: Stroke drops to fourth leading cause of death in 2008. <http://www.cdc.gov/media/pressrel/2010/r101209.html> (accessed December 9, 2010).
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al: Heart disease and stroke statistics – 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25–e146.
- Rha JH, Saver JL: The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007;38:967–973.
- Wardlaw JM, Koumellis P, Liu M: Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;5:CD000514.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al: Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 2008;359:1317–1329.
- Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI: Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *J Biol Chem* 1998;273:18292–18299.
- Paciaroni M, Medeiros E, Bogousslavsky J: Desmoteplase. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:773–778.
- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, et al: Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 2004;351:2170–2178.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G: Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and rt-PA in acute middle cerebral artery main stem occlusion – results from a randomized study. *Stroke* 2008;39:1470–1475.
- Sakharov DV, Barrett-Bergshoeff M, Hekkenberg RT, Rijken DC: Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators *in vitro*. *Thromb Haemost* 1999;81:479–667.
- Meairs S, Alonso A, Hennerici MG: Progress in sonothrombolysis for the treatment of Stroke. *Stroke* 2012;43:1706–1710.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els Th, et al: Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia. *Stroke* 2005;36:1441–1446.
- Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration: Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009;373:1849–1860.
- Uyttenboogaart M, Koch MW, Koopman K, Vroomen PC, De Keyser J, Luijckx GJ: Safety of antiplatelet therapy prior to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. *Arch Neurol* 2008;65:607–611.
- Ibrahim MM, Sebastian J, Hussain M, Al-Hussain F, Uchino K, Molina C, et al: Does current oral antiplatelet agent or subtherapeutic anticoagulation use have an effect on tissue-plasminogen-activator-mediated recanalization rate in patients with acute ischemic stroke? *Cerebrovasc Dis* 2010;30:508–513.
- Sañák D, Kuliha M, Herzig R, Roubec M, Skoloudík D, Zapletalová J, et al: Prior use of antiplatelet therapy can be associated with a higher chance for early recanalization of the occluded middle cerebral artery in acute stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *Eur Neurol* 2012;67:52–56.
- Schmülling S, Rudolf J, Strotmann-Tack T, Grond M, Schneeweis S, Sobesky J, et al: Acetylsalicylic acid pretreatment, concomitant heparin therapy and the risk of early intracranial hemorrhage following systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003;16:183–190.

- 18 Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, et al: Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013;44:870–947.
- 19 European Stroke Organisation: Guidelines for management of ischaemic stroke 2008. http://www.congrex-switzerland.com/fileadmin/files/2013/eso-stroke/pdf/ESO08_Guidelines_Original_english.pdf.
- 20 Grotta JC, Welch KM, Fagan SC, Lu M, Frankel MR, Brott T, et al: Clinical deterioration following improvement in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Stroke* 2001;32:661–668.
- 21 Ajjan RA, Standeven KF, Khanbhai M, Phoenix F, Gersh KC, Weisel JW, et al: Effects of aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro cellular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:712–717.
- 22 He S, Bark N, Wang H, Svensson J, Blombäck M: Effects of acetylsalicylic acid on increase of fibrin network porosity and the consequent upregulation of fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:24–29.
- 23 He S, Blombäck M, Yoo G, Sinha R, Hensch-Edman AH: Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann NY Acad Sci* 2001;936:531–535.
- 24 Roessler FC, Teichert A, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Tanislav Ch, et al: Development of a new clot formation protocol for standardized in-vitro investigations of sonothrombolysis. *J Neurosci Methods* 2014; 237:26–32.
- 25 Roessler FC, Wang Z, Schumacher S, Ohlrich M, Kaps M, Menciassi A, et al: In vitro examination of the thrombolytic efficacy of desmoteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA. *Ultrasound Med Biol* 2015;41: 3233–3240.
- 26 Holland CK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ: Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res* 2008;121: 663–673.
- 27 Bell WR: Present-day thrombolytic therapy: therapeutic agents – pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med* 2002;3:S34–S44.
- 28 Lijnen HR: Elements of the fibrinolytic system. *Ann NY Acad Sci* 2001;936:226–236.
- 29 Collen D, Lijnen HR: Thrombolytic agents. *Thromb Haemost* 2005;93:627–630.
- 30 Rasband WS: ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- 31 Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA: Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA* 2015;313:1451–1462.
- 32 Schleuning WD, Alagon A, Boidol W, Bringmann P, Petri T, Kratzschmar J, et al: Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity. *Ann NY Acad Sci* 1992;667:395–403.
- 33 Witt W, Maass B, Baldus B, Hildebrand M, Donner P, Schleuning WD: Coronary thrombolysis with Desmodus salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation* 1994;90:421–426.
- 34 Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W; DEDAS Investigators: Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 2006;37:1227–1231.
- 35 Lundbeck: Lundbeck provides update on the development program for desmoteplase. Corporate release No. 537. June 27, 2014. <http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=856865>.
- 36 Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebach JB, Gruber F, et al: Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol* 2009;8: 141–150.
- 37 Lundbeck: Lundbeck presents new efficacy and safety data analysis for desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke. Corporate release No. 543. October 25, 2014. <http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=878159>.
- 38 Fiebach JB, Al-Rawi Y, Wintermark M, Furlan AJ, Rowley HA, Lindstén A, et al: Vascular occlusion enables selecting acute ischemic stroke patients for treatment with desmoteplase. *Stroke* 2012;43:1561–1566.
- 39 Schering: Lysis of human plasma and whole blood clots in vitro by ZK 152 387 (DPSA alpha 1), ZK 153 786 (DSPA alpha 2), ZK 155 278 (DSPA beta), ZK 153 858 (alteplase), ZK 130 932 (scu-PA), ZK 113 905 (urokinase), and ZK 156 552 (anistreplase). Schering report A315. Berlin, Schering AG, 1992.
- 40 Schering: Lysis with ZK 152 387 of human whole blood clots in vitro. Schering report 9752. Berlin, Schering AG, 1992.
- 41 Hitchcock KE, Ivancevich NM, Haworth KJ, Caudell Stamper DN, Vela DC, Sutton JT, et al: Ultrasound-enhanced rt-PA thrombolysis in an ex vivo porcine carotid artery model. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:1240–1251.
- 42 Petit B, Gaud E, Colevret D, Arditi M, Yan F, Tranquart F, et al: In vitro sonothrombolysis of human blood clots with BR38 microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:1222–1233.
- 43 Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG: Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood* 2007;109:2285–2292.
- 44 Ajjan RA, Grant PJ: Role of clotting factors and fibrin structure in predisposition to atherothrombotic disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005;3:1047–1059.
- 45 Stanford SN, Sabra A, D’Silva L, Lawrence M, Morris RH, Storton S, et al: The changes in clot microstructure in patients with ischaemic stroke and the effects of therapeutic intervention: a prospective observational study. *BMC Neurol* 2015;15:35.
- 46 Svensson J, Bergman AC, Adamson U, Blombäck M, Wallén H, Jörnskog G: Acetylation and glycation of fibrinogen in vitro occur at specific lysine residues in a concentration dependent manner: a mass spectrometric and isotope labeling study. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:335–342.
- 47 Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, et al: Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1354–1361.
- 48 Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM: The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem* 1992;267:24259–24263.
- 49 Williams S, Fatah K, Ivert T, Blombäck M: The effect of acetylsalicylic acid on fibrin gel lysis by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:718–725.
- 50 Fatah K, Beving H, Albåge A, Ivert T, Blombäck M: Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? *Eur Heart J* 1996;17:1362–1366.
- 51 Antovic A, Perneby C, Ekman GJ, Wallen HN, Hjemdahl P, Blombäck M, et al: Marked increase of fibrin gel permeability with very low dose ASA treatment. *Thromb Res* 2005; 116:509–517.
- 52 Schrör K: Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:349–356.
- 53 Sørensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, Clausen H, Hartwig JH, Wandall HH, et al: Role of sialic acid for platelet life span: exposure of β -galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood* 2009; 114:1645–1654.
- 54 Patrick J, Dillaha L, Armas D, Sessa WC: A randomized trial to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of a single dose of an extended-release aspirin formulation. *Postgrad Med* 2015;127:573–580.
- 55 Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T: Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962;51:224–232.
- 56 Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M: Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:269–273.
- 57 Fassbender K, Dempfle CE, Mielke O, Schwartz A, Daffertshofer M, Eschenfelder C, Dollman M, Hennerici M: Changes in coagulation and fibrinolysis markers in acute ischemic stroke treated with recombinant tissue plasminogen activator. *Stroke* 1999;30:2101–2104.



OPEN

First approach to distinguish between cardiac and arteriosclerotic emboli of individual stroke patients applying the histological THROMBEX-classification rule

Florian C. Roessler^{1✉}, Nicolas Kalms¹, Florian Jann¹, André Kemmling², Julika Ribbat-Idel³, Florian Stellmacher⁴, Inke R. König⁵, Marcus Ohlrich⁶ & Georg Royl⁷

Endovascular treatment of strokes caused by large vessel occlusion enables the histopathological investigation of the retrieved embolus, possibly providing a novel opportunity to contribute to the diagnostic workup of etiology and to define secondary prevention measures in strokes with uncertain genesis. We aimed to develop a classification rule based on pathophysiological considerations and adjustment to reference thrombi for distinction between cardiac and arteriosclerotic emboli and to validate this classification rule on a patient cohort. From 125 patients with stroke due to large vessel occlusion and thrombectomy, 82 patients with known etiology (55 cardioembolic and 27 arterioembolic strokes) were included. The corresponding emboli were histologically evaluated by two raters blinded to the etiology of stroke by means of a novel classification rule. Presumed etiology and classification results were compared. Agreement concerning cardiac emboli was 72.2% (95% CI: 58.4–83.5) for rater I and 78.2% (95% CI: 65.0–88.2) for rater II. Agreement concerning arteriosclerotic emboli was 70.4% (95% CI: 49.8–86.3) for rater I and 74.1% (95% CI: 53.7–88.9) for rater II. Overall agreement reached 71.6% (95% CI: 60.5–81.1) for rater I and 76.8% (95% CI: 66.2–85.4) for rater II. Within the limits of generally restricted accuracy of histological evaluations, the classification rule differentiates between cardiac and arteriosclerotic emboli of acute ischemic stroke patients. Further improvement is needed to provide valuable complementary data for stroke etiology workup.

Ischemic stroke is a major burden for healthcare. Increasing efforts have been made to improve secondary prevention, as 6.2% of minor strokes will suffer from a second possibly devastating stroke within one year, despite a continually applied treatment¹. The recent advances in intraarterial neuroradiological intervention techniques as acute stroke treatment have enlarged the number of patients who have a good outcome from an otherwise devastating ischemic stroke caused by a larger artery occlusion². The occlusion is commonly due to an embolus. The common site from which this occluding embolus originates is a stenosis of an internal carotid artery, the left atrial appendage, or the left ventricle. However, in a relevant portion of patients a so-called ESUS (“embolic stroke of unknown source”) is the result of a diagnostic workup, usually including cerebral CT or MRI, cerebrovascular imaging by CT or MRI angiography or ultrasonography, echocardiography and ECG monitoring^{3,4}.

¹Department of Neurology, Justus-Liebig-University Gießen, Klinikstraße 33, 35385 Gießen, Germany. ²Department of Neuroradiology, Westfal-Klinikum, Hellmut-Hartert-Straße 1, 67655 Kaiserslautern, Germany. ³Institute of Pathology, University of Lübeck and University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, 23538 Lübeck, Germany. ⁴Research Center Borstel - Leibniz Lung Center, 23845 Borstel, Germany. ⁵Institute of Medical Biometry and Statistics, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160 (House 24), 23562 Lübeck, Germany. ⁶Department of Neurology, Sana Kliniken Lübeck GmbH, Kronsfordter Allee 71-73, 23560 Lübeck, Germany. ⁷Department of Neurology and Center of Brain, Behaviour and Metabolism, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany. ✉email: florian.roessler@neuro.med.uni-giessen.de

These patients are dismissed with uncertainty regarding the optimal secondary prevention, as the undifferentiated approach of treating ESUS patients with novel oral anticoagulants has not been shown to be beneficial in randomized studies^{5,6}. Thus, the diagnostic workup of stroke etiology remains an indispensable cornerstone in order to decrease the mortality and morbidity of patients with ESUS or competing stroke causes.

Recently, diagnostically relevant information has been introduced into this diagnostic field by examining the histology of emboli^{7–16}. This approach uses thrombus material obtained from thrombectomies and thus takes advantage of the fact that in these patients, an embolic cause of stroke is very probable, and that the causing thrombus material is accessible. However, since experience in this field is limited, the optimal methodological strategy of examining this material is not known¹⁰.

The THROMBEX trial is a prospective, blinded trial performed in Lübeck and Gießen, Germany. The histological features of emboli extracted from acute ischemic stroke patients are examined and correlated with anamnestic, clinical, and imaging data as well as with periprocedural parameters.

As a first step, we attempted to provide a novel opportunity to contribute to the diagnostic workup of stroke etiology. This requires a differentiation between cardiac and arteriosclerotic emboli, which are the most frequent causes of proximal vessel occlusion of acute ischemic stroke patients. For this purpose, the following pathophysiological considerations were taken into consideration:

In the course of many cardiac diseases, the endocardium is frequently damaged. There is evidence that endothelial dysfunction is the primary underlying pathology that directly triggers clot formation with the side effect of atrial fibrillation and hemodynamic changes in the auricles^{17,18}. Generally, separation thrombi originate in the area of endothelial damage^{19–24}. Longer dwell times in the heart cavity caused by associated atrial fibrillation and reduced blood flow velocity enable increased clot organization with progressive cell death, further local thrombin activation, accumulation of fibrin and increased cross-linking. The resulting clots (described as “white clots” due to their low concentration of hemoglobin) contain dense fibrin nets, many and widely distributed platelets, as well as many shattered neutrophils and red cells^{19,20,22,24,25}. Those separation thrombi become harder and more resistant before they are carried away by the blood flow causing a stroke.

Agglutinative thrombi do not exclusively result from hemodynamic impairment around reduced blood flow velocities. They also emerge in areas of high blood flow velocities as the tail part of a mixed-thrombus or from clotting processes in the slipstream of a stenosis. Usually, the head section of the mixed-thrombus is a separation thrombus firmly attached to a damaged arterial vessel wall^{20,26–28}. They are torn away soon after formation by fast streaming blood and flow turbulences. The histological composition of agglutinative thrombi is smooth and loose with only little organized structure. In consequence, these “red clots” have a fine fibrin net, few and locally restricted platelets, and many intact neutrophil granulocytes and red cells. Due to these reasonable and profound results of prior investigations, we hypothesize that:

1. Cardiac emboli comply with separation thrombi with dense fibrin nets, many platelets, and small proportions of intact neutrophil granulocytes and red cells. These clots are dense, compact, rigid, stable and appear older.
2. Arteriosclerotic emboli usually result from agglutinative thrombi with only fine fibrin nets, few and locally restricted platelets, masses of red cells and high proportions of intact neutrophils and red cells. These clots are smooth, unstable, and their structure is poorly organized.

The goal of the present work is the development of a histological classification rule that is based on these hypotheses and its validation on a cohort of stroke patients.

Methods

The THROMBEX trial was approved by the local ethics committees in Lübeck (University of Lübeck, reference number: 11-257) and Gießen (Justus-Liebig-University Gießen, reference number: 281/13). All patients gave written informed consent prior to inclusion in the study. All experiments were performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Acquisition of thrombotic emboli and determination of stroke etiology. One thrombotic embolus was collected from each of 125 different acute ischemic stroke patients who underwent thrombectomy. In all cases, mechanical thrombectomy was performed by a standardized coaxial procedure with stent retriever systems (Trevor XP, 4 × 20 mm or 6 × 25 mm, Stryker, Fremont, USA).

105 emboli were removed from the anterior and 20 from the posterior circulation.

Following the ESUS criteria proposed by the Cryptogenic Stroke/ESUS International Working Group^{3,29} the underlying cause of stroke was evaluated independently by three stroke experts (board certified neurologists with at least one year experience in treating stroke patients) (Fig. 1). For this purpose, the detailed medical history and all diagnostic results had to be fully available. Instrumental investigations should at least include CT or MRI of the brain, 12-lead ECG, a 24-h Holter ECG, precordial or transesophageal echocardiography, and imaging of both the extracranial and intracranial arteries supplying the brain by catheter, MR, or CT angiography, or cervical and transcranial duplex sonography. Furthermore, patients who were younger than 55 years received a coagulation analysis and vasculitis serology. Only emboli from patients with cardioembolic or arterioembolic strokes unequivocally specified in the same way by all three stroke experts were included for the validation of the classification rule. Thus, 55 emboli of patients with a cardioembolic and 27 emboli of patients with an arterioembolic ischemic stroke were analyzed. Clinical characteristics of the two groups are listed in Table 1.

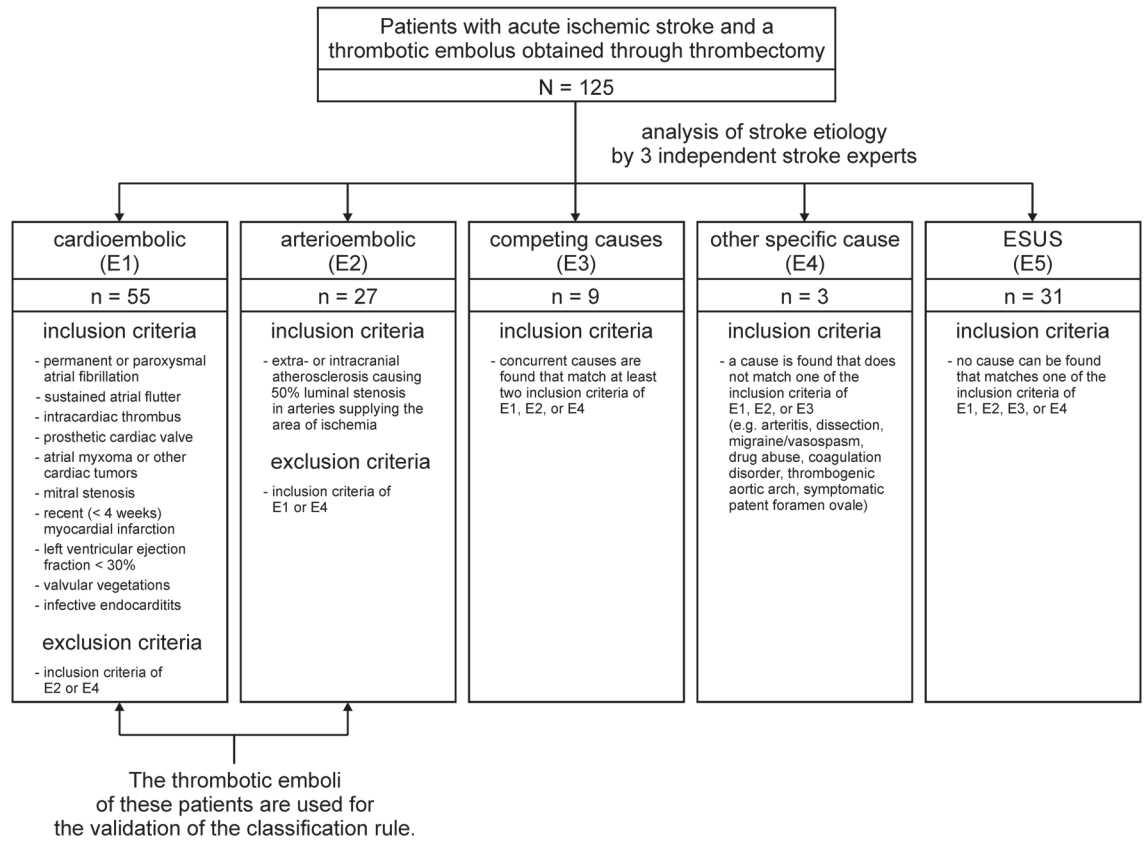


Figure 1. Selection process of suitable thrombotic emboli for the validation of the classification rule. Stroke etiology was evaluated for 125 patients with acute ischemic stroke who underwent thrombectomy. The evaluation was independently performed by three stroke experts and followed the ESUS criteria of the Cryptogenic Stroke/ESUS International Working Group. ESUS: embolic stroke of undetermined source.

Acquisition of reference thrombi. 11 clots of certain origin served as reference thrombi. Five clots were withdrawn out of left-sided heart cavities during cardiosurgical interventions. They were considered to be cardioembolic clots. Six clots represented arterioembolic clots as they were extracted from coronary arteries during cardiac catheter examinations.

Histological examination. All samples were formalin-fixed (4% buffered formalin, BÜFA, Hude, Germany) and paraffin embedded (FFPE, Paraffin, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2 µm thick slices were cut from the paraffin blocks by microtome and placed on Super Frost glass slides (Menzel, Braunschweig, Germany). Hematoxylin and eosin (HE) stains (Merck, Darmstadt, Germany) and Elastica-van Gieson (EvG) stains (Merck, Darmstadt and Waldeck/Chroma, Münster, both Germany) were carried out. Immunohistochemistry was performed using the PostBlock HRP-Polymer and ZytoChem Plus Kit (both Zytomed, Berlin, Germany). The CD61 (Zytomed, Berlin, Germany) antibody was diluted 1:250 and pretreated by steamer. Serial sections were stained and arranged on a single microscope slide. Thus, all clots were screened over a wide range before a representative section was selected for further evaluation. The histological cross sections were captured with 200-fold original magnification. Only fibrin net was pictured with 400-fold original magnification. Two raters using Olympus BX50 microscope or Carl Zeiss Axioskop 40 microscope both with fluorite objectives with plano-correction independently examined all hematoxylin and eosin (HE), Elastica-van Gieson (EvG) and CD61 stains. Both raters were blinded concerning the pathogenesis of the clots, their total number, the clinical diagnosis of the stroke patients and their demographics and treatment. For technical reasons, rater I could only evaluate 81 of the 82 emboli that were extracted from the stroke patients.

Upon microscopic evaluation of CD61 stains, the platelet distribution was interpreted and continuously assigned to the basic meteorological cloud shapes “stratus”, “cirrus”, and “cumulus” (Fig. 2) of the World Meteorological Organization³⁰ according to their quantitative occurrence in percentage.

Reading the HE and EvG stains, histopathologists reviewed fibrin nets regarding its quality and assigned percentage values to each of the three features “fine”, “coarse”, and “dense”. Finally, using the HE stains, neutrophils and red cells were examined assessing their integrity, dividing them up into wholesome or shattered. Continuous percentage scales were used to specify proportions of intact neutrophils and red cells to their total numbers.

According to the pathophysiological hypotheses, we formulated the following THROMBEX classification rule:

The histological structure of an embolus points to an arterioembolic formation process if two of the following three criteria are met:

Baseline characteristics	Cardioembolic (E1) N = 55	Arterioembolic (E2) N = 27
Years of age [median (min; max)]	72 (44; 88)	67,5 (45; 81)
Female sex [%]	50,9	48,1
Vascular risk factors		
Arterial hypertension [%]	76,4	81,5
Diabetes mellitus [%]	25,5	29,6
Coronary artery disease [%]	25,5	22,2
Atrial fibrillation [%]	87,3	3,7
Hyperlipoproteinemia [%]	20,0	22,2
History of smoking [%]	16,4	51,9
Physical state on admission [median (min; max)]		
Body mass index [kg/m ²]	25,7 (19,1; 53,6) n = 52	27,7 (20,5; 36,1) n = 26
Systolic blood pressure [mmHg]	144 (97; 240)	165 (119; 190)
Blood glucose [mg/dl]	114 (68; 180)	113,5 (97; 196)
NIHSS	14 (4; 37) n = 53	14,5 (4; 37)
Laboratory data on admission [median (min; max)]		
Platelet count [/nl]	218 (98; 373)	245 (142; 430)
Hematocrit [%]	39 (21; 46)	42 (33; 49)
Premedication		
Antiplatelet therapy [%]	49,1	29,6
Anticoagulation [%]	20,0	3,7
Occlusion site		
On the right: ICA, MCA, carotid T occlusion [%]	47,3	48,1
On the left: ICA, MCA, carotid T occlusion [%]	38,2	44,4
Basilar artery [%]	14,5	7,4
Thrombolytic therapy		
None [%]	21,8	22,2
Bridging with Abciximab [%]	29,1	25,9
Systemic application of rt-PA [%]	49,1	51,9
Local application of rt-PA [%]	10,9	7,4
Course of thrombectomy [median (min; max)]		
Duration: Symptom onset–recanalization [min]	204 (87; 625) n = 47	229,5 (135; 575) n = 16
Recanalization time [min]	52 (9; 169) n = 53	48,5 (17; 153)

Table 1. Baseline characteristics of patients included in the validation analysis. For continuous variables, the median and the minimum and maximum values are indicated. Nominal variables are presented as percentage. In cases of missing data, the number of available data is specified. NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale. ICA: internal carotid artery; MCA: middle cerebral artery.

1. Proportion of dense fibrin $\leq 30\%$.
2. Platelet distribution meets cumulus criterion $\geq 90\%$.
3. Proportion of intact neutrophils and red cells $\geq 80\%$.

Such emboli are defined as “ARTERIO “. Otherwise, histological classification points to a cardioembolic formation process (“CARDIO”).

In terms of an optimization task, the three cut-off values were determined by adjusting the classification rule until the maximum number of the 11 reference thrombi was correctly assigned to their assured pathophysiological formation process.

Figure 3 shows typical histological specimens of an arterioembolic and a cardioembolic clot that were correctly assigned by the classification rule.

Calculations and statistics. The proportions of concordant classifications were calculated, and exact 95% confidence intervals (CIs) are provided. Analyses were performed using R version 3.5.0 with the package *epitools* (version 0.5)³¹.

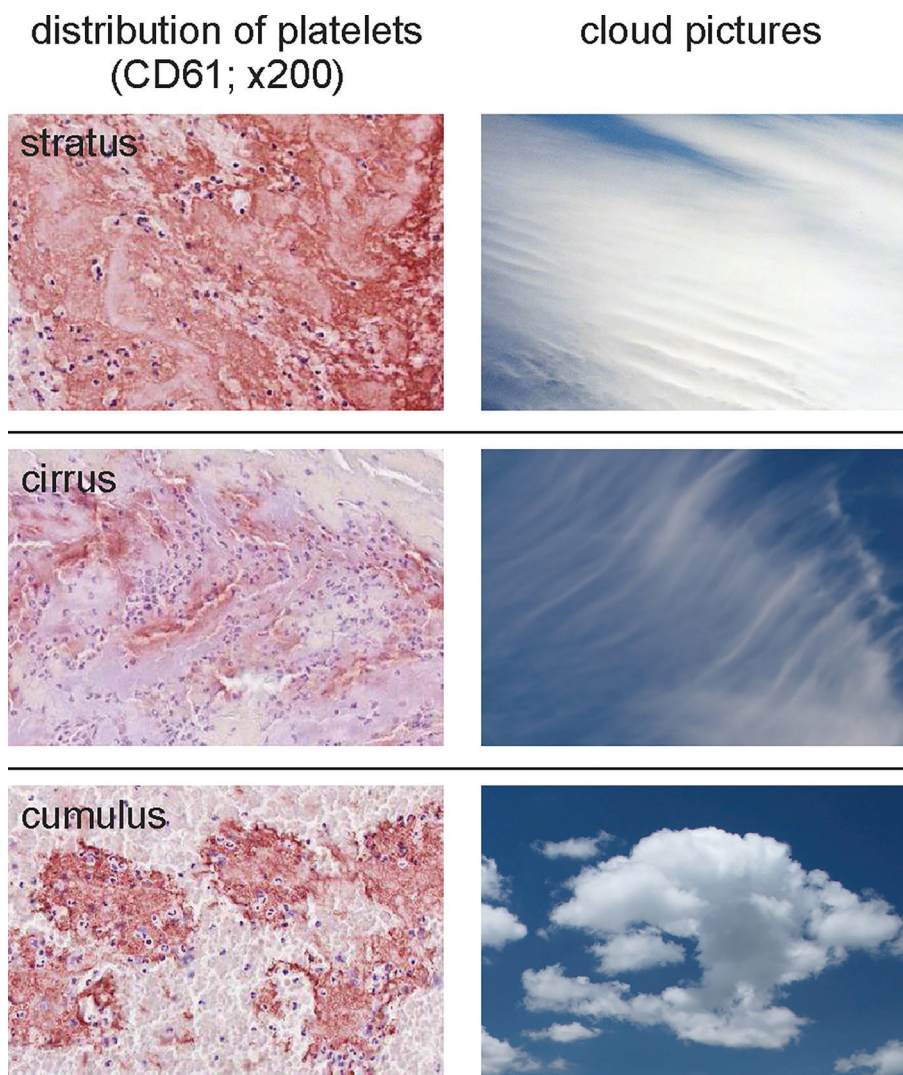


Figure 2. Description of different platelet distributions used by the THROMBEX clot classification. In analogy to basic meteorological cloud shapes (right side) used by the World Meteorological Organization published in the International Cloud Atlas³⁰ we described platelet distribution within clots (left side) as “stratus”, “cirrus”, and “cumulus”. Following the wording of the International Cloud Atlas, in a stratus distribution platelets occur as a merged layer with a uniform appearance or in the form of ragged patches. A cirrus distribution is characterized by detached clusters in the form of delicate filaments or narrow bands, having a hair-like appearance. Cumulus-like arranged platelets appear as detached and dense clusters with sharp outlines. They may be in the form of domes or towers. Sometimes they are ragged. (Prof. Stephan Borrmann of the Institute of Atmospheric Physics at the Johannes Gutenberg University of Mainz, Germany kindly provided the used cloud pictures.)

Results

Analysis of etiology of the 125 included stroke patients that underwent thrombectomy revealed predominant portions of cardioembolic (n = 55; 44%) and arterioembolic genesis (n = 27; 21.6%) as well as ESUS patients (n = 31; 24.8%). As expected, cases with competing causes (n = 9; 7.2%) or other specific causes (n = 3; 2.4%) were rare.

Only emboli of patients with cardioembolic or arterioembolic strokes were used to validate the classification rule. As expected, the distribution of their baseline characteristics (Table 1) showed that the incidence of cardiovascular risk factors (arterial hypertension, diabetes mellitus, hyperlipoproteinemia, increased body mass index, history of smoking) was rather associated with an arterioembolic genesis of stroke. In contrast, atrial fibrillation was far more frequent in the cardioembolic group (87.3% vs. 3.7%).

Occlusion of the basilar artery occurred almost twice as often in the group of cardioembolic strokes (14.5% vs. 7.4%). No striking difference was found concerning the affected side of the carotid flow area. Severity of stroke symptoms measured by the NIHSS was roughly equal in both groups. Patients with cardioembolic strokes received anticoagulants more often within their premedication. Local application of rt-PA was more frequently used in the course of acute treatment in the cardioembolic group (10.9% vs. 7.4%). No striking differences between the two groups were found regarding systemic thrombolysis or bridging with Abciximab. In the group

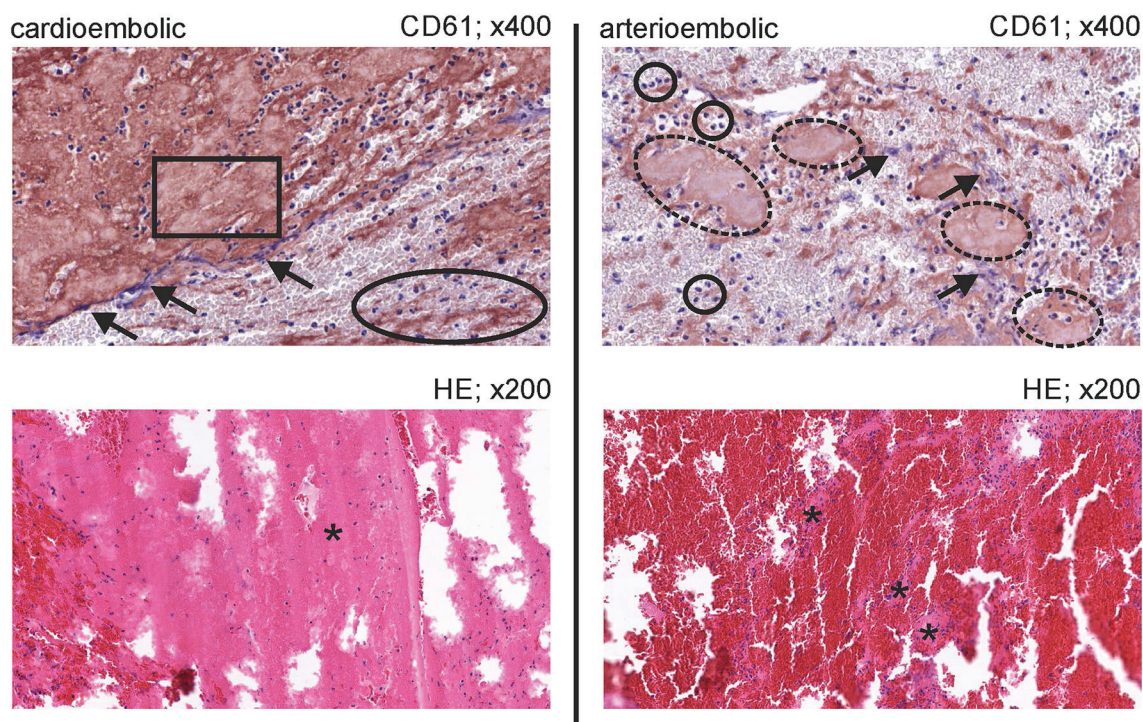


Figure 3. Histological presentation of typical cardioembolic and arterioembolic clots. For the two preparations immunohistochemical staining with CD61 (400-fold original magnification) and hematoxylin–eosin staining (200-fold original magnification) were prepared. The cardioembolic clot (left side) is characterized by a large number of platelets. Their distribution pattern reminds of stratus (rectangle) and cirrus (oval) cloud formations. Many disintegrated neutrophil granulocytes can be seen (arrows). Fibrin net is dense (star). This corresponds to a separation thrombus. In contrast, the arterioembolic clot (right side) is marked by a small amount of platelets arranged like cumulus clouds (dashed ovals). Apart from some disintegrated neutrophils (arrows), many intact neutrophils can be found (circles). Fibrin net is fine to coarse (stars). It is therefore an agglutinative thrombus that presumably arose from the tail part of a mixed-thrombus. Both emboli were extracted from patients with a definite stroke etiology.

Rater I (N = 81)/Rater II (N = 82)	Histological classification	
	CARDIO	ARTERIO
Stroke etiology		
Cardioembolic (E1)	39/43	15/12
Arterioembolic (E2)	8/7	19/20
Agreement concerning E1 [% (95% CI)], Rater I: N = 54; Rater II: N = 55	72,2 (58,4–83,5) / 78,2 (65,0–88,2)	
Agreement concerning E2 [% (95% CI)], both raters: N = 27	70,4 (49,8–86,3) / 74,1 (53,7–88,9)	
Agreement concerning E1 + E2 [% (95% CI)], Rater I: N = 81; Rater II: N = 82	71,6 (60,5–81,1) / 76,8 (66,2–85,4)	

Table 2. Fourfold table of the validation data. Stroke etiology was independently determined by three stroke experts based on complete anamnestic information and diagnostic results concerning cause analysis of stroke. Histological classification was performed by two independent raters that were blinded for the defined etiology of the thrombotic emboli. Values for both raters are indicated before (rater I) and after (rater II) the slash. CI = confidence interval.

of cardioembolic strokes, the mean duration between symptom onset and recanalization was shorter (204 vs. 229.5 min), whereas the mean recanalization time was prolonged (52 vs. 48.5 min).

To validate the classification rule agreement between stroke etiology defined by stroke experts and histological evaluation of the extracted emboli performed by two independent histopathologists (rater I and II) was determined. For both raters significant agreement was found (Table 2).

Only rater I did not obtain better than chance agreement in the allocation of arterioembolic clots. The histological evaluation of rater II delivered a somewhat higher total agreement (76.8%) than the evaluation of rater I (71.6%). Both raters achieved higher agreement for the classification of cardioembolic clots.

Discussion

Determination of stroke etiology and baseline characteristics of the included patients. Three independent stroke experts confirmed in our study the stroke etiology after examining medical history and diagnostic results of all necessary instrumental investigations. Unanimous decision of the three experts was required to specify the underlying etiology of stroke. This etiology was set to be the actual cause of stroke and served as reference to validate the developed classification rule.

The frequencies of the different stroke etiologies obtained (Fig. 1) are quite consistent with results found in the literature^{4,32}. Explanations that are more detailed can be found in the discussion section in the Data Supplement.

The baseline characteristics of the included patients (Table 1) reflect some findings concerning already known predictors of different stroke subtypes. As expected, atrial fibrillation and therefore oral anticoagulation is far more frequent in the group of cardioembolic strokes. Atrial fibrillation is the most frequent cause of cardioembolic stroke^{33–36}, or is at least a symptom of an endothelial dysfunction that has been recently found to be the main reason for thrombotic emboli¹⁷. By analogy, there are indications for the already known association between the common cardiovascular risk factors and arteriosclerosis leading to arterioembolic strokes^{37–39}. In our patient cohort, basilar artery occlusion was caused more frequently by cardiac embolism. This finding is in line with the results of other work groups^{40–42}.

In our study, the mean recanalization time was slightly increased in the cardioembolic group. This is in agreement with a previous study and may suggest a more difficult intervention in cardioembolic stroke⁴³. Further considerations are made in the discussion section in the Data Supplement.

Probably, some of the above mentioned baseline characteristics affect the histological composition of the investigated emboli. In particular, medical treatment before symptom onset may play a decisive role.

Validation of the classification rule. According to the developed classification rule, cardiac emboli comply with separation thrombi with dense fibrin nets, a widespread distribution of platelets, and small proportions of intact neutrophils and red cells. They originate from platelet accumulation caused by an endothelial dysfunction of the heart. These clots are compact, rigid, stable and appear older. Arteriosclerotic emboli arise from agglutinative tail parts of mixed-thrombi or from clotting processes in the slipstream of a stenosis. They are torn away soon after formation by fast streaming blood and flow turbulences. Therefore, they are smooth and loose and their structure is poorly organized. These hypotheses have been developed using pathophysiological considerations and are reflected by the baseline characteristics of our subjects.

The classification rule is successfully validated. Only rater I barely misses significant agreement while assigning arterioembolic clots (Table 2). Therefore, the suggested classification rule is suitable to differentiate between certain cardiac and arteriosclerotic emboli with a prediction accuracy between 70 and 78%.

Both raters identify cardioembolic clots better than arterioembolic clots. This is probably due to the chosen cut-off values because they allocate a larger range for cardioembolic clots. Therefore, classification of cardiac emboli is straightforward.

The accuracy of histological evaluations is naturally limited by pathologist-related, study methodology-related, and specimen-related causes. Therefore, most kappa values concerning reproducibility of histological classifications are in the range of 0.41–0.6 (signifying moderate agreement)^{44–50}. For the reliability of WHO and Gleason histologic grading systems in prostatic adenocarcinoma intraobserver reliabilities were 75.0% and 78.1%, respectively. Interobserver reliabilities were 60.4% and 70.8%, respectively⁵¹. This example shows that even common and useful histological classifications and grading systems are limited concerning their reliability. Considering this, the gained results of our classification rule are valuable keeping in mind that reproducibilities of different studies cannot be compared directly.

Comparison of the classification rule with results of other working groups. Brinjikji et al. performed a meta-analysis to identify a correlation between clot histology and stroke etiology¹⁰, identifying studies published between January 2005 and December 2015 that report findings related to histologic and/or imaging characteristics of thrombi in acute ischemic stroke secondary to large vessel occlusion. Finally, nine studies examining the association between the histology and etiology of emboli were selected, including in total 302 stroke patients. The two possible alternatives concerning stroke etiology were cardiac and arteriosclerotic embolism. In five studies, no correlation was found^{28,52–55}. Two studies found that cardiac emboli were associated with an increased proportion of red cells and less fibrin^{56,57}. In contrast, Niesten et al. found that arteriosclerotic emboli had a significantly higher proportion of red cells combined with cardiac emboli²⁶. The research group of Boeckh-Behrens showed that cardiac emboli contained more white blood cells and were characterized by a higher level of formation and organization⁴³. Finally, the meta-analysis drew the conclusion that due to insufficient and inconsistent data a correlation cannot be proven. However, it was stressed that most of the underlying histological investigations were done without immunohistochemical stains, therefore lacking important features. It is noteworthy that three^{25,26,56} of four studies using immunohistochemical stains found a correlation between histological features and the etiology of clots.

The classification rule presented fulfills the demand for additional immunohistochemical staining and is in line with the findings of the working groups of Niesten and Boeckh-Behrens^{26,43}. Furthermore, it complies with some more recent studies proving that cardiac emboli were significantly correlated with higher proportions of fibrin, platelets, and white blood cells but with a lower proportion of red cells^{8,9,16}. Appropriately, two other

research groups found a significantly greater red cell proportion in arterioembolic clots than in cardioembolic clots, whereas fibrin proportion was significantly larger in cardioembolic clots that were furthermore characterized by a higher level of organization^{7,14}. In a per-pass analysis of embolus composition Duffy et al. found that emboli retrieved in passes 1 and 2 from patients with arterioembolic strokes had a higher red cell composition, whereas the histological characteristics of the overall embolus load removed did not differ significantly among different etiologies¹¹. An important limiting factor of their study was that more than one-third of all cases was classified as cryptogenic strokes impeding the correlation between histology of emboli and etiology of strokes.

Contrasting results showing higher red cell proportions^{13,15} and lower fibrin percentages in cardiac emboli¹³ were also obtained. Fitzgerald et al. found significantly higher proportions of platelets for large artery atherosclerosis etiology¹². Table S1 in the Data Supplement gives an overview of the different studies.

In summary, most of the studies, in particular the both largest studies correspond with our developed classification rule. Further, the majority of studies based on additional immunohistochemical stains leads to concordant results. Most of the studies (4 of 5) contradicting our approach were performed with Asian patients.

All the previous studies are based on group comparison. Our classification rule was developed to enable inferences about stroke causes in individual patients. In particular, this promises huge benefit in strokes that cannot be assigned to a defined cause despite intensive diagnostic workup. Such cases are frequent and bear a high risk of recurrent strokes⁵⁷.

The informative value of all relevant studies in this field is restricted by a single-center design, small numbers of arterioembolic clots, and an inherent selection bias: only those emboli that did not dissolve spontaneously or after rt-PA administration and that can successfully be retrieved via thrombectomy are available for these studies. This impedes the assessment of rt-PA susceptible and thrombectomy-resistant emboli. Furthermore, components of the retrieved embolus might not completely reflect those of the entire embolus. Emboli consist of complex, heterogeneous, and anisotropic materials that undergo a dynamic evolution. In particular medical treatment before symptom onset, the chosen acute therapy, and age of the emboli might alter its histological characteristics. Usually, the number of passes needed to retrieve the occluding embolus is neglected, although the per-pass composition of the clot is likely to change¹¹. Finally, it remains uncertain whether the retrieved clot is captured from the exact occlusion site, or from a proximal or distal section.

Discrepancies between different studies may be associated with restrictions in the number of patients, ethnic affiliation of subjects, variations in procedural techniques of endovascular treatment and the lack of standardized methods concerning staining and evaluation of the histological preparations. A consensus statement from experts sought to solidify terminology and establish standardized analysis before conducting a multi-center trial.

Specific limitations of the present classification rule. In addition to the above-mentioned weaknesses of histological evaluations in general, some specific limitations should be mentioned concerning the present validation process:

The number of reference thrombi is low and finally they are not cerebral emboli. However, their origin is certain making them suitable for the adjustment of the cut-off values. The chosen method to evaluate the embolus includes manual segmentation and personal analysis, which might lead to an observer bias. Although stroke etiology was set unanimously by three independent stroke experts, it is not guaranteed that this cause of stroke is actually true.

Therefore, the present classification rule needs further improvement. In a first step, this could be achieved by more reference thrombi, further adjustment of the cut-off values and a more sophisticated definition of the classification rule.

It should be emphasized that the present study validates the classification rule for patients with a certain cardio- or arterioembolic stroke. Up to now, the accuracy of the present classification rule for embolic strokes of unknown source is not known. Therefore, a further prospective study is planned including patients whose stroke etiology is uncertain at the time of histological evaluation but will be defined later.

Conclusions

To our knowledge, this is the first attempt to develop a histological classification rule for cerebral emboli based on well-justified pathophysiological considerations and adjustment to reference thrombi before specimens are examined. The present classification rule enables the distinction between cardiac and arteriosclerotic emboli in histological samples of individual stroke patients that underwent thrombectomy by evaluating the fibrin network, distribution of platelets, and the proportion of intact neutrophils and red cells. The classification rule was successfully validated keeping in mind that the accuracy of histological evaluations is naturally restricted. Agreements between histological classification and stroke etiology defined by strokes experts are in the range of 70–78%. Advantages of this histological classification are the absence of harm for the patient and of hindrance for other diagnostic procedures and its easy and cheap implementation.

The present classification rule is supported by most of the relevant results gained by other research groups. Multi-center studies with larger patient numbers should confirm and improve the classification rule. Validation of the present classification rule was successful in cases of ensured cardio- or arterioembolic strokes. To what extent it might indicate the etiology of undetermined embolic strokes remains to be examined in a further prospective study. This is vitally important to improve secondary prevention of patients with embolic strokes of unknown source.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 27 July 2020; Accepted: 30 March 2021
Published online: 19 April 2021

References

- Amarencu, P. *et al.* One-year risk of stroke after transient ischemic attack or minor stroke. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1533–1542 (2016).
- Goyal, M. *et al.* Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* **387**, 1723–1731 (2016).
- Hart, R. G. *et al.* Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol.* **13**, 429–438 (2014).
- Ntaios, G. *et al.* Embolic strokes of undetermined source in the Athens stroke registry: a descriptive analysis. *Stroke* **46**, 176–181 (2015).
- Diener, H. C. *et al.* Dabigatran for prevention of stroke after embolic stroke of undetermined source. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1906–1917 (2019).
- Hart, R. G. *et al.* Rivaroxaban for stroke prevention after embolic stroke of undetermined source. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2191–2201 (2018).
- Ahn, S. H. *et al.* Histologic features of acute thrombi retrieved from stroke patients during mechanical reperfusion therapy. *Int. J. Stroke* **11**, 1036–1044 (2016).
- Berndt, M. *et al.* Thrombus permeability in admission computed tomographic imaging indicates stroke pathogenesis based on thrombus histology. *Stroke* **49**, 2674–2682 (2018).
- Boeckh-Behrens, T. *et al.* Thrombus histology suggests cardioembolic cause in cryptogenic stroke. *Stroke* **47**, 1864–1871 (2016).
- Brinjikji, W. *et al.* Correlation of imaging and histopathology of thrombi in acute ischemic stroke with etiology and outcome: a systematic review. *J. Neurointerv. Surg.* **9**, 529–534 (2017).
- Duffy, S. *et al.* Per-pass analysis of thrombus composition in patients with acute ischemic stroke undergoing mechanical thrombectomy. *Stroke* **50**, 1156–1163 (2019).
- Fitzgerald, S. *et al.* Platelet-rich emboli in cerebral large vessel occlusion are associated with a large artery atherosclerosis source. *Stroke* **50**, 1907–1910 (2019).
- Gong, L. *et al.* Bridging therapy versus direct mechanical thrombectomy in patients with acute ischemic stroke due to middle cerebral artery occlusion: a clinical-histological analysis of retrieved thrombi. *Cell Transpl.* <https://doi.org/10.1177/0963689718823206> (2019).
- Maekawa, K. *et al.* Erythrocyte-rich thrombus is associated with reduced number of maneuvers and procedure time in patients with acute ischemic stroke undergoing mechanical thrombectomy. *Cerebrovasc. Dis. Extra.* **8**, 39–49 (2018).
- Shin, J. W., Jeong, H. S., Kwon, H. J., Song, K. S. & Kim, J. High red blood cell composition in clots is associated with successful recanalization during intra-arterial thrombectomy. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197492> (2018).
- Sporns, P. B. *et al.* Ischemic stroke: what does the histological composition tell us about the origin of the thrombus?. *Stroke* **48**, 2206–2210 (2017).
- Akoum, N. New perspectives on atrial fibrillation and stroke. *Heart* **102**, 1788–1792 (2016).
- Yamashita, T. Molecular basis of thromboembolism in association with atrial fibrillation. *Circ. J.* **71**, A40–A44 (2007).
- Yuki, I. *et al.* The impact of thromboemboli histology on the performance of a mechanical thrombectomy device. *AJNR.* **33**, 643–648 (2012).
- Nielsen, J. M. *et al.* DUTch acute Stroke Trial (DUST). Relationship between thrombus attenuation and different stroke subtypes. *Neuroradiology* **55**, 1071–1079 (2013).
- Guo, Y., Lip, G. Y. & Apostolakis, S. Inflammatory biomarkers and atrial fibrillation: potential role of inflammatory pathways in the pathogenesis of atrial fibrillation-induced thromboembolism. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **13**, 192–201 (2015).
- Gosk-Bierska, I., Wasilewska, M. & Wysokiński, W. Role of platelets in thromboembolism in patients with atrial fibrillation. *Adv. Clin. Exp. Med.* **25**, 163–171 (2016).
- Schäfer, A., Eigenthaler, M. & Bauersachs, J. Platelet activation in heart failure. *Clin. Lab.* **50**, 559–566 (2004).
- Wysokiński, W. E. *et al.* Atrial fibrillation and thrombosis: immunohistochemical differences between in situ and embolized thrombi. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1637–1644 (2004).
- Sato, Y. *et al.* Thrombus components in cardioembolic and atherothrombotic strokes. *Thromb. Res.* **130**, 278–280 (2012).
- Nielsen, J. M. *et al.* Histopathologic composition of cerebral thrombi of acute stroke patients is correlated with stroke subtype and thrombus attenuation. *PLoS ONE* **9**, e88882 (2014).
- Silvain, J. *et al.* Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 1359–1367 (2011).
- Marder, V. J. *et al.* Analysis of thrombi retrieved from cerebral arteries of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* **37**, 2086–2093 (2006).
- Hart, R. G., Catanese, L., Perera, K. S., Ntaios, G. & Connolly, S. J. Embolic stroke of undetermined source: a systematic review and clinical update. *Stroke* **48**, 867–872 (2017).
- Secretariat of the World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland. World Meteorological Organization. International Cloud Atlas. ISBN 92-63-10407-7 (1975).
- R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R: a language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>. Accessed July 03th, 2020.
- Perera, K. S. *et al.* Embolic strokes of undetermined source: prevalence and patient features in the ESUS Global Registry. *Int. J. Stroke* **11**, 526–533 (2016).
- Borowsky, L. H. *et al.* First diagnosis of atrial fibrillation at the time of stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **43**, 192–199 (2017).
- Kamel, H. & Healey, J. S. Cardioembolic stroke. *Circ. Res.* **120**, 514–526 (2017).
- O'Carroll, C. B. & Barrett, K. M. Cardioembolic stroke. *Continuum (Minneapolis)* **23**, 111–132 (2017).
- Weir, N. U. An update on cardioembolic stroke. *Postgrad. Med. J.* **84**, 133–142 (2008).
- Candido, R., Bernardi, S. & Allen, T. J. Linking diabetes and atherosclerosis. *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* **4**, 603–624 (2009).
- Isomaa, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**, 683–689 (2001).
- Mostaza, J. M. *et al.* Risk factors associated with the carotid intima-media thickness and plaques: ESPREDIA Study. *Clin. Investig. Arterioscler.* **30**, 49–55 (2018).
- Caplan, L. R. *et al.* New England medical center posterior circulation registry. *Ann. Neurol.* **56**, 389–398 (2004).
- Nagel, S. Stroke due to acute occlusion of the basilar artery: diagnosis and treatment. *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed.* **112**, 679–686 (2017).
- Uno, J. *et al.* Mechanical thrombectomy for acute basilar artery occlusion in early therapeutic time window. *Cerebrovasc. Dis.* **44**, 217–224 (2017).
- Boeckh-Behrens, T. *et al.* The impact of histological clot composition in embolic stroke. *Clin. Neuroradiol.* **26**, 189–197 (2016).
- Allsbrook, W. C. *et al.* Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. *Hum. Pathol.* **32**, 81–88 (2001).
- Thunnissen, E. *et al.* Reproducibility of histopathological subtypes and invasion in pulmonary adenocarcinoma. An international interobserver study. *Mod. Pathol.* **25**, 1574–1583 (2012).

46. Hartman, D. J., Borczuk, A., Dacic, S. & Krasinskas, A. Reproducibility for histologic parameters in peritoneal mesothelioma. *Hum Pathol.* **67**, 54–59 (2017).
47. Tuna, B. *et al.* Histologic grading of urothelial papillary neoplasms: impact of combined grading (two-numbered grading system) on reproducibility. *Virchows Arch.* **458**, 659–664 (2011).
48. Stoler, M. H. & Schiffman, M. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* **285**, 1500–1505 (2001).
49. Boiesen, P. *et al.* Histologic grading in breast cancer—reproducibility between seven pathologic departments. South Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol.* **39**, 41–45 (2000).
50. Santucci, M., Biggeri, A., Feller, A. C. & Burg, G. Accuracy, concordance, and reproducibility of histologic diagnosis in cutaneous T-cell lymphoma: an EORTC Cutaneous Lymphoma Project Group Study. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Arch Dermatol.* **136**, 497–502 (2000).
51. Ozdamar, S. O. *et al.* Intraobserver and interobserver reproducibility of WHO and Gleason histologic grading systems in prostatic adenocarcinomas. *Int. Urol. Nephrol.* **28**, 73–77 (1996).
52. Liebeskind, D. S. *et al.* CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke. *Stroke* **42**, 1237–1243 (2011).
53. Sallustio, F. *et al.* Histological features of intracranial thrombo-emboli predict response to endovascular therapy for acute ischemic stroke. *J. Neurol. Disorders Stroke* **3**, 1105 (2015).
54. Simons, N., Mitchell, P., Dowling, R., Gonzales, M. & Yan, B. Thrombus composition in acute ischemic stroke: a histopathological study of thrombus extracted by endovascular retrieval. *J. Neuroradiol.* **42**, 86–92 (2015).
55. Singh, P., Doostkam, S. & Reinhard, M. Cerebrovascular occlusive disease histopathological analysis of thrombi retrieved by endovascular mechanical extraction during acute ischemic stroke. *Int. J. Stroke.* **9**, 143 (2014).
56. Kim, S. K. *et al.* Histologic analysis of retrieved clots in acute ischemic stroke: correlation with stroke etiology and gradient-echo MRI. *AJNR.* **36**, 1756–1762 (2015).
57. Molina-Seguín, J., Vena, A. B., Colas-Campas, L., Benalbelhak, I. & Purroy, F. A systematic review of the characteristics and prognosis of subjects who suffer an embolic stroke of undetermined source. *Rev. Neurol.* **66**, 325–330 (2018).

Acknowledgements

We are grateful to Ana Ivasiuc and Petra Dietz-Ruckstuhl for critical reading of the manuscript. Susanne Riebau supported us in recruiting patients. Lena Borhardt collected and stored the extracted emboli and sent them to the Research Centre Borstel. We would like to thank them both. Finally, the authors thank all the stroke patients who agreed to the investigation of their emboli and for their support to our scientific efforts. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Author contributions

F.R. conceived and directed the THROMBEX study, recruited stroke patients, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. Together with F.R., N.K. and F.J. collected all baseline characteristics, evaluated the underlying cause of stroke, and assisted F.R. with data processing. A.K. performed the thrombectomy. J.R.-I. and E.S. carried out all histological evaluations. I.R.K. led and performed the statistical evaluation. M.O. and G.R. supported F.R. regarding patient recruitment. G.R. gave crucial hints on planning the study.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87584-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.C.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde eigenständig durch den Autor angefertigt. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet. Aus anderen Arbeiten entnommene Abbildungen sowie wörtlich oder annähernd wörtlich wiederverwendete Textpassagen wurden als solche kenntlich gemacht.

Für den Aufbau des dynamischen Flussmodells wurden die Pumpe und dessen Steuergerät, der Laufzeitdifferenzmesser sowie die erforderlichen LabView-Programme vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT, 66386 St. Ingbert, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Der Autor erhielt in Zusammenhang mit dem hier beschriebenen dynamischen Flussmodell eine Einzelförderung durch die Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (E05-2008) und gewann den DEGUM Förderpreis der Sektion Neurologie „Wissenschaftliche neurovaskuläre Projekte“ des Jahres 2008.

Die Thrombolyseversuche wurden durch die Firmen Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Binger Straße 173, 55216 Ingelheim, Deutschland) und Lundbeck GmbH (Ericusspitze 2, 20457 Hamburg, Deutschland) in Form der Bereitstellung von Tenecteplase bzw. Desmoteplase unterstützt. Keiner der Sponsoren nahm dabei Einfluss auf das experimentelle Design der Versuche oder auf die Erhebung, Auswertung und Interpretation der Daten. Weiterhin bestand keine Einflussnahme auf die Anfertigung der Manuskripte oder auf die Art und Weise ihrer Veröffentlichung.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt.