

**Aus der Klinik für Neurologie der Universität zu
Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Münte

**Thrombusstrukturveränderung unter dem Einfluss von
ASS in der Prämedikation führt in-vitro zu einer erhöhten
Thrombolyserate unabhängig der (Sono-)
Thrombolysestrategie**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Sabrina Schumacher
aus Lüdenscheid

Lübeck 2019

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Eggers
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Gliemroth
Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.09.2019

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhalt

1	Einleitung.....	4
1.1	Physiologische Blutgerinnung	9
1.1.1	Übersicht Blutgerinnung	9
1.1.2	Primäre Hämostase.....	9
1.1.3	Sekundäre Hämostase	10
1.1.4	Fibrinogen.....	12
1.1.5	Hemmung der Blutgerinnung und Fibrinolyse.....	13
1.2	Plasminogenaktivator.....	13
1.2.1	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-Pa).....	13
1.2.2	Rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator (rt-Pa).....	14
1.3	Desmoteplase	16
1.4	Acetylsalicylsäure (Aspirin®)	19
1.5	Sonothrombolyse.....	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Versuchsaufbau.....	22
2.2	Thrombenherstellung	23
2.3	Thrombolyse-Messung	24
2.4	Thrombolyse-Messung mit rt-Pa.....	26
2.5	Thrombolyse-Messung mit DSPA.....	28
2.6	Ultraschall	29
2.7	Elektronenmikroskopie (EM).....	30
2.8	Berechnungen und Statistik.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Deskriptive Statistiken.....	33
3.2	Univariate Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Test	35
3.3	T-Tests	37
3.3.1	ASS-freie-Thromben (siehe Tabelle 5):	38
3.3.2	ASS-Thromben (siehe Tabelle 6):	39
3.4	Elektronenmikroskopische Bilder.....	40
4	Diskussion	44
4.1	Zusammenfassung Ergebnisse.....	44
4.2	rt-PA vs. DSPA	44
4.3	ASS verändert die Thrombusstruktur	46
4.4	Fibrinolyse wird durch die Fibrinstruktur beeinflusst	50
4.5	Klinische Relevanz	51

4.6	ASS und Thrombolyse mit rt-PA in-vivo.....	53
4.7	Dosierung von ASS.....	54
4.8	ASS vs. andere Thrombozytenaggregationshemmer.....	56
4.9	Sonothrombolyse unter ASS	58
4.10	Limitierungen der Studie.....	60
4.11	Fazit.....	62
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Anhang	71
7.1	Abbildungen.....	71
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	76
7.3	Ethikvotum	77
7.4	Danksagungen	78
7.5	Lebenslauf	79

1 Einleitung

Die World Health Organisation (WHO) definiert den akuten Schlaganfall als ein sich schnell entwickelndes Zeichen von fokaler oder globaler Störung der zerebralen Leistung. Das am häufigsten vorkommende Symptom ist eine akut einsetzende Schwäche und Taubheit in Gesicht, Armen oder Beinen, wobei es häufig nur eine Körperseite betrifft. Die Symptome halten mindestens 24 Stunden oder an oder führen direkt zum Tod, mit der vaskulären Genese als einzige Erklärung (Bonita, 1992).

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut Angaben der WHO die häufigste Todesursache weltweit, dabei ist der akute Schlaganfall die zweithäufigste. Im Jahr 2015 starben weltweit 17,7 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. Davon starben ungefähr 6,7 Millionen Menschen an Schlaganfällen (World Health Organisation, Stand Mai 2017). In Deutschland ist der akute Schlaganfall ebenfalls die zweithäufigste Todesursache (Robert-Koch-Institut, Journal of health monitoring, 2017).

In der Pathogenese des akuten Schlaganfalls lassen sich im Wesentlichen zwei Ursachen unterscheiden. Zum einen den akuten ischämischen Schlaganfall (AIS) mit 70-80% und die intrazerebrale Blutung mit ca. 10% (Khaw und Kessler, 2006). Weitere Ursachen verteilen sich auf 5% Subarachnoidalblutungen und 5-10% sonstige, beziehungsweise unklassifizierte Ursachen (Khaw und Kessler, 2006). Zur Differenzierung dieser Ursachen ist bei Verdacht auf einen akuten Schlaganfall eine unverzügliche Durchführung einer, je nach Möglichkeit, nativen kranialen Computertomographie (CCT) oder eines MRT des Kopfes wichtig (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015). Als die wesentliche Akutbehandlung des AIS ist nach wie vor die rekanalisierende Therapie mit Fibrinolytika anzusehen. Laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls ist für die Rekanalisierung eine intravenöse Therapie mit dem rekombinanten Plasminogenaktivator (rt-Pa) mit 0,9 mg/kg Körpergewicht (maximal 90mg), davon 10% der Gesamtdosis als Bolusgabe und den Rest als 60minütige Infusion zu verabreichen. Dieses sollte innerhalb eines 4,5 Stunden-Zeitfensters geschehen. Andere Thrombolytika außer rt-Pa sollten nur in klinischen Studien verwendet werden (Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015).

Die deutsche Gesellschaft für Neurologie fügte im Oktober 2015 Ergänzungen der aktuellen Leitlinien der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls anhand von aktuellen Studien hinzu. Unter anderem finden sich folgende neue Empfehlungen in der Leitlinie (Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015):

- Eine intravenöse Therapie mit rt-Pa sollte innerhalb 4,5 Stunden nach Beginn erster neurologischer Symptome erfolgen. Eine obere Altersgrenze zur Behandlung ischämischer Schlaganfälle besteht nicht mehr.
- Bei einem selektiven Patientengut kann die intravenöse Thrombolyse bis zu einem Zeitfenster von 6 Stunden erfolgen. Für diese individuellen Heilungsversuche sollte eine Bildgebung (Mismatch-Bildgebung) herangezogen werden.
- Patienten mit geringem Schweregrad eines Schlaganfalls, mit Diabetes mellitus, mit rückläufigen Symptomen, mit einem Schlaganfall oder einer größeren Operation in den vergangenen 3 Monaten können ebenfalls einer Thrombolysetherapie unterzogen werden.

Diese neuen Empfehlungen beruhen auf einer Vielzahl neuerer Studien zum Thema Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls.

Beispielsweise wurde die IST-3 Studie (the third international stroke trial) im Jahr 2012 veröffentlicht. Dabei handelte es sich um ein multizentrisches, randomisiertes Studiendesign, welches in 12 Ländern 3035 Patienten mit akutem ischämischem Schlaganfall in die Studie einbezog. Das Besondere dabei war, dass sie gerade die Patienten untersuchte, die in den üblichen Studienkriterien ausgeschlossen waren. Die IST-3 Studie wollte aufzeigen, dass genau dieses Patientenkollektiv ebenfalls von einer intravenösen Thrombolysetherapie mit rt-Pa profitieren könnte. 1617 (53 %) der 3035 Patienten waren älter als 80 Jahre. Der primäre Endpunkt wurde anhand der Oxford Handicap Scale (OHS) von 0-2 Punkten nach 6 Monaten festgelegt (IST-3 group, 2012). Bei 0-2 Punkten der OHS ist es dem Patienten möglich, seinen Alltag selbstständig zu bewältigen. Dieser primäre Endpunkt wurde in der Studie nicht erreicht, aber es zeigte sich eine signifikant bessere Punktzahl der OHS bei den Patienten mit der rt-Pa- Therapie als bei der Kontrollgruppe mit dem Placebo ($p=0,001$). Insbesondere schien der positive Effekt einer systemischen Thrombolysetherapie bei Patienten über 80 Jahre mindestens ebenso groß zu sein wie bei Patienten, die jünger als 80 Jahre waren (IST-3 group, 2012).

Des Weiteren fand die IST-3 Studie heraus, dass Patienten mit einer geringeren Schwere eines Schlaganfalls (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS 0-4) nicht weniger von einer rt-Pa-Therapie profitieren, als die Patienten mit einem höheren Schweregrad (NIHSS ≥ 22) eines Schlaganfalls. Zusätzlich wurden einige Patienten, die bereits zuvor mittels multimodaler Bildgebung selektiert wurden, bis zu einem Zeitfenster von 6 Stunden lysiert. Hier konnte kein Anhalt für größeres Risiko der Lysetherapie, auch im Sinne der Nachbeobachtung (6 Monate) gesehen werden. Allerdings zeigte sich der größte Effekt der systemischen Thrombolysetherapie innerhalb von 3 Stunden (IST-3 group, 2012).

Zusätzlich zur medikamentösen Rekanalisation kann eine mechanische Rekanalisation indiziert sein. Hierbei kann eine mechanische Thrombektomie bei der Untergruppe der Schlaganfallpatienten mit einem akuten Verschluss der großen arteriellen Gefäße bis zu 6 Stunden nach Symptombeginn erfolgen. Zusätzlich darf eine medikamentöse Therapie mit rt-Pa innerhalb der 4,5 Stunden begonnen werden. Die mechanische Thrombektomie stellt die Erstlinientherapie bei Patienten mit akuten Verschlüssen der proximalen Arterien des Circulus willisii und A. basilaris und ggf. der intrakraniellen A. carotis interna dar, welche Kontraindikation für eine medikamentöse Thrombolyse aufweisen (Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015).

Eine Reihe von Risikofaktoren spielen bei der Pathogenese der kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle. Es gibt unbeeinflussbare Risikofaktoren, wie das höhere Lebensalter, Geschlecht (Frauen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit einen akuten Schlaganfall zu erleiden) und die genetische Prädisposition (Khaw und Kessler, 2006). Wesentlich beeinflussbare Risikofaktoren, welche gleichermaßen für kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen gelten, sind:

- Arterielle Hypertonie ($\geq 140\text{mmHg}$ systolisch, $\geq 90\text{mmHg}$ diastolisch)
- Diabetes mellitus
- Adipositas ($\text{BMI} \geq 30\text{kg/m}^2$), auch Taillenumfang $>88\text{cm}$ (Frauen) und $> 102\text{cm}$ (Männer)
- Fettstoffwechselstörung
- Nikotinabusus

In der sekundären Prävention von kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen spielt die Eindämmung möglicher Risikofaktoren eine große Rolle. Dabei beinhaltet der Begriff Sekundärprophylaxe die Behandlung von Patienten nach überlebten kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen. So gehört neben einer Lebensstiländerung, wie zum Beispiel Sport, gesunde Ernährung, auch eine mögliche medikamentöse Prävention dazu. Die Thrombozytenaggregationshemmer nehmen dabei eine zentrale Rolle in der medikamentösen Sekundärprophylaxe ein. Derzeit hat sich in den meisten europäischen Ländern eine Sekundärprophylaxe mit Aspirin® (ASS) 100mg pro Tag gegenüber anderen Thrombozytenaggregationshemmern durchgesetzt. ASS spielt allerdings in der Primärprävention keine Rolle (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2009).

Andere zugelassene Thrombozytenaggregationshemmer für die Sekundärprophylaxe des ischämischen Schlaganfalls und der transitorisch ischämischen Attacke (TIA) in Deutschland sind. Clopidogrel, eine Kombination von ASS mit Dipyridamol und Ticlopidin. Laut Empfehlung zur Sekundärprophylaxe sollten Patienten mit einem ischämischen

Schlaganfall oder TIA ASS erhalten. Alternativ kann auch Clopidogrel oder die Kombination von ASS mit retardiertem Dipyridamol gegeben werden. Dipyridamol wird aktuell von den Kostenträgern in der ambulanten Behandlung nicht mehr erstattet, was zu einem fast vollständigen Verschwinden des Medikamentes in der Sekundärprophylaxe des Schlaganfalls geführt hat.

Keines dieser Medikamente ist den anderen gegenüber überlegen. In der CAPRIE-Studie fand sich für die Subgruppe Hirninfarkt kein Vorteil im Vergleich von ASS zu Clopidogrel. (CAPRIE Steering Committee Lancet, 1996). Ticlopidin wird bei auftretenden Blutbildveränderungen (Leukopenien) in der Regel nicht mehr verwendet (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2013; gültig bis 2020). Aktuell wird die duale Thrombozytenaggregationshemmung aus ASS und Clopidogrel in der akuten Phase nach Schlaganfall oder TIS diskutiert. Hintergrund sind zwei Studien, bei der eine dieser beiden Studien, durchgeführt in China, eine Überlegenheit der Kombination im Vergleich zur Monotherapie gezeigt hat (CHANCE-Trial, Wang et al., 2013). Diese führte aber wegen der mangelnden Übertragbarkeit der Ergebnisse von chinesischen auf kaukasische Patienten nicht zur Umsetzung in eine Handlungsempfehlung in den Leitlinien in Deutschland. Eine weitere randomisierte klinische Studie (POINT-Trial), wurde im Juli 2018 publiziert und zeigte bei Patienten mit leichteren Schlaganfällen und Hoch-Risiko-TIA eine Reduktion des gemeinsamen Endpunkts einer zerebralen oder kardialen Ischämie oder vaskulären Todes nach 90 Tagen durch die duale Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel im Vergleich zur Monotherapie mit ASS allein. Nach längerer Behandlungsdauer als einer Woche begann die Hirnblutungshäufigkeit den Benefit aufzuheben (Johnston et al., 2018).

Aufgrund der Lebensweise in den Industrienationen kommt es zu einer hohen Prävalenz an kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen und somit bei Patienten, die einen ischämischen Schlaganfall erleiden, zu einem großen Patientenkollektiv mit ASS in ihrer Prämedikation. In den Leitlinien der der European Stroke Organisation ergibt sich keine Kontraindikation für die Nutzung der intravenösen thrombolytischen Therapie, wenn ein Thrombozytenaggregationshemmer in der Prämedikation zu finden ist. Interessanterweise zeigte eine randomisierte klinische Studie eine erhöhte zerebrale Blutungsrate, wenn bei einem Thrombozytenaggregationshemmer-naiven Patienten 300 mg ASS innerhalb von 90 Minuten nach Beginn der intravenösen Thrombolyse beim akuten Hirninfarkt ergänzt wurde (ARTIS-Trial, Zinkstok et al., 2012). Die aktuellen Leitlinien besagen, dass mit ASS aber erst 24 Stunden nach Thrombolysetherapie begonnen werden sollte, um mögliche Blutungsrisiken zu minimieren (European Stroke Organisation 2008.) Dieses sollte dann binnen 48 Stunden begonnen und dauerhaft eingenommen werden (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2013; gültig bis 2020).

Einige klinische Studien zeigten bereits bei zu vorheriger Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmer eine höhere Rekanalisierungsrate im Falle eines zerebrovaskulären Ereignisses (Saňák et al., 2012). Jedoch gab es auch widersprüchliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Rate an Revaskularisierungen bei frühem Eingreifen bei diesen Patienten (Ibrahim et al 2010). Abgesehen von diesen klinischen Beobachtungen ist der Einfluss von ASS auf die Blutgerinnung und die Thrombusstruktur unbestreitbar, wie in-vitro-Studien zeigen (Ajjan et al., 2009). Jedoch wurde bisher nur selten der Einfluss von ASS in Kombination mit medikamentöser Thrombolyse untersucht.

In Anbetracht der Bedeutung von ASS in der Sekundärprävention und der Thrombolyse beim AIS, war das Ziel dieser in-vitro-Studie, den Einfluss von ASS in der Prämedikation auf verschiedene (Sono-) Thrombolysetherapien zu untersuchen. Es sollte eine Verbindung zwischen den schon beobachteten Einflüssen von ASS auf die Thrombusstruktur in Studien und den klinischen Beobachtungen von intravenöser Thrombolyse in Patienten mit ASS in der Prämedikation hergestellt werden.

Dabei fand diese in-vitro-Studie in einem standardisierten Setting und unter Genehmigung der Ethikkommission, Aktenzeichen 07-193 mit Genehmigung am 09.08.2012, von 2012 bis 2013 statt. Die Thrombolyse wurde mit dem rekombinanten Plasminogenaktivator Altpase (rt-PA) oder Desmoteplase (DSPA) durchgeführt, jeweils mit und ohne zusätzlicher Ultraschall-Applikation.

1.1 Physiologische Blutgerinnung

1.1.1 Übersicht Blutgerinnung

Im Allgemeinen lässt sich die physiologische Blutgerinnung in die primäre und die sekundäre Hämostase einteilen. Die primäre Hämostase ist durch die reversible Thrombozytenaggregation („weißer Thrombus“) gekennzeichnet. Des Weiteren sind die Blutgefäße, sowie freigesetzte blutstillende Stoffe beteiligt. Ursache dieser primären Hämostase liegt in einer Verletzung mit Einriss der Gefäße (Broos et al., 2011). Die sekundäre Hämostase schließt sich, ohne dass eine Abgrenzung möglich ist, an die primäre Hämostase an. In der sekundären Hämostase findet zum einen die Aktivierung verschiedener Gerinnungsfaktoren und zum anderen die Rekrutierung von Erythrozyten und Leukozyten statt. Dabei entsteht ein sogenannter „roter Thrombus“.

1.1.2 Primäre Hämostase

Es handelt sich bei der primären Hämostase um eine vorläufige Blutstillung, indem eine Vasokonstriktion und eine Aggregation, sowie Anheftung der Thrombozyten (mechanischer Verschluss) an das verletzte Endothel stattfindet. Die Aggregation und Anheftung werden durch verschiedene Glykoproteine vermittelt (Kehrel, 2008).

Kommt es zu einer Verletzung von Endothel wird Kollagen, welches sich unterhalb der Basalmembran des Endothels befindet, freigelegt. An dieses freigelegte Kollagen bindet der von-Willebrand-Faktor (vWF) und markiert dieses für die Vermittlung der Thrombozyten. Bei dem vWF handelt es um ein Glykoprotein, welches als Adapterprotein bei der primären Hämostase fungiert. vWF wird sowohl von Endothelzellen als auch von Megakaryozyten, den Vorläufern der Thrombozyten, gebildet. Zum anderen findet sich vWF in den Alpha-Granula (α -Granula) der Thrombozyten, in Weibel-Palade-Körpern des Endothels oder im Blut zirkulierend (Broos et al., 2011). Der vWF besteht aus mehreren Domänen, womit er einerseits an das freigelegte Kollagen und andererseits an das bei den Thrombozyten vorkommende Glykoprotein G1b binden kann. Diese Thrombozyten werden durch die Bindung zusätzlich aktiviert. Diese Aktivierung wird zudem noch durch weitere Faktoren getriggert: unter anderem Thrombin, Kollagen, ADP, Thromboxan A₂, Serotonin, Adrenalin, Matrix-Metalloprotease 2, Faktor Xa, Immunkomplexe, Komplementfaktoren, Vasopressin,

Plasmin, gewebespezifischer Plasminogenaktivator, PAF, Streptokinase, oxidiertes LDL und bakterielle Toxine. Des Weiteren kommt es durch hohen Scherstress auch zur Aktivierung der Plättchen, wie zum Beispiel bei arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, was wiederum einer der großen Risikofaktoren bei Schlaganfall darstellt (Kehrel, 2008). Durch diese Aktivierung kommt es zu folgenden Ereignissen (Broos et al., 2011; Kehrel, 2008):

- Morphologieveränderung der Thrombozyten: Von der flachen Scheibenform in die abgerundete Form mit Ausbildung von sogenannten Pseudopodien (mehrere Mikrometer lange Fortsätze).
- Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran der Thrombozyten und somit Freisetzung der enthaltenen Stoffe (unter anderem Thromboxan A₂, welche die Blutgerinnung weiter unterstützen).
- Veränderung des Glykoproteins GIIb/IIIa in der Plasmamembran der Thrombozyten, welches wiederum die Aggregation der Thrombozyten unterstützt und an denen Fibrinogen binden kann.
- Vor Morphologieveränderung befinden sich 40.000- 50.000 Moleküle des GIIb/IIIa Glykoproteins verteilt auf der Oberfläche der Thrombozyten (ca. 50% der Oberfläche). Diese Anzahl wird bei Fusion der Alpha-Granula mit der Thrombozytenoberfläche massiv erhöht.
- Die Alpha-Granula enthalten multiple Adhäsionsproteine, Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor V) und Inhibitoren (z.B. Protein C), die bei Fusion freigesetzt werden. Zudem enthält die Alpha-Granula-Membran das P-Selektin, welches bei Fusion (und Aktivierung) auf die Thrombozytenoberfläche gelangt und vermittelt die Bindung an Neutrophilen und Monozyten.

So kommt es bei diesen Vorgängen letztendlich zu der Bildung eines reversiblen Thrombozytenpropfes (weißer Abscheidungsthrombus).

1.1.3 Sekundäre Hämostase

Der in der primären Hämostase gebildete Thrombozytenpfopf kann allein keine Läsionen dauerhaft verschließen. Dazu wird die sekundäre Hämostase benötigt, in der die Gefäßläsion mit einem roten Abscheidungsthrombus (enthält zusätzlich Erythrozyten und

Leukozyten) verschlossen wird. Diese wird in ein extrinsisches und in ein intrinsisches System unterteilt. Es handelt sich dabei um eine artifizielle Gliederung, da in-vivo beide Wege Querverbindungen haben und eine Aktivierung des einen Systems auch das andere System zeitlich versetzt mit aktiviert.

Abbildung 1 zeigt schematisch die Gerinnungskaskade des extrinsischen und intrinsischen Systems.

Das extrinsische System, bestehend aus einem Komplex aus Gewebethromboplastin und dem Gerinnungsfaktor VII, dient der Auslösung einer Blutgerinnung. Dadurch fungiert dieser Thromboplastin-Faktor-VIIa-Komplex als ein gerinnungsaktiver Komplex, welcher seine volle Aktivität mit Kalzium-vermitteltem Kontakt zu den Phospholipiden an der Verletzungsstelle entfaltet, die von den aktivierten Thrombozyten sezerniert werden.

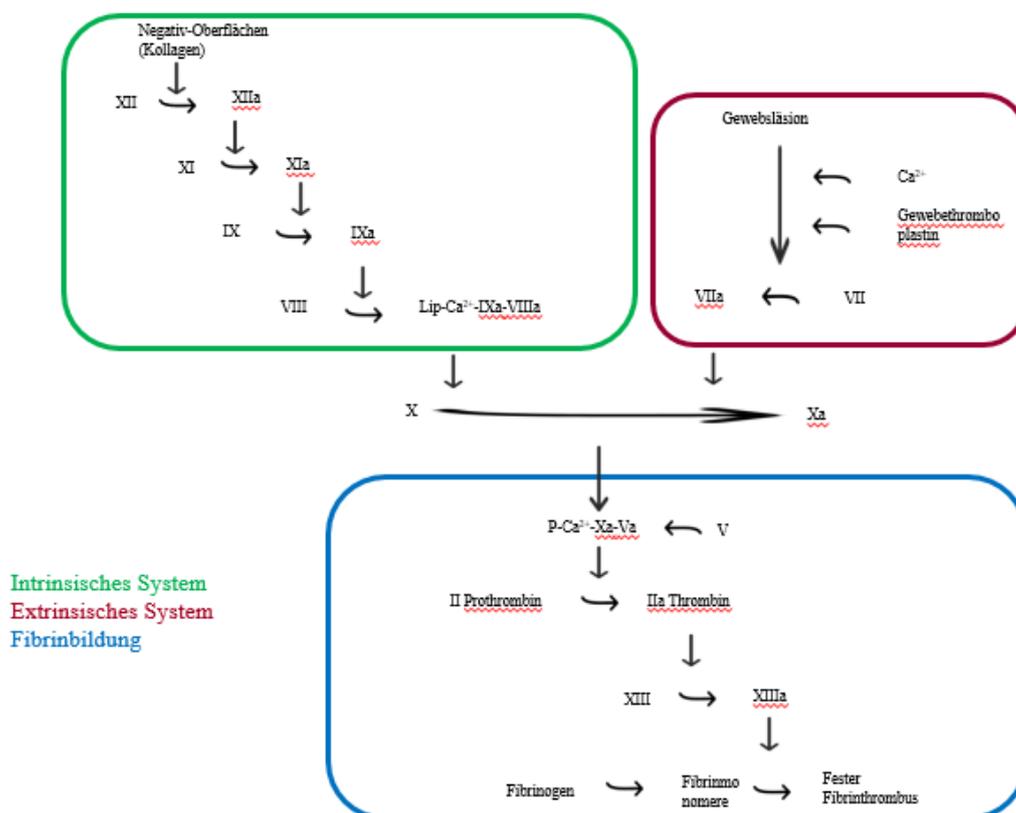


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Gerinnungskaskade

Das intrinsische System wiederum, bestehend aus einem Komplex aus Gerinnungsfaktor VIIIa und IXa, ist verantwortlich für die Verstärkung und Beschleunigung dieser vom extrinsischen System ausgelösten Blutgerinnung (Rassow et al., 2008).

Bei der gemeinsamen Endstrecke, der Fibrinbildung, werden durch die aktivierten Komplexe aus dem extrinsischen und dem intrinsischen System die Faktoren V und X aktiviert. Diese wiederum aktivieren in einem gemeinsamen Komplex mit Kalzium und Phospholipiden das Prothrombin (Faktor II). Prothrombin wird selbst in das aktive Thrombin (Faktor IIa) umgewandelt. Mit Hilfe des Thrombin kann nun das im Plasma vorkommende Fibrinogen in Fibrin gespalten werden und mittels Faktor XIII, welcher ebenfalls von Thrombin aktiviert wird, zu einem festen Fibrinthrombus verknüpft werden.

Kommt es zur Ausbildung eines Thrombus im Rahmen eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls hat das eine Ischämie, bzw. eine Minderdurchblutung des jeweiligen Gefäßes zur Folge. Die Entstehung eines intravasalen Thrombus beruht in der Regel auf einer zuvor bestehenden Arteriosklerose.

1.1.4 Fibrinogen

Fibrinogen ist der Gerinnungsfaktor I und stellt im Rahmen der sekundären Hämostase einen wesentlichen Faktor für die Entwicklung eines stabilen Fibrinthrombus dar. Fibrinogen ist ein Glykoprotein, welches in der Leber synthetisiert wird und aus 6 Polypeptidketten besteht: $2A\alpha$, $2B\beta$ und 2γ . Diese Polypeptide bilden, verbunden durch Disulfid-Brücken ein Hexamer (Ajjan und Grant, 2005). Dabei besteht das Fibrinogenmolekül aus 3 Hauptstrukturen (Aufbau des Moleküls siehe Anhang-Abbildung 1):

- Die zentrale E-Domäne, welche aus den Aminosäuren-Anteilen aller 6 Polypeptidketten besteht und die Fibrinopeptide A und E besitzt
- Und die beiden äußeren D-Domänen, welche Carboxyl-Anteile der $B\beta$ und γ -Ketten besitzt

Für das Verständnis der Wirkung von Aspirin[®] auf die Thrombusstruktur, die in der Diskussion näher erläutert wird, ist die Kenntnis von dem Fibrinogenmolekül und dessen Spaltung in das aktive Fibrin durch aktiviertes Thrombin wesentlich. Thrombin bindet im Rahmen der sekundären Hämostase an Fibrinogen und trennt die Aminosäuren-Anteile von den Polypeptidketten $A\alpha$ und $B\beta$ vom Fibrinogen an der zentralen Domäne E. Dabei werden die Fibrinopeptide A und B freigesetzt, Fibrin gebildet und die Entstehung des Fibrinnetzwerks für den Thrombus in Gang gesetzt (Scott et al., 2015). Interessant dabei ist, dass die Freisetzung von Fibrinopeptid A mit einer erhöhten Fibrinogenkonzentration im Plasma einhergeht und dieses mit einem dichteren und kompakteren Fibrinnetzwerk

assoziiert ist, während eine erhöhte Freisetzung von Fibrinopeptid B in dickere Fibrinfäden resultiert (Scott et al., 2015).

1.1.5 Hemmung der Blutgerinnung und Fibrinolyse

Der Organismus hat die Möglichkeit mit der physiologischen Fibrinolyse die Blutgerinnung zu regulieren und zu inhibieren, um eine generalisierte Gerinnung im Körper zu vermeiden. Der wichtigste inhibierende Faktor ist das Antithrombin III. Dieses bindet an Thrombin, wodurch ein Komplex entsteht, welcher die Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa und XIIa inhibiert. Die Wirksamkeit von Antithrombin III wird durch das Vorhandensein von Heparin 100fach verstärkt. Heparin, ein Glukosaminoglykan, kommt einerseits physiologisch in der Leber, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Die Kenntnis dieser Wirkverstärkung wird sich in der Medizin zur Gerinnungshemmung zu Nutze gemacht.

Zusätzlich zum Antithrombin III gibt es noch weitere gegenregulierende Systeme, wie Protein C/S, der transmembrane Rezeptor Thrombomodulin an den Endothelzellen und das α 1- Antitrypsin.

Der Fibrinaufbau und der Fibrinabbau laufen parallel im Gefäßsystem ab. Bei der Fibrinolyse selbst spielt die Protease Plasmin die entscheidene Rolle. Plasmin entsteht aus dem Vorläuferprotein Plasminogen (Rassow et al., 2008). Eine Aktivierung dieser Protease löst die Aktivierung der Fibrinolyse aus.

1.2 Plasminogenaktivator

1.2.1 Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-Pa)

Im Rahmen der physiologischen Fibrinolyse und somit der Thrombolyse spielt unter anderem Plasminogen eine bedeutende Rolle. Plasminogen ist das Proenzym von Plasmin, einer Endopeptidase zur Gruppe der Serinproteasen gehörend, welches sich im Blutplasma befindet. Durch limitierte Proteolyse wird Plasminogen in das aktive Plasmin gespalten. Diese Proteolyse wird durch endogene Plasminogenaktivatoren aktiviert. Zu den endogenen Plasminogenaktivatoren gehört unter anderem, der gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-Pa), welcher aus den Endothelzellen freigesetzt wird (Ichinose et

al., 1984). Ein weiteres Beispiel endogener Plasminogenaktivatoren ist die Urokinase, freigesetzt aus dem Urogenitalsystem (Salonen et al., 1985).

Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch t-Pa wird durch die Anwesenheit von Fibrin verstärkt (Zamarron et al., 1983). Dabei enthält Plasminogen Bindungsstellen für die Interaktion mit Fibrin, woraufhin es nach Bindung an Fibrin und der Ausbildung eines Plasminogen-Fibrin-Komplexes in das aktive Plasmin umgewandelt wird (Zamarron et al., 1983).

Der endogene Plasminogenaktivator t-Pa besteht aus einem einkettigen Polypeptid. Endogene Proteasen wie Plasmin, Kallikerin und auch der Gerinnungsfaktor Xa spalten t-Pa in seine aktivere zweikettige Form, in der zwei Polypeptidketten durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Ichinose et al., 1984).

Aufgrund der Bindung von t-Pa zu Fibrin, aus welcher ein Komplex entsteht, der eine extrem hohe Bindungsaffinität zu dem zirkulierenden Plasminogen hat, findet die physiologische Fibrinolyse nur auf der Thrombusoberfläche selbst statt, sodass eine überschießende Fibrinolyse verhindert wird (Bergmann et al., 1983). Ebenso wird eine überschießende Fibrinolyse durch spezifische Enzyme kontrolliert, die vor allem das Plasmin hemmen. Diese Enzyme sind die Plasmininhibitoren (PAI) mit dem wichtigsten Vertreter, dem Alpha-2-Plasmininhibitor (Antiplasmin). Das von t-Pa gebundene Plasmin ist allerdings vor PAI geschützt, da die Bindungsstelle für PAI bereits durch t-Pa belegt ist (Bergmann et al., 1983).

1.2.2 Rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator (rt-Pa)

Der endogene Plasminogenaktivator t-Pa lässt sich gentechnisch herstellen. Diesen rekombinanten gewebespezifischen Plasminogenaktivator (rt-Pa) bezeichnet man als einen exogenen Plasminogenaktivator. Dabei findet sich kein Unterschied in der Pharmakodynamik zwischen t-Pa und rt-Pa (Zamarron et al., 1983).

In Studien zeigte sich eine kurze Halbwertszeit des intravenös genutzten rt-Pa, welche zwischen 3 und 9 Minuten beträgt (Crabbe et al., 1987). Die Elimination des rt-Pa basiert hauptsächlich auf einer hepatischen Elimination im Leberparenchym und den Endothel- und Kupferzellen in der Leber (Tanswell et al., 1991). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit und somit guten Steuerbarkeit des Medikaments wurde rt-Pa zum Fokus mehrerer klinischer Studien, unter anderem bei der Therapie des akuten Schlaganfalls. Frühere Studien mit Streptokinase zeigten zu hohe Blutungsrisiken (Donnan et al., 1995; Hommel et al., 1995).

Die ECASS-Studie (European Cooperative Acute Stroke Study), welche im Oktober 1995 veröffentlicht wurde, untersuchte die intravenöse Thrombolyse zunächst mit 1,1mg/kg Körpergewicht innerhalb von 6 Stunden nach dem ersten Auftreten neurologischer Symptomatik eines AIS. Es zeigte sich ein Erfolg bei der Thrombolyse, allerdings auch eine deutliche Zunahme von hämorrhagischen Komplikationen, insbesondere von intrazerebralen Blutungen. Deswegen fordert die Studie zu einer Selektion bestimmter Patientengruppen auf (Hacke et al., 1995).

Eine der ersten placebokontrollierten, randomisierten, doppelblinden klinischen Studien ist die NINDS-Studie (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-Pa stroke study group) aus dem Jahr 1995. In dieser erhielten die insgesamt 624 Patienten innerhalb der ersten 3 Stunden nach Beginn der ersten neurologischen Symptome intravenös rt-Pa mit einer geringeren Dosierung als bei der ECASS-Studie (0,9mg/kg Körpergewicht) oder ein Placebo. Dabei wurde unter anderem anhand des National Institutes of Health Stroke Scale Scores (NIHSS) die Schwere des erhaltenen neurologischen Defizites 3 Monate post Behandlung gemessen. In dieser Studie konnte ein absoluter Benefit von 11-13% im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden. Nebenbefundlich zeigte sich eine 6 prozentige Zunahme zerebraler Hämorrhagien (The NINDS study group, 1995).

Im Jahr 2008 veröffentlichte die ECASS III-Studie ihre Ergebnisse zu den Untersuchungen mit einer Ausdehnung des Behandlungs-Zeitfensters auf 3 bis 4,5 Stunden. Diese Studie umfasste insgesamt 821 Patienten, wobei 418 rt-Pa (0,9mg/kg Körpergewicht) und 403 Patienten ein Placebo erhielten. Hier zeigten sich signifikant bessere Ergebnisse bei der Behandlung mit rt-Pa im Vergleich zum Placebo (52,4% vs.45,2%; $p=0,04$). Auch hier konnte, genau wie bei der NINDS-Studie, eine Zunahme zerebraler Hämorrhagien (27,0% vs. 17,6%, $p=0,001$) nachgewiesen werden, welche aber insgesamt nicht mehr waren als in der Anwendung von rt-Pa innerhalb von 3 Stunden (Hacke et al., 2008). Wichtige Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren unter anderem: Patienten über 80 Jahre und orale Antikoagulation als Vormedikation.

Bis zur ECASS-III Studie war die Empfehlung für die Anwendung von rt-Pa auf ein Zeitfenster von 3 Stunden nach erstem Auftreten der neurologischen Symptome begrenzt. Die ECASS-III Studie konnte beweisen, dass das Zeitfenster auf 4,5 Stunden erweitert werden kann, ohne dass ein Effektivitätsverlust von rt-Pa im Vergleich zu einem Placebo auftritt. So kam es, dass in Europa die Zulassung der Behandlung mit rt-Pa für den ischämischen Schlaganfall im Jahr 2010 auf 4,5 Stunden erweitert wurde. Trotzdem sollten alle Patienten so schnell wie möglich mit rt-Pa behandelt werden (Hacke et al., 2008). Dabei ist die „number needed to treat“ (NNT) bei einem Zeitfenster zwischen 3-4,5 Stunden, nach

Beginn der Symptome, 14 Patienten (Khandelwal et al., 2016). Die absolute Risikoreduktion betrug hier 7 %.

Lange gab es eine obere Altersgrenze für die thrombolytische Therapie mit rt-Pa. Seit der Ergänzung 2015 gibt es keine obere Altersgrenze mehr. Diese neue Empfehlung beruht auf den Ergebnissen der IST-Studie, welche bereits zu Beginn der Einleitung näher beschrieben wurde (The IST-3 collaborative group, 2012).

1.3 Desmoteplase

„Desmodus rotundus“ ist eine auf dem amerikanischen Kontinent lebende, gemeine Vampirfledermaus, die sich als einzige Säugetierspezies ausschließlich von Blut ernährt (Greenhall et al., 1984). Damit das Blut während der Nahrungsaufnahme nicht gerinnt, besitzt ihr Speichel Plasminogenaktivatoren, ähnlich dem körpereigenem t-Pa (Medcalf, 2012).

Diese Plasminaktivatoren wurden erstmalig 1966 experimentell ermittelt (Hawkey et al., 1966). Dabei wurde der Fledermausspeichel an plasminogenreichen und plasminogenfreien Fibrinplatten getestet, mit dem Ergebnis, dass der Fledermausspeichel im Stande war die plasminogenreichen Fibrinplatten zu lysieren. Es dauerte aber noch einige Jahre bis man den Plasminogenaktivator im Fledermausspeichel identifizieren und reproduzieren konnte.

Es zeigte sich, dass es vier Varianten des Plasminogenaktivators „Desmodus rotundus salivary plasminogen activator“ (DSPA) gibt: DSPA α 1, α 2, β und γ (Medcalf, 2012). Die Aminosäuresequenz ähnelt bei DSPA α 1 zu 72,3% dem menschlichem t-Pa und bei DSPA α 2 sogar zu 74,2% (Paciaroni et al., 2009). In biochemischen und pharmazeutischen Analysen fand man schließlich heraus, dass DSPA α 1 dem humanen, aktivierten zweikettigen t-Pa in seiner Struktur am ähnlichsten ist.

Sowohl t-Pa als auch DSPA sind fibrinselektive Plasminogenaktivatoren. Das bedeutet, dass deren Plasminogenaktivierung - und damit die Thrombolyserate - von der Präsenz von Fibrin abhängt. Gleichzeitig bedeutet dies eine lokalisierte Lyse am Thrombus, welcher aus den vernetzten Fibrinfasern besteht. DSPA ist in der Anwesenheit von Fibrin in seiner Aktivität um den 105.000-fachen Faktor höher. Bei t-Pa handelt es sich dabei lediglich um 550-fach höhere Aktivität. DSPA hat zudem eine höhere Fibrinspezifität. Ausgedrückt wird diese Spezifität in einem Quotienten: Aktivität in Anwesenheit von Fibrin / Aktivität in Anwesenheit von Fibrinogen. Bei DSPA beträgt dieser Faktor 12.900, bei t-Pa hingegen 72 (Paciaroni et al., 2009).

Fibrinogen ist ein möglicher Cofaktor für t-Pa, wohingegen Fibrinogen keinen Effekt auf DSPA aufweist. In in-vitro-Studien zeigte sich, dass Blutgerinnsel, welche aus menschlichem Blut hergestellt wurden, von DSPA und t-Pa lysiert werden konnten. Allerdings fehlte bei DSPA eine konzentrationsabhängige Reduzierung von Fibrinogen, anders als bei t-Pa (Paciaroni et al., 2009). Dieses bewahrt vor einer exzessiven Plasminogenaktivierung und somit vor Blutungskomplikationen.

DSPA zeigt keine stimulierenden Eigenschaften zur proteolytischen Aktivierung endogener Proteine wie β -Amyloid oder Prionen. Die fehlende Aktivierung dieser endogenen Proteine resultiert in einer geringeren Inzidenz an intraparenchymalen Blutungen und somit auch in einer geringeren Inzidenz an intrakraniellen Blutungen (Paciaroni et al., 2009).

Des Weiteren wurde ein Mangel an Neurotoxizität bei DSPA im Gegensatz zu t-Pa festgestellt. In einer Studie von Liberatore et al. von 2003 wurde in einem Mäuse-Modell eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurodegeneration mit t-Pa versus DSPA ermittelt. Dabei wurden Injektionen mit NMDA, t-Pa und DSPA allein in das kortikale Striatum von Wildtyp-Mäusen verabreicht. Zu erkennen war, dass NMDA-Injektionen innerhalb von 24 Stunden Läsionen verursachten. Die Plasminogenaktivatoren t-Pa und DSPA allein vermögen dieses nicht. Wurde allerdings t-Pa zu der NMDA-Injektion hinzugegeben, induzierte diese Injektion merklich größere Läsionen als NMDA allein. DSPA hingegen hatte keinen verstärkenden Effekt auf die NMDA-induzierte Neurodegeneration (Liberatore et al., 2003).

Ein weiteres Merkmal von DSPA ist seine längere Halbwertszeit von ungefähr 3 Stunden verglichen mit rt-Pa, welches eine Halbwertszeit von ca. 3-9 Minuten besitzt (Medcalf, 2012). So ist eine einmalige Bolus-Gabe von DSPA ohne kontinuierliche Perfusorthapie, wie bei rt-Pa möglich.

Einer der sicherlich wichtigsten Vorteile ist, dass die Möglichkeit der Gabe von DSPA bis zu 9 Stunden nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome besteht (Paciaroni et al., 2009) und die Studien, welche mit DSPA durchgeführt wurden, ebenfalls dieses Zeitfenster nutzen.

In den klinischen Phase-II-Studien DIAS (Desmoteplase in Acute ischemic Stroke) und DEDAS (Dose Escalation study of Desmoteplase in Acute ischemic Stroke) gelang eine Dosisfindung (zunächst 90 μ g/kg Körpergewicht (KG) und 125 μ g/kg KG) mit einem ausreichenden Sicherheitsprofil. DSPA wurde innerhalb eines Zeitraumes bis zu 9 Stunden nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome bei einem ischämischen Schlaganfall angewendet und zeigte eine höhere Reperfusionrate als das Placebo (Furlan et al., 2006; Hacke et al., 2005).

In DIAS-II, eine Phase III-Studie in den Jahren 2005-2007, sollte der klinische Effekt und die Sicherheit von DSPA bezüglich möglicher Nebenwirkungen untersucht werden. Es handelte sich dabei um eine randomisierte, doppel-blinde und placebokontrollierte Studie, in der DSPA in den Dosierungen 90µg/kg KG und 125µg/kg KG innerhalb von 3-9 Stunden nach Auftreten der ersten neurologischen Symptomatik verabreicht wurde. Das Outcome wurde anhand des NIHSS, der modifizierten Rankin-Skala und des Barthel-Index gemessen. Leider konnte in der DIAS-II kein Benefit der Verabreichung von DSPA gegenüber einem Placebo aufgezeigt werden. Intrakranielle Blutungen fanden sich nicht vermehrt und glichen somit dem Ergebnis in DIAS und DEDAS. Es galt aber nach wie vor, je höher die Dosis von DSPA, desto höher das Risiko für intrakranielle Blutungen.

In der Diskussion über DIAS-II nahm man an, dass der fehlende Benefit von DSPA gegenüber dem Placebo möglicherweise damit erklärbar sei, dass es sich bei den meisten Patienten in dieser Studie um Patienten mit milden Schlaganfällen gehandelt habe, bei denen die Prognose von Grund auf besser sei (Hacke et al., 2009).

Es folgten daraufhin weitere Phase III-Studien: DIAS-III, DIAS-IV und ein japanische Phase-II-Studie DIAS-J.

DIAS-III, eine multizentrische, randomisierte, doppel-blinde und placebokontrollierte Studie wurden in den Jahren 2008-2014 durchgeführt. In dieser wurde Desmoteplase mit 90µg/kg KG gegen ein Placebo getestet, welche als Bolus über 1-2 Minuten innerhalb von 3-9 Stunden nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome beim AIS gegeben wurde. Anders als bei den vorherigen Studien wurde Desmoteplase bei Patienten mit AIS in den großen versorgenden Hirngefäßen, welche vorher im MRT oder CT festgestellt wurden, angewendet (Kummer et al., 2012). Auch hier konnte kein ausreichender Benefit von DSPA festgestellt werden. Bei der DIAS-IV-Studie handelte es sich um dasselbe Studiendesign, welche parallel zu DIAS-III im Jahr 2009 begonnen wurde. Die DIAS-IV-Studie wurde allerdings 2014 aufgrund des fehlenden Benefits von Desmoteplase in der DIAS-III-Studie eingestellt.

In einer Metaanalyse von 2017 wurden die Ergebnisse von insgesamt 6 Studien: DEDAS; DIAS, DIAS-II, DIAS-III, DIAS-IV und DIAS-J verglichen (Li et al., 2017). Diese Studien verwendeten die Dosen <90, 90 und 125µg/kg von DSPA im Vergleich mit Placebos. Das mittlere Alter der Patienten lag zwischen 67-73 Jahren. Alle 6 Studien beurteilten DSPA hinsichtlich seiner Sicherheit im Bezug auf die Rate der symptomatischen intrakraniellen Blutungen innerhalb von 72 Stunden, bei dem sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Anwendung von DSPA oder einem Placebo zeigte (3,2% der Patienten mit DSPA vs. 2,1% der Patienten mit Placebo, p=0,35). Bezüglich asymptomatischer intrakranieller

Blutungen konnte eine Tendenz zur höheren Rate bei DSPA festgestellt werden ($p=0,09$) (Li et al., 2017).

Zusätzlich wurde ebenfalls die Effektivität (klinisches Outcome nach 90 Tagen) von DSPA gegenüber einem Placebo beurteilt. Hier zeigte sich, wie bereits in den einzelnen Studien festgestellt, kein signifikanter Effekt durch die Gabe von DSPA. Allerdings analysierten 5 der Studien auch die Rekanalisationsrate zur Beurteilung der Effektivität. Hier konnte eine signifikant bessere Rekanalisationsrate zugunsten DSPA ($p=0,01$) aufgezeigt werden (Li et al., 2017).

Letztendlich kam man am Ende der Metaanalyse zu dem Schluss, dass DSPA eine vielversprechende neue Therapie beim ischämischen Schlaganfall ist - zum Einen aufgrund des ausgedehnteren Zeitfensters der Anwendung (4,5 Stunden rt-Pa vs. bis zu 9 Stunden DSPA) und zum Anderen wegen der Sicherheit des Medikaments, bei fehlender höherer Rate an symptomatischen intrakraniellen Blutungen und Mortalität. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl untersuchter Patienten sind hier aber noch weitere Studien nötig (Li et al., 2017).

1.4 Acetylsalicylsäure (Aspirin®)

Im Jahr 1837 entwickelte Felix Hoffmann die Acetylsalicylsäure (ASS), indem er eine Acetylierung von Salicylsäure vornahm (Miner und Hoffhines, 2007).

In den 1960ern wurde ASS von verschiedenen Forschern, unter anderem von Harvey J. Weiss und Dr. Armand Quick eingehender untersucht. Harvey J. Weiss fand in einer Studie mit 10 gesunden Probanden, welche ein Placebo oder verschiedene Dosierungen von ASS einnahmen, heraus, dass ASS eine geringere Thrombozytenaggregation hervorruft, welche mit einer erniedrigten ADP-Freisetzung aus den Thrombozyten einherging. Daraus resultierend zeigte sich eine verlängerte Blutungszeit der Probanden mit ASS- Einnahme. Gleichzeitig fand Dr. Armand Quick ebenfalls eine Verlängerung der Blutungszeit unter ASS-Einnahme vor.

Schließlich fand Sir John Vane 1982 heraus, dass durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure die Prostaglandinsynthese gehemmt wird (Miner und Hoffhines, 2007).

Die Prostaglandinsynthese wird durch das Enzym Cyclooxygenase (COX) reguliert. Dabei werden Prostaglandine aus Arachidonsäure gebildet. Es bestehen 2 Isoformen der Cyclooxygenase: COX-1 und COX-2. COX-1 ist unter anderem in Thrombozyten vorzufinden und COX-2 wird in inflammatorischen Prozessen exprimiert. ASS inhibiert irreversibel die COX-1, indem es Serin-Rückstände der COX-1 acetyliert (Undas et al.,

2007). Durch diese Inhibierung entfällt die Synthese der Prostaglandine (PGH₂), welche direkte Vorläufer des Thromboxan A₂ sind. Thromboxan wiederum ist ein bedeutender Faktor für die Thrombenaggregation im Rahmen der primären Hämostase (Meier, 1989; Undas et al., 2007). Der inhibierende Effekt der Thrombozyten hält deren gesamte Lebensdauer (über 7-10 Tage) an, da diese nicht in der Lage sind COX-1 neu zu synthetisieren.

Nach einer einzelnen Dosis von ASS wird die Aktivität der COX-1 jeden Tag um 10% wiederhergestellt, wenn kein Knochenmarkschaden vorliegt. Zudem ist eine Dosis von 30-100mg ASS täglich eine suffiziente Blockierung in der Thrombozytenaggregation (Undas et al., 2007).

Es gibt aber offensichtlich noch weitere, COX-unabhängige Wirkungen von ASS auf die Blutgerinnung. Nicht nur die primäre Hämostase scheint betroffen zu sein, sondern ebenfalls die sekundäre Hämostase. In dieser Doktorarbeit soll es vor allem um die Wirkung von ASS auf die Gerinnungsfaktoren I (Fibrinogen) und XIII gehen. ASS scheint eine direkte Änderung der Fibrinstruktur des Thrombus hervorzurufen, die eine Thrombolysetherapie erleichtert.

1.5 Sonothrombolyse

Die Sonothrombolyse stellt eine zusätzliche Therapie zur Rekanalisation bei einem akuten Gefäßverschluss dar. In den vergangenen Jahren sind verschiedene Studien (in-vitro, Tiermodelle und in-vivo) durchgeführt worden, um einen möglichen verstärkenden Effekt der Sonothrombolyse auf die Rekanalisation eines Gefäßverschlusses zu beweisen.

Eine der ersten in-vivo-Studien, welche den Effekt von diagnostischem Ultraschall mit einer Kontrollgruppe verglich, war von Eggers et al., 2003. 11 Patienten erhielten rt-Pa + US und 14 Patienten lediglich rt-Pa. Hierbei konnte ein positiver Effekt hinsichtlich einer deutlich beschleunigten Rekanalisation von proximalen A. cerebri-media-Hauptstammverschlüssen durch die zusätzlich zur intravenösen Thrombolyse erfolgte Ultraschallapplikation gesehen werden. Als möglicher Nebeneffekt der zusätzlichen Ultraschallapplikation zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zu intrakranieller Blutungen (Eggers et al., 2003), die sich aber in weiteren Studien zur klinischen Sonothrombolyse mittels diagnostischem transkraniellen Ultraschall nicht bestätigte (Alexandrov et al. (CLOTBUST-Trial), 2004; Eggers et al., 2008)

Bei der Sonothrombolyse handelt es sich um den Vorgang der intravenösen medikamentösen Thrombolyse mittels rt-Pa und der gleichzeitigen Anwendung von einem kontinuierlichen transkraniellen Ultraschall. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine zusätzliche Anwendung von einem transkraniellen Ultraschall eine höhere Rate an Revaskularisierung bewirkt, als die medikamentöse Thrombolyse allein (Eggers et al., 2003; Tsivgoulis und Alexandrov, 2007).

Es wurden verschiedene Gründe des Effektes des US diskutiert. Man geht zum einen davon aus, dass der Ultraschall (US) eine bessere Anbindung des rt-PA an den Thrombus und somit eine weitere Modifizierung der Fibrinstruktur (Eggers et al., 2003) bewirkt. Andere Studien gehen von einer zusätzlichen mechanischen Komponente aus, bei der die Ultraschallwellen den Medikamententransport beeinflussen und eine Bewegung der Flüssigkeit (Blut) in und um den Thrombus herum bewirken, welche „acoustic streaming“ genannt wird (Schellinger et al., 2015).

Zusätzlich zur Nutzung des transkraniellen Ultraschalls können heutzutage Ultraschall-Kontrastverstärker (Mikrosphären, micro-bubbles) genutzt werden. Diese werden intravenös appliziert und können unter dem Ultraschalleinfluss eine bestimmte Energie entwickeln, welche beim Zerplatzen diese Energie abgeben und die Wirkung von Ultraschall verstärken (Eggers et al., 2012).

Wegen ihrer lokalen Anwendung haben die genutzten Ultraschallwellen keine systemischen Risiken, wie zum Beispiel die Blutungskomplikation unter den thrombolytischen Medikamenten (Auboire et al., 2018). Als Voraussetzung für die Nutzung und Effektivität muss das verschlossene Gefäß mittels der Sonographie dargestellt werden, um somit auch die suffiziente Anwendung der Ultraschallenergie zu gewährleisten. Dabei fanden Pfaffenberger et al. in einer in-vitro-Studie unter Verwendung eines Ultraschallgeräts für den klinisch-diagnostischen Gebrauch für die transkranielle Untersuchung heraus, dass der pulse-wave-Modus gegenüber dem continuous-wave-Modus am effektivsten ist (Pfaffenberger et al., 2005). Des Weiteren wird in den meisten Studien eine Frequenz zwischen 800kHz und 3 MHz genutzt, die übrigen Ultraschalleinstellungen sind sehr heterogen (Auboire et al., 2018).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Für die Untersuchung des Effektes der verschiedenen thrombolytischen Medikamente, bzw. der Ultraschallexposition wurde ein statisches Modell (Abbildung 2) verwendet, welches bereits in vorherigen Forschungsarbeiten (Roessler et al., 2014; Roessler et al., 2015) entwickelt und benutzt wurde.

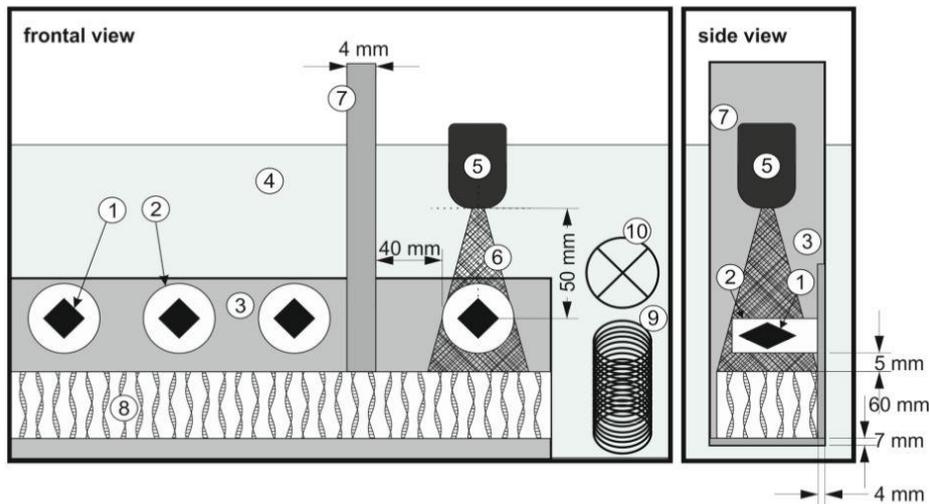


Abbildung 2. Versuchsaufbau. Die hergestellten Thromben (1) wurden in Eppendorf® Gefäßen (2) in dem Modell (3) aus Polyoxymethylen fixiert. Ebenfalls abgebildet: entgastes Wasser (4), Ultraschallsonde (5), Ultraschallwellen (6), Platte aus Polyoxymethylen (7), Ultraschallabsorber (8), Heizungsregler (9), Wasserpumpe (10). Die Thromben, die für die Sonothrombolyse genutzt wurden, wurden in 50mm Abstand zum Ultraschallkopf fixiert.

Fünf der zuvor hergestellten Thromben können gleichzeitig in fünf Eppendorf™ -Gefäßen (REF 72.690.001, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) in dem genutzten statischen Modell fixiert und mit diesem in einem 37°C warmen Wassertank gehalten werden. Die Wassertemperatur kann mittels eines Heizungsreglers (Julabo ED (v.2) class1, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) auf den gewünschten Wert konstant gehalten werden. Eine Überhitzung und Akkumulation der Wärme wird durch eine Wasserpumpe mit Aufrechterhaltung einer Zirkulation verhindert. Jeweils zwei der fünf Thromben können gleichzeitig mit diagnostischen Ultraschall (US) (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Andover,

Mass., USA) in einem colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus mit einer Frequenz von 2-MHz und einer Intensität (ISPTA, spatial-peak temporal-average intensity) von 0.179 W/cm^2 behandelt werden. Dabei belief sich die Leistung auf 100% mit einer Aliasschwelle von 0,25 m/s. Die übrigen Thromben werden dabei durch Platten, bestehend aus Polyoxymethylen, einem thermoplastischen Kunststoff, von den Ultraschallwellen separiert, um so einen ungewollten Effekt durch den US zu verhindern.

2.2 Thrombenherstellung

Das genutzte Gerinnungsprotokoll wurde vorher experimentell erarbeitet (Roessler et al., 2014). Dabei wird pro Thrombus folgendes benötigt:

- 2000 μl Plättchen-freies-Plasma
- 1500 μl Plättchen-reiches-Plasma
- 500 μl Buffy-Coat

Mit diesem lassen sich Thromben herstellen, die zum einen eine ausreichende Stabilität aufweisen und zum anderen eine adäquate Thrombolyse zulassen. Zusätzlich sind diese Thromben histologisch nachgewiesen den in-vivo-Thromben sehr ähnlich (Roessler et al., 2014).

Menschliches Blut wurde von gesunden Blutspendern in Citratröhrchen (S-Monovette®: REF 02.1067.001, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen. Die für das Experiment genutzten Blutgruppen beruhten auf den häufigsten Blutgruppen weltweit, A Rhesusfaktor positiv und 0 Rhesusfaktor positiv. Um eine geeignete Auswahl treffen zu können, wurden die Spender zu bereits bestehender oraler Antikoagulation oder weiterer antithrombotischer Medikation befragt. Es wurde nur das Blut verwendet, wenn die Spender angaben, in den vorangegangenen zwei Wochen keine etwaige Medikation genommen zu haben.

100 μl einer Aspirin®- Lösung (ASS) wurde in einer Konzentration von 0,05 mg/ml zu den gefüllten Citratröhrchen einer gleichen Blutgruppe hinzugefügt. Die Citratröhrchen wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, die jeweils unterschiedlich zentrifugiert wurden. Die erste Gruppe kam in eine Zentrifuge (Multifuge® 1S-R: Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland), in der sie mit 180 g für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Der daraus entstandene Überstand aus Plättchen-reichem-Plasma (PRP) wurde genau wie der entstandene Buffy Coat (BC), eine Grenzschicht zwischen PRP und Erythrozyten, die hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten enthält, abpipettiert. Gleichzeitig wurde bei

der zweiten Gruppe, die in mit einer Power von 85 % für 10 Minuten in einer weiteren Zentrifuge bearbeitet wurde (EBA 8s, Andreas Hettich, Deutschland), ein Überstand mit Plättchen-freien-Plasma (PFP) gewonnen. Pro Citratröhrchen konnte man ungefähr 5000 µl PFP bzw. PRP und 500 µl BC gewinnen. Für die benötigten fünf Thromben pro Experiment ließ sich eine Anzahl von mindestens 8 Citratröhrchen der gleichen Blutgruppe berechnen.

Um individuelle Unterschiede in der Fähigkeit der Gerinnung oder in der Blutzusammensetzung ausgleichen zu können wurden die abgenommenen PRP, PFP und BC gepoolt. Dabei kamen die jeweiligen Abstände in drei dafür vorgesehene Behältnisse und die gepoolten PRP, PFP und BC wurden geschwenkt, damit eine ausreichende Vermischung gewährleistet werden konnte. Anschließend konnten die Thromben hergestellt werden, indem man ein Gemisch aus 1,5 ml PRP, 2,0 ml PFP, 0,5 ml BC verwendete. Danach wurde, um die Gerinnungskaskade zu initialisieren, 640 µl einer Calciumchloridlösung mit einer finalen Konzentration von 13,8 mmol/L hinzugefügt. Diese Lösung ließ man für eine Stunde in einem Wasserbad bei physiologischen 37 °C inkubieren. Dazu wurden Plastikröhrchen genutzt (REF 55.486.001, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland). Die daraus entstandenen zylinderförmigen Thromben wurden auf ein Gewicht von 250 ± 150 mg zurechtgeschnitten und wieder in besagten Plastikröhrchen in einer isotonen Elektrolytlösung (Ringerlösung, Berlin Chemie Menarini, Berlin, Deutschland) als Blutersatz über Nacht in einem Wasserbad bei 37 °C gelagert. So konnte eine komplette Retraktion des Thrombus und eine gewisse Stabilität für die anstehenden Experimente gewährleistet werden.

2.3 Thrombolyse-Messung

Das Gewicht der Thromben wurde tropfenfrei sowohl vor dem einstündigen Experiment, als auch nach der Stunde mit einer analytischen Waage (Kern 770, Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Deutschland) gewogen. Anhand dieser Gewichte konnte man den prozentualen Gewichtsverlust, welcher der Thrombolyse in % entspricht, mit folgender Formel berechnen.

$$\text{Thrombolyse rate(\%)} = \frac{\text{Gewicht vor dem Experiment} - \text{Gewicht nach dem Experiment}}{\text{Gewicht vor dem Experiment}} \times 100$$

Während des Experimentes wurden die Thromben in die 2 ml umfassenden Eppendorf™-Gefäße (REF 72.690.001, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) mit gepuffertem Plasma (pH =7,4) verstaute. Dieser pH-Wert von 7,4 konnte mittels 60 µl einer 0,1 M HEPES-Puffer-Lösung erreicht werden. Überprüft und mehrmals kontrolliert wurde dies mit einem pH-Messer. Das hierfür verwendete Plättchen-freie-Plasma wurde als Vorbereitung für das Experiment einige Wochen zuvor aus menschlichem Blut von gesunden Spendern gewonnen, gepoolt und bei konstanten -80°C in Perfusor®-Spritzen eingefroren. Dabei benötigte man die Zentrifuge (EBA8s, Andreas Hettich, Deutschland), die auch während des Experiments zu Gewinnung des Plättchen-freien-Plasmas (s. 1.2) genutzt wurde. Nur das jeweils für das Experiment errechnete Plasma wurde aufgetaut. Die Berechnungen für verschiedenen Medikamentengruppen (rtPa und DSPA) sind in den Unterpunkten 1.2.2 und 1.3 erklärt.

In der Kontrollgruppe A (n=42) wurden die Thromben lediglich mit dem gepufferten Plasma behandelt. In den Gruppen B (n=68) und C (n=30) mit einer Lösung aus gepuffertem Plasma und rt-Pa (finale Konzentration von 60 kU/ml), jeweils ohne US (Gruppe B) und mit US (Gruppe C). Die Gruppen D (n=68) und E (n=30) wurden hingegen mit der Lösung aus gepuffertem Plasma und DSPA (finale Konzentration von 2 µg/ml) versetzt, auch jeweils ohne US (Gruppe D) und mit US (Gruppe E).

Bei dem genutzten Ultraschall handelte es sich um einen diagnostischen Ultraschall (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Andover, Mass., USA), siehe 2.6 des Material und Methodenteils.

Bei den Experimenten mit dem Zusatz von ASS wurde das gleiche Protokoll wie für die Thromben ohne ASS (Roessler et al., 2015), verwendet. Diese Daten wurden dann als Basis für die Analyse über den Einfluss von ASS auf die (Sono-) Thrombolyse genutzt. Die Effektivität von ASS mit einer täglichen Dosierung zwischen 75 und 150 mg ist in klinischen Studien genau untersucht (Antithrombotic Trialists' Corporation). Im Fall eines akuten ischämischen Schlaganfalls (AIS) zeigte sich, dass eine Gabe von ASS mit einer einmaligen Dosis zwischen 160-300 mg innerhalb von 48 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome half die Mortalität und Invalidität signifikant zu senken (Sandercock et al., 2008). Zum Zeitpunkt der Studierhebung wurde in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Lübeck eine einmalige intravenöse Dosis von 250 mg ASS verabreicht, um die Thrombenbildung zu erschweren. Aufgrund des hohen Aspirationsrisikos der Patienten mit AIS ist es wichtig ASS sekundärpräventiv parenteral zu verabreichen. Auf dieser Grundlage konnte die benötigte ASS-Konzentration für die mit 10 ml Blut gefüllten Citratröhrchen berechnet werden. Ausgehend von Nadlers Formel (Blutvolumen-Berechner) wurde die Konzentration anhand eines jungen Mannes mit einem

Gewicht von 70 kg und einer Größe von 180 cm (= 4,9 Liter Blut) berechnet. Aufgrund dessen wurde zu den Citratröhrchen je 100 µl der 0,05 mg/ml ASS-Lösung hinzugefügt. Die benötigte Menge wurde zuvor wie das gesammelte Plasma bei -80°C in neunundneunzig 1 ml Spritzen eingefroren.

2.4 Thrombolyse-Messung mit rt-Pa

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von rt-Pa, welche ungefähr 3 bis 9 Minuten beträgt (Crabbe und Cloninger, 1987), wurde in den Gruppen B und C die Lösung aus gepuffertem Plasma und rt-Pa alle 15 Minuten erneuert. So konnte eine kontinuierliche Wirkung des Medikaments erreicht werden. Im klinischen Alltag wird hierfür eine kontinuierliche Gabe von rt-Pa über Perfusor über eine Stunde nach initialer Gabe eines Bolus von 10% der Gesamtdosis eingesetzt.

Das für das Experiment notwendige rt-Pa wurde von den MitarbeiterInnen der Stroke Unit der Universität Lübeck gesammelt, mit Datum versehen und eingefroren. Es handelte sich hierbei um das rt-Pa, welches bei einer akuten Thrombolysetherapie übrigblieb und ansonsten verworfen würde.

Dieses gesammelte rt-Pa wurde nicht gepoolt, da eine Aktivitätsmessung mit Pefachrome®tPa vom 31.08.2012 zeigte, dass rt-Pa unterschiedlicher Daten des gleichen Jahres in ihrer Aktivität gleichwertig waren (Abbildung 3).

Mit dem Pefachrome®tPa (Methylsulfonyl-cyclohexylalanyl- glycyl-arginyl-p-nitroanilid), einem Enzym-Kit-Produkt aus der Schweiz (Basel), konnte die Aktivität der unterschiedlichen rt-Pa-Proben gemessen werden. Des Weiteren wurde vor dem Experiment ein Tris-Imidazol-Puffer mittels Spectrozyme® hergestellt. Dafür wurde benötigt:

- Lösung A: 3.03 mg Tris, 1.7 mg Imidazol + 50 ml 1N HCl + 100 ml destilliertes Wasser
- Lösung B: 4.04 mg Tris, 2.27 mg Imidazol + 1.95 mg NaCl, + 100 ml destilliertes Wasser
- Reagenz: Natriumchlorid (NaCl)

Anschließend wurden die beiden Lösungen zusammen in einem Behälter vermischt, sodass man 200ml mit einem pH von 8,4 (Kontrolle mit einem pH-Messer) erhielt. Anschließend wurde dieser Lösung 23,4mg NaCl hinzugefügt, um die 10fache

Konzentration des Tris-Imidazol mit einer Ionenstärke von 3,0 zu erhalten. Für das Experiment wurde eine Ionenstärke von 0,3 benötigt, deswegen wurde die Lösung mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Das Resultat war der Tris-Imidazol-Puffer mit einem pH von 8,4 und einer Ionenstärke von 0,3. Der benötigte pH und die benötigte Ionenstärke waren zuvor von der Anleitung des Pefachrome®tPA entnommen worden.

Für das eigentlich Aktivitätsexperiment benötigte man bei einem zweikettigen tPa:

- 1,750 ml des Tris-Imidazol-Puffers
- 0,050 ml Enzym (rt-Pa, 120.000 IU /ml)
- 0,200 ml Pefachrome®tPA

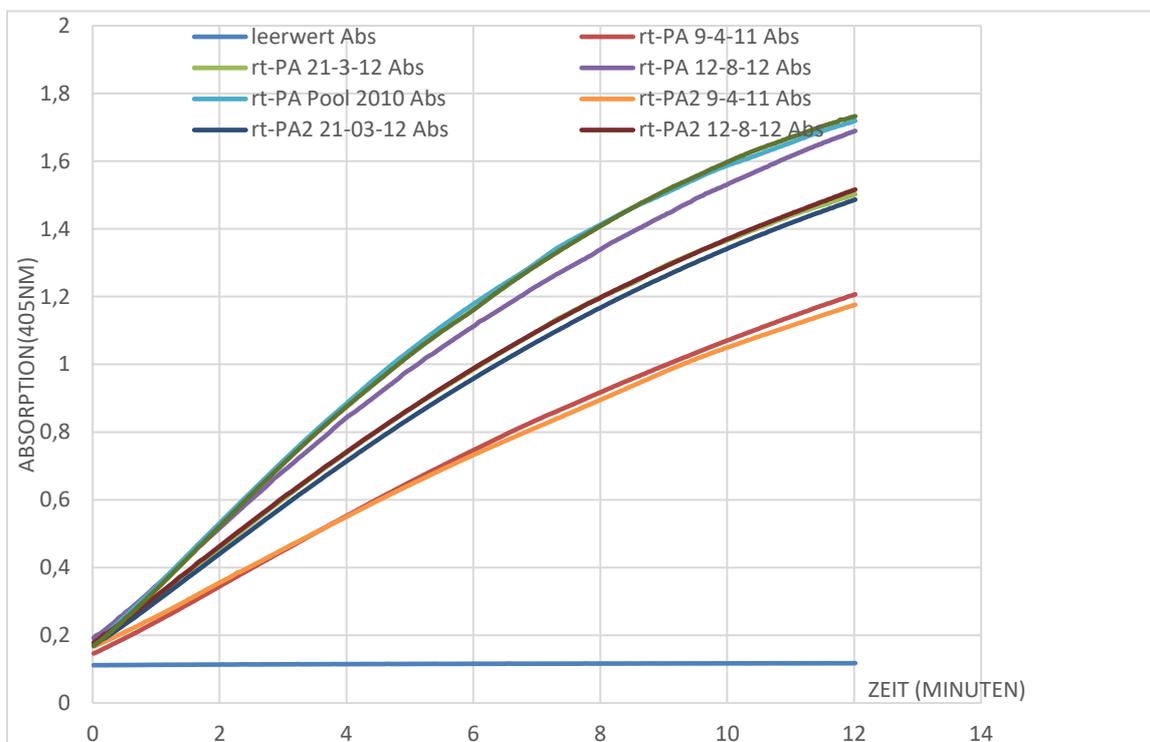


Abbildung 3 (Aktivitätsexperiment vom 31.08.2011): zeigt auf der Y-Achse eingetragen die Absorption des Medikaments und auf der X-Achse die Zeit in Minuten

Anschließend wurde die Absorption bei 405nm gemessen und so die Aktivität des Enzyms gemessen. Die Abbildung 3 zeigt die Aktivität verschiedener rt-Pa-Proben aus den Jahren 2010-2012. In dieser Abbildung ist die relativ gleiche Aktivitätsstärke der Proben zu sehen. Trotzdem wurde darauf geachtet kein rt-Pa zu verwenden, welches älter als ein Jahr war.

Um die 2 ml Eppendorf™-Gefäße zu füllen, wurden zunächst separat für jeden Thrombus in Plastikröhrchen (REF 55.486.001, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) die Lösung zusammen vermischt, in der der Thrombus für das Experiment eingebettet wurde. Auf Grund der fünfzehnminütigen Überführung des Thrombus mittels einer Pinzette wurden 4 Plastikröhrchen pro Thrombus benötigt.

Die Lösung setzte sich aus 2000 µl des zuvor gesammelten und gepoolten PFP und 60 µl HEPES-Puffer zusammen. Das rt-Pa wurde erst hinzugefügt, sobald die Überführung stattfinden musste. Dabei wurden pro Thrombus 200 µl rt-Pa mit einer Konzentration von 60 kU/ml benötigt (Roessler et al., 2014; Roessler et al., 2015). Bei der Experimentenreihe mit rt-Pa konnte man fünf Thromben pro Versuch benutzen. Dabei wurden zwei Thromben der Gruppe B (B1, B2), zwei Thromben der Gruppe A und ein Thrombus der Gruppe C verwendet. Um einen möglichen ungewollten Effekt des US zu überprüfen, wurde ein Thrombus der Gruppe B direkt neben den Platz der Gruppe C gesetzt und der andere der Gruppe B an den am weitesten entfernten Platz.

Mit diesem Wissen konnte man die benötigten Mengen errechnen:

- Gruppe B (B1, B2): 8x 2000 µl PFP + 8x 200 µl rt-Pa
- Gruppe C: 4x 2000 µl PFP + 4x 200 µl rt-Pa
- Gruppe A (A1, A2): 2x 2000 µl PFP

Für die Gruppe A wurden die Thromben lediglich mit gepuffertem Plasma behandelt, aber um mögliche Verletzungen bei der Überführung als Artefaktquelle bei der Thrombolysengeschwindigkeit zu berücksichtigen, wurden auch diese Thromben, genau wie die Gruppen D und E, fünfzehnminütig aus demgepufferten Plasma gehoben. Dadurch wurde sichergestellt, dass es zu einer identischen Behandlung aller Thromben kam, um mögliche Nebeneffekte wie die artifizielle Beschleunigung der Thrombolysen durch mechanische Manipulation in nur einer Gruppe zu minimieren.

2.5 Thrombolysenmessung mit DSPA

DSPA hat im Gegensatz zu rt-Pa eine Halbwertszeit von ungefähr 3 Stunden (Pacaroni et al., 2009). Deswegen musste man bei dieser Experimentenreihe mit dem Medikament den Thrombus nicht alle 15 Minuten in eine neue Lösung überführen. Trotzdem wurden diese Thromben ebenfalls, wie auch die der Gruppe A, alle 15 Minuten hochgehoben.

In vorherigen Dosisfindungsexperimenten (Roessler et al., 2015) wurde die optimale Konzentration und Menge von DSPA für dieses Experiment ermittelt. Dabei belief sich die finale Konzentration auf 2 µg/ml und die Menge, ebenfalls wie rt-Pa auf 200 µl pro Thrombus.

Genau wie bei der Experimentenreihe zuvor, konnte man fünf Thromben/Versuch nutzen. Analog zu rt-Pa ergaben sich zwei Thromben der Gruppe D, zwei der Gruppe A und einer der Gruppe E. Auch hier wurde ein Thrombus der Gruppe D nah des US platziert und der andere an dem am weitesten vom US entfernten Platz.

Die benötigten Mengen an Lösungen wurden berechnet:

- Gruppe D (D1, D2): 2x 2000 µl PFP + 2x 200 µl DSPA
- Gruppe E: 1x 2000 µl PFP + 1x 200 µl DSPA
- Gruppe A: 2x 2000 µl PFP

2.6 Ultraschall

Die Thromben wurden für eine Stunde einem Ultraschall ausgesetzt, welcher in der Klinik sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Zwecke genutzt wird. Dabei handelte es um ein Ultraschallgerät (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Andover, Mass., USA) mit 2-Mhz und einem colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus, welcher in der Klinik für transkraniale Bildgebungen zur Verfügung steht. Der jeweilige Grenzbereich der Bildübertragung und der Aliasschwelle wurde auf 100% und 0,25m/s festgesetzt. Den Angaben des Herstellers folgend wurde eine Intensität „spatial-peak temporal-average intensity (ISPTA)“ von 0,179 W/cm² erreicht. Dabei wurde eine Bandbreite der Schallbündelausrichtung (phased array) des Ultraschall-Transducers (Sonos 2500 (21202A); Hewlett-Packard, Andover, Mass., USA) zwischen 2,0 und 2,5MHz genutzt. Der Modus wurde auf einen colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus eingestellt. Damit die Ultraschallwellen die zu lysierenden Thromben erreichen, benutzte man einen Wassertank mit entgastem Wasser und positionierte den Ultraschallkopf 50mm von der Oberfläche des Thrombus, zu sehen in Abbildung 2. Der mechanische Index (MI onscreen) belief sich dabei auf 0,6.

2.7 Elektronenmikroskopie (EM)

Für die Rasterelektronenmikroskope (REM) wurden die unterschiedlichen Thrombengruppen (A-E) ohne den Buffy coat, welcher überwiegend Erythrozyten beinhaltet, hergestellt. Das elektronenmikroskopische Bildmaterial wurde mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. Ulrich Gärtner vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen bereitgestellt.

Die hergestellten Thromben wurden nach dem jeweiligen Experiment (Kontrollgruppe, mit rt-Pa oder DSPA sowie Ultraschallbehandlung) jeweils in 1,5% Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) und 1,5% Formaldehyd in 0,15M HEPES sowohl fixiert als auch konserviert und anschließend analysiert. Diese Proben wurden wiederum in 1% Osmiumtetroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert, in destilliertem Wasser gewaschen und danach in aufsteigenden Graden von Ethanol dehydriert und mittels CO² getrocknet. Die so entstandenen Einzelproben konnten anschließend befestigt werden. Für eine gute elektrische Leitfähigkeit der Einzelproben, welche wichtig für eine gute Kontrastierung des späteren Bildes ist, behalf man sich, indem man elektrisch leitende Schichten, im vorliegenden Fall Gold, auf die Oberfläche der Proben mit Sputtern aufträgt. Für die rasterelektronenmikroskopischen Bilder benutzte man das Elektronenmikroskop „Philips XL-30 scanning electron microscope“ (Philips, Hamburg, Deutschland).

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die Thromben jeweils in 1,5% Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) und 1,5 % Formaldehyd in 0,15M HEPES fixiert. Diese Proben wurden wie zuvor für die REM in 1% Osmiumtetroxid in bidestilliertem Wasser erneut fixiert und mit zur Hälfte gesättigtem Uranylacetat-Wasser (Merck) gefärbt. Dieses diente zur späteren Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie. Anschließend wurden die Proben in aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen (bis 100% Ethanol) dehydriert und schließlich in Agar 100 resin (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK) eingebettet. Mittels eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut E, Leica) konnten extrem dünne Schnittpräparate hergestellt werden. Zur Untersuchung dieser Schnittpräparate wurde ein Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 902) genutzt. In einer 2K slow-scan CCD Kamera (TRS; Tröndle, Moorenweis, Deutschland) konnten digitale Bilder gesichert werden.

Abschließend wurde eine semiquantitative Erfassung der Fibrinfilamenten-Dichte mittels einer Image J-Software zur Bestimmung des Prozentsatzes des Fibrins genutzt.

2.8 Berechnungen und Statistik

Mittels der Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) und des T-Tests wurde die statistische Signifikanz zwischen den Faktoren THROMBUSTYP (Thrombus mit oder ohne ASS), VERFAHREN (Keine oder zusätzliche Thrombolyse), MEDIKATION (DSPA oder rt-Pa) und ULTRASCHSCHALL (mit oder ohne Benutzung des US) in Bezug zum Gewichtsverlust berechnet. Die Messwerte und Abbildungen im Text sind festgelegt als Mittelwerte \pm Standardabweichung/Standardfehler des Mittelwertes. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe eines häufig genutzten Statistikprogramms (IBM SPSS, Version 21.0.1, IBM Armonk, NY/USA) durchgeführt. Das Signifikanzlevel betrug $p < 0,05$. Des Weiteren wurde die Effektstärke nach Cohens d berechnet und angegeben.

Bei der kleinen Anzahl der Daten und dem Mangel an normaler Verteilung wurde für die semiquantitative Erfassung der Fibrinfilamenten-Dichte in den TEM-Bildern eine parameterfreie Statistik für unabhängige Beispiele (Kruskal-Wallis-Test) gewählt. Anschließend wurden diese mit parameterfreien-post-hoc-Gruppen (Wilcoxon-Rangsummen-Test) verglichen.

3 Ergebnisse

Die Experimente der (Sono-)Thrombolysen der Thromben mit dem Zusatz von ASS fanden in dem Zeitraum Februar bis August 2013 statt. Die Vorbereitung dieser Experimente und auch die Experimente zur (Sono-)Thrombolysen der ASS-freien Thromben begannen bereits in dem Jahr 2012. Die Ergebnisse der (Sono-)Thrombolysen der Thromben ohne den Zusatz von ASS wurden bereits 2015 veröffentlicht (Roessler et al., 2015). Diese Daten wurden als Basis für die Analysen des Einflusses von ASS auf die (Sono-)Thrombolysen genutzt.

Insgesamt wurde das einstündige (Sono-)Thrombolysen-Experiment 66 Mal durchgeführt. Die Thromben wurden gemäß eines vorher erprobten Gerinnungsprotokolls (siehe 2.2) hergestellt. Noch vor dieser Thrombusherstellung fügte man ASS direkt dem Blut hinzu, welches in Citratröhrchen den Blutspendern abgenommen wurde. Für die Experimente wurden lediglich die in Deutschland am häufigsten vertretenen Blutgruppen A und 0 (Rhesusfaktor positiv) genutzt. Die hergestellten Thromben wurden jeweils am Folgetag für das einstündige Experiment verwendet. Dabei wurden folgende zu untersuchende Gruppen, alle jeweils mit dem ASS-Zusatz, eingeteilt:

- Gruppe A: Kontrollgruppe
- Gruppe B: rt-Pa
- Gruppe C: rt-Pa + Ultraschall (US)
- Gruppe D: DSPA
- Gruppe E: DSPA + Ultraschall (US)

Die Gesamtzahl der Thromben belief sich auf $n=238$. Gruppe A: $n=42$, Gruppe B: $n=68$, Gruppe C: $n=30$, Gruppe D: $n=68$, Gruppe E: $n=30$.

Bei dem genutzten Ultraschall handelte es sich um einen diagnostischen Ultraschall (US) (Sonos 2500; Hewlett-Packard, Andover, Mass., USA) in einem colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus mit 2-MHz-Wellen und einer Intensität (ISPTA, spatial-peak temporal-average intensity) von 0.179 W/cm^2 .

3.1 Deskriptive Statistiken

Jeweils vor und nach dem einstündigen Experiment wurden die Thromben gewogen. Anhand dieser Gewichte konnte anschließend die Thrombolyserate berechnet werden (Formel siehe Methodik).

Die aus den Gewichtswerten - vor und nach dem einstündigen Versuch gemessen - errechnete Thrombolyserate ist in Tabelle 1 aufgetragen.

Tabelle 1: Werte der Thrombolyse-Versuche

	Thromben-Gewichtsverlust (Thrombolyserate in %)			Anzahl (n) n = 433
	Mittelwert	Standardabweichung der Mittelwerte	Standardfehler der Mittelwerte	
Thromben ohne ASS				n = 195
A: Kontrollgruppe	18,18	5,89	0,94	39
B: rt-Pa	26,54	7,82	1,25	39
C: rt-Pa+ US	28,63	6,61	1,06	39
D: DSPA	30,45	5,95	0,95	39
E: DSPA +US	32,75	7,16	1,15	39
Thromben mit ASS				n = 238
A: Kontrollgruppe	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

Tabelle 1: Zu sehen ist der relative Gewichtsverlust der einzelnen Thrombengruppen (A-E), jeweils mit/ohne Zusatz von ASS. Die Daten zur Thrombolyse ohne ASS wurden bereits veröffentlicht (Roessler et al, 2015). ASS: Acetylsalicylsäure, DSPA: Desmoteplase, rt-Pa: rekombinanter Plasminogenaktivator, US: Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6). *Roessler et al., 2015, mit freundlicher Genehmigung.

Hier sind vergleichend die beiden Thrombentypen (ohne und mit ASS-Zusatz) in den jeweiligen Gruppen A-E aufgeführt. Zu sehen sind die Mittelwerte des relativen Gewichtsverlustes in %, die Standardabweichung und der Standardfehler der Mittelwerte (ebenfalls in %) sowie die Gruppengrößen. Zwischen den Thrombusgruppen (ohne und mit ASS) zeigt sich ein Unterschied der Mittelwerte und somit der Thrombolyserate. Die Kontrollgruppe hat bei den Thromben mit und ohne ASS die niedrigste Thrombolyserate. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Behandlungs-Thrombusgruppen (B-E) sind innerhalb

der Gruppen ähnlich, unterscheiden sich aber zwischen den Thrombusgruppen ohne oder mit ASS (vergleiche Abbildung 4).

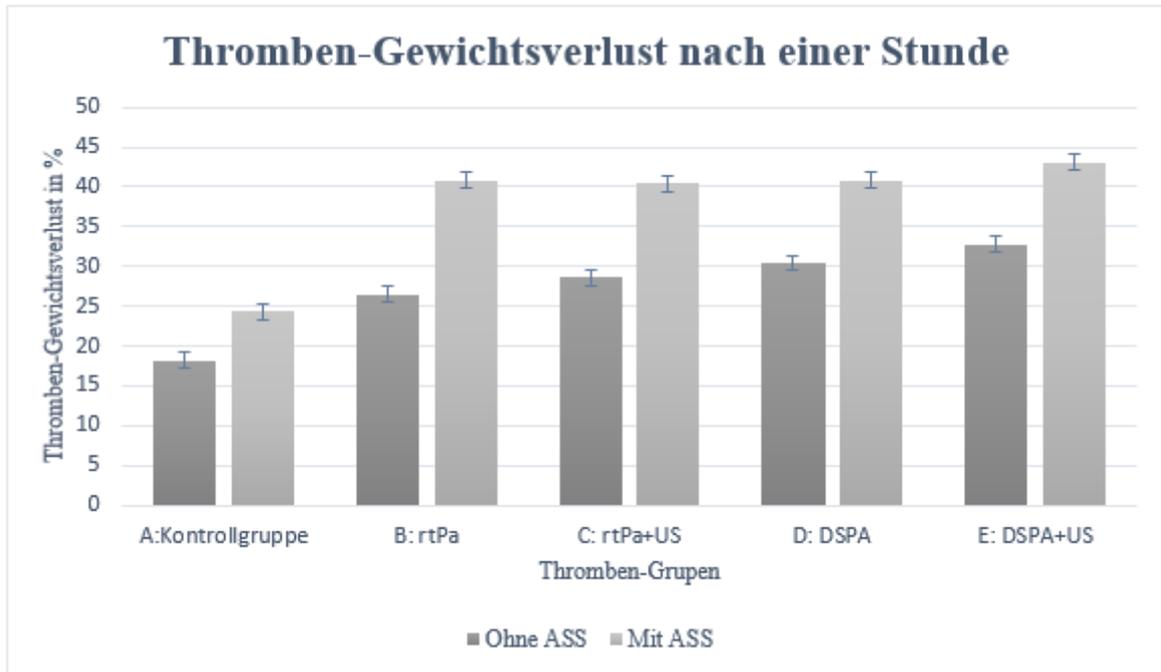


Abbildung 4: Ergebnisse des Thrombolyseexperimentes. Der Thrombus-Gewichtsverlust wurde nach einer Stunde in den Gruppen (A-E) gemessen, jeweils in der Thrombusgruppe ohne ASS (dunkelgrau) und mit ASS (hellgrau). Gruppe A stellt die Kontrollgruppe dar, in welcher die Thromben lediglich mit gepuffertem Plasma (pH= 7,4) behandelt wurden. Die Thromben B und C wurden mit rt-PA (60kU/ml) behandelt, die Thromben in den Gruppen D und E mit DSPA (2,0µg/ml). Zusätzlich wurde bei C und E Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6) zur der Behandlung hinzugefügt. Die Werte in dieser Abbildung sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. ASS: Acetylsalicylsäure, DSPA: Desmoteplase, rt-Pa: rekombinanter Plasminogenaktivator, US: Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6).

In der Abbildung 4 ist die Thrombolyserate in % als Mittelwert ± dem Standardfehler dargestellt. Zu sehen sind die Thromben ohne den Zusatz von ASS (dunkelgrau) und die Thromben mit ASS (hellgrau). Des Weiteren sind die einzelnen Behandlungs-Thrombengruppen (A-E) aufgeführt. Hier lassen sich die höheren Thrombolyseraten in den Thrombusgruppen mit ASS und die höheren Thrombolyseraten der Gruppen B-E im Vergleich zu Kontrollgruppe A anhand der Höhe der Säulen erkennen. Betrachtet man die dunkelgrauen und die hellgrauen Säulen in den einzelnen Gruppen, zeigt sich ungefähr gleiche Höhen und Thrombolyseraten innerhalb der dunkelgrauen und innerhalb der hellgrauen Säulen.

3.2 Univariate Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Test

Für eine Bewertung hinsichtlich einer möglich bestehenden Signifikanz der Ergebnisse wurden die univariate Varianzanalyse (ANOVA), sowie Scheffé als post-hoc Test genutzt. Es wurden einerseits die Ergebnisse innerhalb der Thrombusgruppe mit ASS-Zugabe analysiert und andererseits die Ergebnisse des aktuellen Experimentes mit ASS-behandelten Thromben mit den Ergebnissen aus der genannten vorherigen Studie ohne ASS-Zusatz verglichen (Roessler et al., 2015).

Für die ANOVA wurde Folgendes bewertet:

- THROMBUSTYP (ohne versus (vs.) mit ASS)
- BEHANDLUNGSTYP (keine vs. mit (Sono-)Thrombolysebehandlung)
- MEDIKATION (rt-Pa vs. DSPA)
- ULTRASCHALL (kein US vs. Ultraschallapplikation)

Es zeigte sich im Allgemeinen eine signifikant höhere (Sono-)Thrombolyserate bei den ASS-Thromben im Vergleich zu den ASS-freien-Thromben. THROMBUSTYP $F(1,423) = 149,6$; $p < 0,001$. Es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied bei beiden Thrombustypen in Bezug auf Behandlung vs. keine Behandlung, BEHANDLUNGSTYP $F(4,423) = 45,0$; $p < 0,001$ (siehe Tabelle 2).

Im post-hoc Test (Scheffé) konnte gezeigt werden, dass ein ASS-Zusatz in dem Fall einer nicht erfolgten (Sono-)Thrombolyse-Behandlung einen signifikanten Anstieg der Lyserate bewirkt ($p < 0,001$).

Tabelle 2: ANOVA für Thrombolyserate durch THROMBUSTYP und BEHANDLUNGSTYP

		n	Mittelwert Throm- bolyserate [%]	SD	F-Wert	p-Wert	Effekt-stärke [KI (95%)]
THROMBUSTYP	Ohne ASS	195	27,31	6,69	149,6	<0,001	d = 1,04 [0,84- 1,24]
	Mit ASS	238	37,88	9,85			
BEHANDLUNGS- TYP	Ohne Thrombolyse- behandlung	81	21,28	8,0	45,0	<0,001	d = 1,7 [1,43-1,97]
	Mit Thrombolyse- behandlung	352	35,43	8,34			

Tabelle 2: ASS: Acetylsalicylsäure, n: Anzahl, SD: Standardabweichung, KI: Konfidenzintervall, d: Maß für die Effektstärke nach Cohen. (d = 0,2-0,5 schwacher Effekt, d = 0,5-0,8 mittlerer Effekt, d ≥ 0,8 starker Effekt)

In Tabelle 2 und in den folgenden Tabellen 3 und 4 wird zudem die Effektstärke nach Cohen angegeben. Die Effektstärke zeigt, ob trotz statistisch hochsignifikanter p-Werte überhaupt ein relevanter absoluter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen vorliegt. Angegeben ist die Effektstärke nach Cohens d. Dementsprechend entspricht ein Cohens d zwischen 0,2 und 0,5 einem schwachen Effekt, zwischen 0,5 und 0,8 einem mittleren Effekt und größer/gleich 0,8 einem starken Effekt. In dieser Tabelle zeigt sich bei beiden bewerteten ANOVAs ein starker Effekt für die praktische Bedeutsamkeit. THROMBUSTYP Cohens d=1,04 und BEHANDLUNGSTYP Cohens d=1,7.

Separate ANOVA für THROMBUSTYP machen deutlich, dass eine Behandlung mit rtPa, DSPA oder zusätzlich Ultraschallapplikation in einen signifikanten Gewichtsverlust der Thromben resultiert, verglichen zu denen ohne Behandlung (Tabelle 3):

- ASS-freie-Thromben: $F(4,190) = 27,0$; $p < 0,001$ und post-hoc Scheffé keine Behandlung vs. jegliche Behandlung: $p < 0,001$
- ASS-Thromben: $F(4,233) = 24,6$; $p < 0,001$ und post-hoc Scheffé keine Behandlung vs. jegliche Behandlung: $p < 0,001$

Tabelle 3: SEPERATE ANOVA für THROMBUSTYP

		n	Mittelwert Thrombo- yserate [%]	SD	F- Wert	p- Wert	Effekt- stärke [KI (95%)]
ASS-freie Thromben	Ohne Thrombolyse- behandlung	39	18,18	5,89	27	<0,001	d = 1,7 [1,31-2,09]
	Mit Thrombolyse- behandlung	156	29,59	6,89			
ASS-Thromben	Ohne Thrombolyse- behandlung	42	24,37	10,05	24,6	<0,001	d = 1,7 [1,35-2,08]
	Mit Thrombolyse- behandlung	196	41,26	9,8			

Tabelle 3: ASS: Acetylsalicylsäure, n: Anzahl, SD: Standabweichung, KI: Konfidenzintervall.

Auch hier zeigt sich sowohl bei den ASS-freien Thromben, als auch bei den ASS-Thromben ein starker Effekt für die praktische Relevanz. Cohens d=1,7 für ASS-freie Thromben und für die ASS-Thromben.

Tabelle 4 zeigt eine dreifaktorielle ANOVA mit THROMBUSTYP, MEDIKATION und ULTRASCHALL, um mögliche signifikante Unterschiede bei MEDIKATION und ULTRASCHALL zu entdecken. Aufgrund dessen wurden die Daten für die Kontrollgruppen herausgenommen.

So konnten signifikante Effekte beim THROMBUSTYP $F(1,344) = 142,9$; $p < 0,001$ und MEDIKATION $F(1,344) = 7,6$; $p = 0,006$ aufgezeigt werden. Beim Faktor ULTRASCHALL blieb ein signifikanter Effekt aus $F(1,344) = 2,5$; $p = 0,113$.

Tabelle 4: Dreifaktorielle ANOVA mit THROMBUSTYP, MEDIKATION und ULTRASCHALL ohne Kontrollgruppe A

		n	Mittelwert Thrombo- lyserate [%]	SD	F-Wert	p-Wert	Effektstärke [KI (95%)]
THROMBUS-TYP	Ohne ASS	156	29,59	6,89	142,9	<0,001	d = 1,4 [1,12-1,59]
	Mit ASS	196	41,26	9,8			
MEDIKATION	rt-Pa	176	34,08	9,38	7,6	=0,006	d = 0,32 [0,02-0,62]
	DSPA	176	36,78	7,31			
ULTRASCHALL	Kein US	214	34,65	8,34	2,5	=0,113	-
	Mit US	138	36,2	8,29			

Tabelle 4: ASS: Acetylsalicylsäure, n: Anzahl, SD: Standardabweichung, KI: Konfidenzintervall, US: Ultraschall,

Betrachtet man Cohens d für den THROMBUSTYP ist auch hier wieder ein starker Effekt nach Cohen, zugunsten der ASS-Thromben zu sehen ($d=1,4$). Bei der ANOVA der MEDIKATION hingegen zeigt sich bei dem signifikanten Ergebnis ein schwacher Effekt (Cohens $d=0,32$).

3.3 T-Tests

Für einen exakten Vergleich der Ergebnisse wurden unterschiedliche T-Tests durchgeführt. Betrachtet man jede Thrombusgruppe für sich, ergeben sich unterschiedliche Daten.

3.3.1 ASS-freie-Thromben (siehe Tabelle 5):

Außerhalb des schon aufgeführten signifikanten Effekts bei BEHANDLUNGSTYP, konnte in dieser Versuchsreihe von 2015 dargestellt werden, dass sowohl ein signifikanter Effekt bei MEDIKATION F (1,152) = 13,2; $p < 0,001$ als auch bei ULTRASCHALL F (1,152) = 3,9; $p = 0,049$ zu beobachten ist.

Zur Differenzierung ob für rt-Pa oder DSPA bei MEDIKATION die höhere Thrombolyserate verzeichnet werden konnte, wurde ein vergleichender T-Test vollzogen. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass DSPA eine signifikant höhere Lyserate bewirkt als rt-Pa. $T(76) = 2,49$; $p = 0,015$.

Tabelle 5: T-Test für Mittelwertgleichheit ASS-freie Thromben

	Mittelwert Thrombolyserate [%]	Standardabweichung (Standardfehler)	df	T-Wert	p-Wert
rt-Pa	26,54	7,82 (1,25)	76	-2,487	0,015
DSPA	30,45	5,95 (0,95)			
DSPA	30,45	5,95 (0,95)	76	-1,543	0,127
DSPA+US	32,75	7,16 (1,15)			
rt-Pa	26,54	7,82 (1,25)	76	-1,275	0,206
rt-Pa+US	28,63	6,61 (1,06)			
rt-Pa+US	28,63	6,61 (1,06)	76	-2,643	0,010
DSPA+US	32,75	7,16 (1,15)			
rt-Pa	26,54	7,82 (1,25)	76	-3,660	<0,001
DSPA+US	32,75	7,16 (1,15)			
rt-Pa+US	26,54	6,61 (1,06)	76	-1,279	0,205
DSPA	30,45	5,95 (0,95)			

Tabelle 5: Dargestellt sind mehrere T-Test mit jeweils 2 Faktoren der Behandlungsgruppen, aufgeführt in der linken Spalte. Zu vergleichen sind die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Standardfehler.

df= Nennerfreiheitsgrade, ASS: Acetylsalicylsäure, DSPA: Desmoteplase, rt-Pa: rekombinanter Plasminogenaktivator, US: Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6).

Zur weiteren Beurteilung wurde in der Gruppe ULTRASCHALL ebenfalls ein T-Test durchgeführt, mit dem die Höhe der Sonothrombolyserate bei DSPA+US und ermittelt wurde. Auch der Vergleich rt-Pa + US zu DSPA +US zeigt eine höhere Lyserate zugunsten von DSPA+US, $T(76) = 2,6$; $p = 0,01$.

Es wurden zudem noch T-Tests für mögliche signifikante Unterschiede bei der Interaktion MEDIKATION und ULTRASCHALL durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten

Unterschiede bezüglich DSPA und DSPA+ US $T(76) = 1,5$; $p=0,127$ und bezüglich rt-Pa und rt-Pa+US $T(76) = 1,3$; $p=0,206$ festgestellt werden.

3.3.2 ASS-Thromben (siehe Tabelle 6):

Außerhalb des schon aufgeführten signifikanten Effektes bei BEHANDLUNGSTYP, konnten in dieser Versuchsreihe keine weiteren signifikanten Effekte gefunden werden. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Thrombolysenmethoden, Thrombolytika (rt-Pa und DSPA) sowie zusätzlicher Ultraschall-Behandlung.

Tabelle 6: T-Test für Mittelwertgleichheit ASS-Thromben

	Mittelwert Thrombo- lyserate [%]	Standardabweichung (Standardfehler) [%]	df	T-Wert	p- Wert
rt-Pa	40,76	11,21 (1,36)	125,576	-0,051	0,960
DSPA	40,85	8,60 (1,04)			
DSPA	40,85	8,60 (1,04)	96	-1,194	0,236
DSPA+US	43,02	7,52 (1,37)			
rt-Pa	40,76	11,21 (1,36)	96	0,145	0,885
rt-Pa+US	40,40	11,87 (2,17)			
rt-Pa+US	40,40	11,87 (2,17)	49,055	-1,020	0,313
DSPA+US	43,02	7,52 (1,37)			
rt-Pa	40,76	11,21 (1,36)	80,276	-1,167	0,247
DSPA+US	43,02	7,52 (1,37)			
rt-Pa+US	40,40	11,87 (2,17)	42,976	-0,187	0,853
DSPA	40,85	8,60 (1,04)			

Tabelle 6: Dargestellt sind mehrere T-Tests mit jeweils 2 Faktoren der Behandlungsgruppen. Diese Werte beziehen sich auf die Thromben mit dem Zusatz ASS. df= Nennerfreiheitsg. ASS: Acetylsalicylsäure, DSPA: Desmoteplase, rt-Pa: rekombinanter Plasminogenaktivator, US: Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6).

Zeigte sich bei den ASS-freien-Thromben noch ein signifikanter Unterschied bei MEDIKATION von DSPA im Vergleich zu rtPa, ist dieser Effekt bei den ASS-Thromben nicht mehr zu erkennen. $T(126) = 0,1$; $p=0,960$. Auch bei dem zuvor bewiesenen signifikanten Effekt von ULTRASCHALL bei DSPA+US im Vergleich zu rtPa+US, konnte kein signifikanter Unterschied mehr ausgewiesen werden. $T(49) = 1,0$; $p=0,313$.

Bereits in der ANOVA ließen sich signifikante Effekte beim THROMBUSTYP erkennen. Es wurden T-Tests mit den Gruppen A-E im direkten Vergleich von ASS-Thromben und ASS-

freien-Thromben durchgeführt. In jeder der Behandlungsgruppen A-E zeigten sich signifikante Effekte zugunsten der ASS-Thromben (Tabelle 7).

Tabelle 7: T-Test für Mittelwertgleichheit ASS-freien- Thromben und ASS-Thromben

		Mittelwert [%]	Standardabweichung (Standardfehler)	df	T-Wert	p-Wert
A: Kontrollgruppe	Ohne ASS	18,18	5,89 (0,94)	67,058	-3,349	0,001
	Mit ASS	24,37	10,05 (1,55)			
B: rt-PA	Ohne ASS	26,54	7,82 (1,25)	100,861	-7,697	<0,001
	Mit ASS	40,76	11,21 (1,36)			
C: rt-Pa+US	Ohne ASS	28,63	6,61 (1,06)	43,630	-4,880	<0,001
	Mit ASS	40,40	11,87 (2,17)			
D: DSPA	Ohne ASS	30,45	5,95 (0,95)	101,164	-7,360	<0,001
	Mit ASS	40,85	8,60 (1,04)			
E: DSPA+ US	Ohne ASS	32,75	7,16 (1,15)	67	-5,737	<0,001
	Mit ASS	43,02	7,52 (1,37)			

Tabelle 7: Dargestellt sind mehrere T-Tests mit den Faktoren ohne ASS/mit ASS in den Behandlungsgruppen A-E. df= Nennerfreiheitsgrade ASS: Acetylsalicylsäure, DSPA: Desmoteplase, rt-Pa: rekombinanter Plasminogenaktivator, US: Ultraschall (2MHz, 0,179 W/cm², MI 0,6).

3.4 Elektronenmikroskopische Bilder

Neben den statistischen Berechnungen wurden zudem die unterschiedlich behandelten Thromben mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Genutzt wurden die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Wenn man die elektronenmikroskopischen Bilder (Abbildungen 5 und 6) betrachtet, zeigt sich in den Bildern der ASS-Thromben ein lockeres dreidimensionales Fibrinnetzwerk. Bei den ASS-freien Thromben wirkt dieses hingegen kompakter.

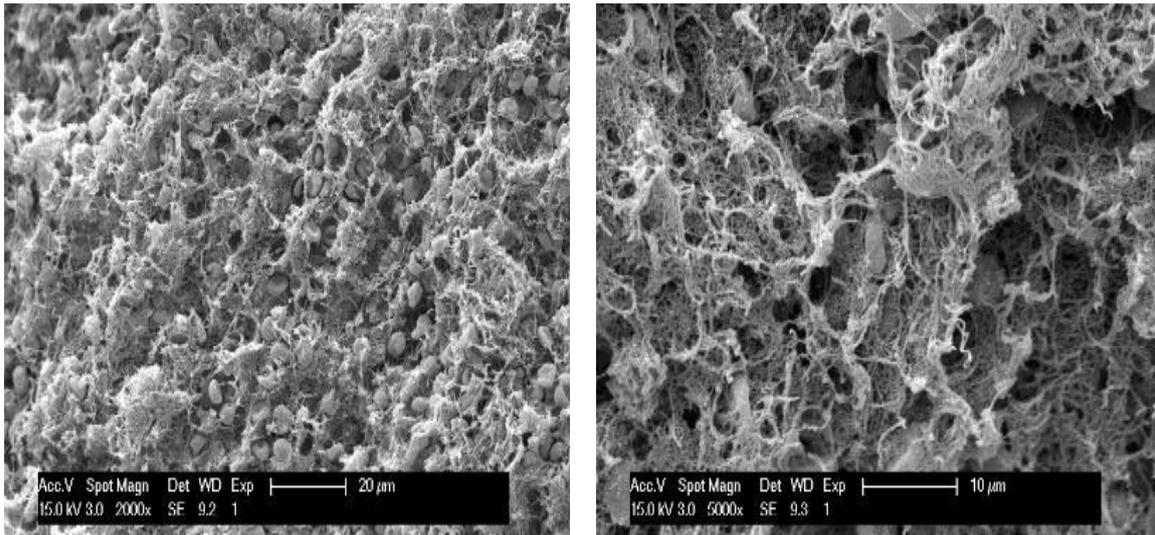


Abbildung 5: Thromben aus der Kontrollgruppe A. Links: Kontrollgruppe A ohne Zusatz von ASS. Fibrinnetzwerk kompakt. Rechts: Kontrollgruppe A mit Zusatz von ASS. Fibrinnetzwerk lockerer.

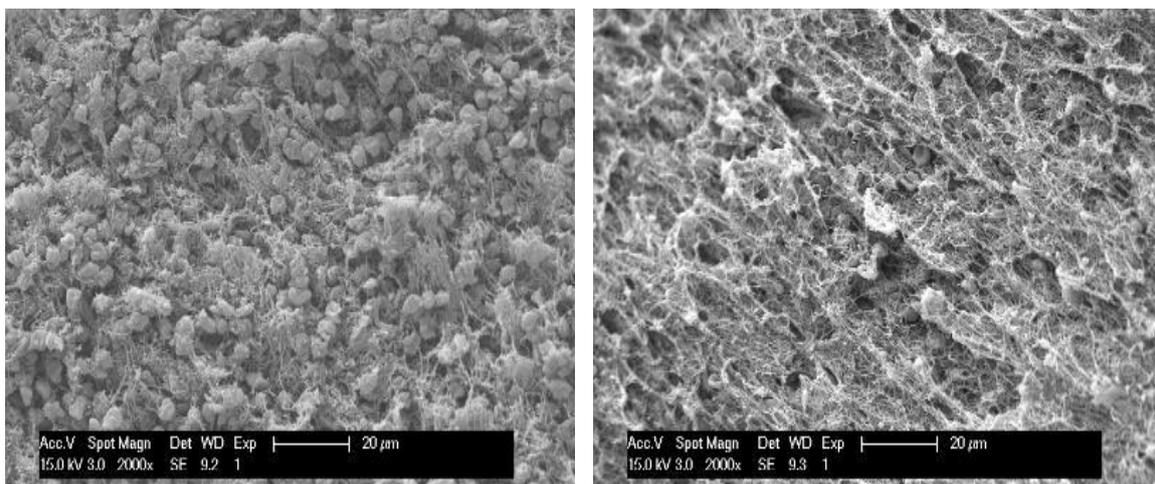


Abbildung 6: Thromben aus der Gruppe B (rt-Pa). Links: Gruppe B ohne Zusatz von ASS. Fibrinnetzwerk kompakt. Rechts: Gruppe B mit Zusatz von ASS. Fibrinnetzwerk lockerer.

In der Abbildung 7, in der die REM-Bilder zu sehen sind, sind sowohl die ASS-freien als auch die ASS-Thromben gegenübergestellt. Zusätzlich kann man die Kontrollgruppe A (keine Thrombolysebehandlung) und die Thrombengruppe E (DSPa+US) betrachten. Dabei zeigte sich ein deutlich aufgelockertes Fibrinnetzwerk bei der Gruppe E im Vergleich zur Gruppe A, in der sich das Fibrinnetzwerk kompakt und dicht darstellte. Betrachtet man zusätzlich die Unterschiede zwischen den ASS-freien Thromben und den ASS-Thromben, lässt sich das aufgelockerte Fibrinnetzwerk ebenso bei den ASS-Thromben feststellen, selbst in der Gruppe A ohne sonstige Thrombolysebehandlung.

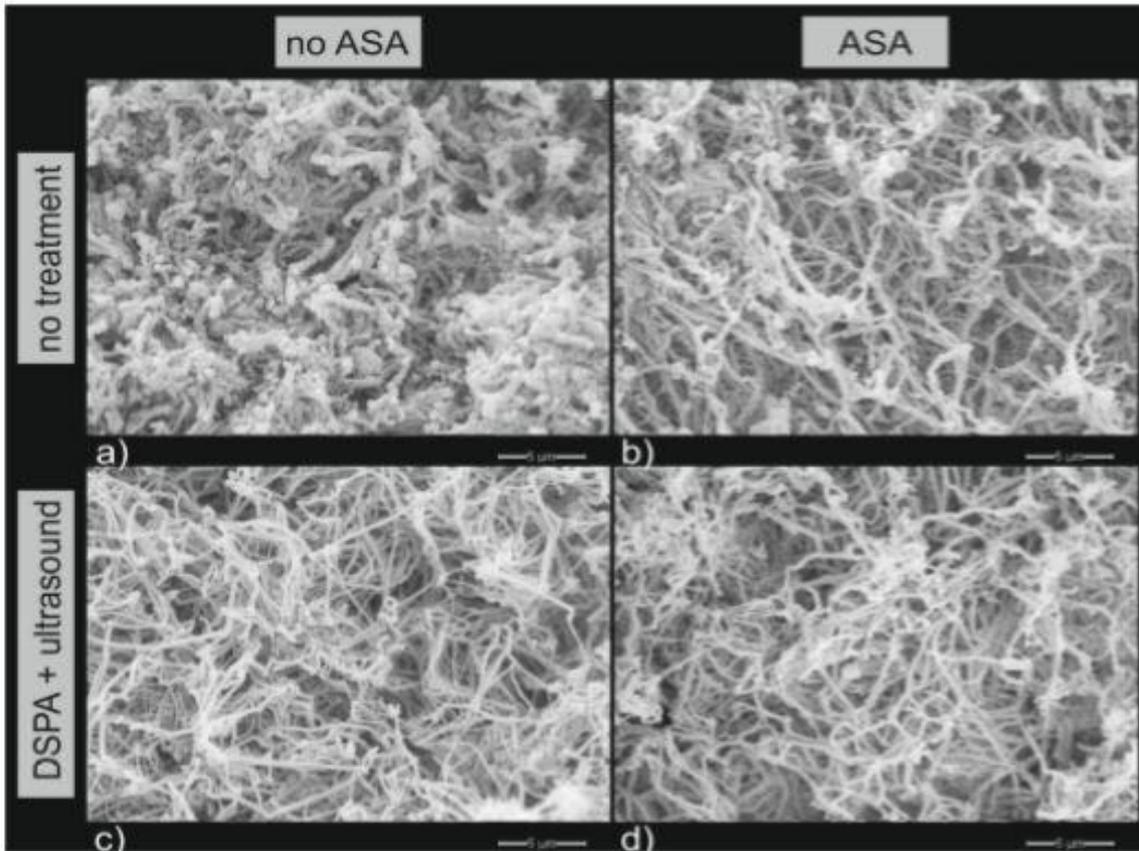


Abbildung 7: Rastelektronenmikroskopie. Die Bilder a) und b) zeigen die Kontrollgruppe A. a) ohne den Zusatz von ASS und b) mit dem Zusatz von ASS. Die Bilder c) und d) zeigen die Gruppe E (DSPA+US). c) ohne den Zusatz von ASS und d) mit dem Zusatz von ASS.

Die Abbildung 8 mit den TEM-Bilder erbrachte die gleichen Erkenntnisse. Auch hier sind sowohl die ASS-freien Thromben und die ASS-Thromben im Vergleich mit den Thrombengruppen A und E zu sehen. Zusätzlich wurde anhand der TEM-Bilder eine semiquantitative Analyse durchgeführt. Dabei bestätigte sich zunächst, dass sich der prozentuale Anteil von Fibrin signifikant in allen Thrombengruppen unterscheidet ($p=0,005$). In paarweisen post-hoc Tests wurde festgestellt, dass lediglich ein signifikanter Unterschied der ASS-Thromben in der unbehandelten Kontrollgruppe A war ($p=0,029$). Hier konnte man signifikant weniger Fibrin feststellen. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Fibrinmenge zwischen der Kontrollgruppe A und der Gruppe E (DSPA+US) und dieses sowohl bei den ASS-freien Thromben als auch bei den ASS-Thromben (ASS-Thromben: $p=0,029$ und ASS-freie Thromben: $p=0,029$).

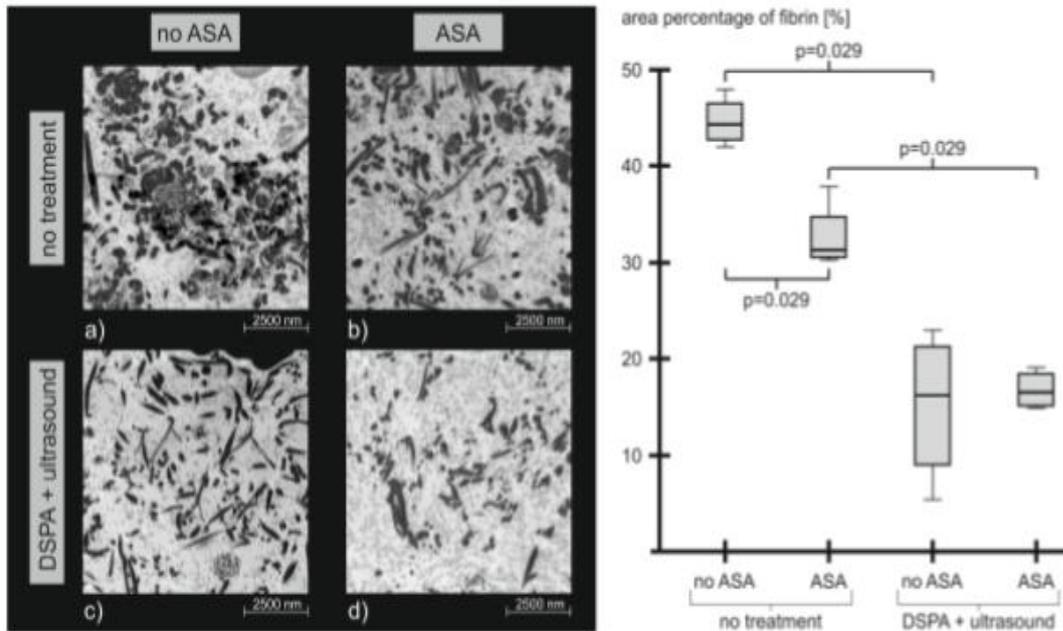


Abbildung 8: Transeletronenmikroskopie. Entsprechend den REM-Bildern in Abbildung 6. a) und b) Kontrollgruppe A, jeweils ohne ASS (a) und mit ASS (b). c) und d) Gruppe E (DSPA+US), jeweils ohne ASS (c) und mit ASS (d). Zusätzlich Boxplot mit der Menge an Fibrin in Prozent (%). Dargestellt sind paarweise Vergleiche der Kontrollgruppe A (mit und ohne ASS) und Gruppe E (mit und ohne ASS). Es wurde eine semiquantitative Analyse für die TEM-Bilder durchgeführt (n=4).

Von einem qualitativen Blickpunkt aus ist anzunehmen, dass ebenfalls große Unterschiede zwischen den anderen Thrombengruppen besteht (siehe auch weitere REM-Bilder im Anhang, Abbildungen 2- 7) allerdings konnte dieses nicht in statistischen Berechnungen bewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung Ergebnisse

In der vorliegenden in-vitro-Studie war es das Ziel, herauszufinden inwiefern ASS als Prämedikation einen Einfluss auf unterschiedliche Behandlungsstrategien der Thrombolyse beim akuten Schlaganfall hat. Es sollte zudem eine Verknüpfung zwischen den bereits beobachteten in-vitro-Einflüssen von ASS auf die Thrombusstruktur und den Einfluss von ASS als Prämedikation in klinischen Beobachtungen im Rahmen einer Thrombolyse beim akuten Schlaganfall hergestellt werden.

Mit den Experimenten der (Sono-) Thrombolyse wurden verschiedene Behandlungsstrategien bei ischämischen Schlaganfällen in-vitro untersucht. Dabei handelte es sich um bewährte Behandlungen mit rt-PA im Vergleich zu möglichen zukünftigen Behandlungen (rt-PA+US; DSPA; DSPA+US). Zudem wurde der Einfluss von ASS auf die (Sono-) Thrombolyse untersucht. Als Basis für die Analysen des Einflusses von ASS wurden die Ergebnisse aus der Veröffentlichung aus dem Jahr 2015 genutzt (Roessler et al., 2015).

Insgesamt wurden 238 Thromben aus dem Blut vom Blutspendern hergestellt und unterschiedlichen Behandlungsstrategien unterworfen. Dabei zeigte sich, dass jegliche Thrombolyse-Behandlung im Vergleich zu nicht erfolgter Behandlung eine signifikant höhere Lyserate ($p < 0,001$) bewirkt. Zwischen den einzelnen Behandlungsstrategien konnten bei den Thromben mit dem Zusatz von ASS keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei der Untersuchung des Einflusses von ASS auf die (Sono-) Thrombolyse ließ sich feststellen, dass ASS im Vergleich zu den Thromben ohne den Zusatz von ASS signifikant höhere Lyseraten bewirkt ($p < 0,001$).

4.2 rt-PA vs. DSPA

In den aufgezeigten Ergebnissen wird deutlich, dass jede Thrombolysemethode effektiver ist, als keine Therapie. Dabei zeigten sich hochsignifikante Ergebnisse, sowohl bei den hergestellten Thromben ohne ASS, als auch bei den Thromben mit ASS (jeweils $p < 0,001$; siehe Tabelle 3). Auch die praktische Relevanz, gemessen anhand der Effektstärke nach Cohen war eindeutig hinsichtlich eines starken Effektes ($d = 1,7$; siehe Tabelle 3).

Aktuell ist die einzig bewährte medikamentöse Therapie in der Behandlung des akuten Schlaganfalls der intravenös verabreichte rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator (rt-Pa) (Khandelwal et al., 2016; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015). Der rekombinante gewebespezifische Plasminogenaktivator wird gentechnisch hergestellt und weist die gleichen Eigenschaften auf, wie der physiologische gewebespezifische Plasminogenaktivator (Zarmarron et al., 1983). Für die Therapie mit rt-Pa ist es wichtig zu beachten, dass eine sehr kurze Halbwertszeit von 3-9 Minuten besteht (Cloninger und Crabbe, 1987), sodass bei der intravenösen Behandlung 10% der Gesamtdosis (0,9mg/kg KG; max. 90mg) als Bolus und die restliche Dosis über 60min als Infusion verabreicht wird (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Ergänzung 2015). Dieses wurde im vorliegenden Versuchsaufbau ebenfalls berücksichtigt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von rt-Pa wurde die Lösung von gepuffertem Plasma und rt-Pa während des einstündigen Experiments alle 15 Minuten erneuert.

Heutzutage ist der akute Schlaganfall der Hauptgrund für eine dauerhafte körperliche und/oder geistige Beeinträchtigung weltweit. Zudem gehört er mit zu den führenden Ursachen von Mortalität (Khandelwal et al., 2016). Aufgrund dessen ist eine effiziente Therapie des akuten Schlaganfalls und ebenso eine hohe Zugänglichkeit zu dieser Therapie so wichtig. Betrachtet man die heutigen Statistiken, liegt bei der Möglichkeit für den Beginn einer Therapie ein größeres Problem vor. Aufgrund des knappen Zeitfensters von 4,5 Stunden erhalten nur wenige Patienten die intravenöse Behandlung mit rt-Pa. Dabei beläuft sich die Prozentzahl zwischen 3-5 %, die eine intravenöse Behandlung mit rt-Pa erhalten (Khandelwal et al., 2016; Ren et al., 2017).

Die thrombolytische Wirkung von rt-Pa ist unumstritten und ist die heutige Standardtherapie in den Leitlinien. Auch in den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich diese große thrombolytische Wirkung von rt-Pa im Vergleich zu nicht erfolgter Thrombolysebehandlung (Abbildung 4; Tabelle 1). Aber aufgrund limitierender Faktoren von rt-Pa (kurze Halbwertszeit, Zeitfenster der Behandlung, niedrige Fibrinspezifität und somit Blutungsrisiken) wurden Alternativen für eine medikamentöse Lysetherapie gesucht. Andere Fibrinolytika wie zum Beispiel Streptokinase zeigten zu hohe Blutungskomplikationen, um als Alternative in Betracht gezogen zu werden (Donnan et al., 1995; Hommel et al., 1995). In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurde DSPA als alternatives Fibrinolytikum benutzt.

Für die Experimente mit dem statischen Modell wurden im Vorfeld bereits weitere Experimente zur Dosisfindung von DSPA 2015 durchgeführt. Es zeigte sich in diesen

durchgeführten Experimenten ein Ceiling-Effekt nach einer Stunde bei einer DSPA-Konzentration von 2,0 µg/ml (Roessler et al., 2015). Diese Konzentration von 2,0µg/ml wurde dementsprechend auch für die folgenden Lyse-Experimente am statischen Modell genutzt. Somit liegt die ermittelte Konzentration in demselben Bereich der Konzentration von DSPA, welche in der klinischen Studie DEDAS zur Dosisfindung von DSPA getestet wurden: 90µg/kg KG vs. 125µg/kg KG (Furlan et al., 2006). Nimmt man nun ein Blutvolumen von 5000ml an und berechnet die Konzentrationen von DSPA 90µg/kg KG und 125µg/kg KG anhand der Nadlers Formel (Annahme: männliches Geschlecht, 70kg und 180cm), können äquivalente Dosen von 1,26µg/ml und 1,75µg/ml berechnet werden (Nadler et al., 1962).

Aufgrund der wesentlich längeren Halbwertszeit von DSPA von ungefähr 3 Stunden (Medcalf, 2012), wurde die Lösung aus gepuffertem Plasma und DSPA anders als die mit rt-Pa während des einstündigen Experiments nicht laufend erneuert.

Mittlerweile wurden einige klinischen Studien (DIAS I-IV) bezüglich der Effektivität von DSPA, welches in diesen Studien innerhalb von 3-9 Stunden gegeben wurde, durchgeführt (Hacke et al., 2005; Hacke et al., 2009; Kummer et al., 2012). Die Datenlage in diesen Studien zeigte sich insgesamt widersprüchlich. In den Ergebnissen dieser Studie (Abbildung 4) ließ sich aufzeigen, dass die thrombolytische Aktivität von DSPA in der Abwesenheit von ASS signifikant höher ist, als im Vergleich zu rt-Pa (ohne Ultraschall $p=0,015$, mit Ultraschall $p=0,01$; Tabelle 5 im Ergebnisteil). Das mag sowohl an der höheren Spezifität für fibrinogen gebundenes Plasminogen als auch an der längeren Halbwertszeit liegen (Medcalf, 2012; Paciaroni et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren in-vitro-Experimenten und in Tiermodellen nachgewiesen (Roessler et al., 2015; Schleuning et al., 1992; Witt et al., 1994).

Unter Anwendung von ASS verschwanden die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Thrombolysebehandlungen. Behandlungen mit DSPA und rt-Pa zeigten nun keine signifikanten Unterschiede mehr (ohne Ultraschall $p=0,960$, mit Ultraschall $p=0,313$; siehe Tabelle 6). Es fand sich lediglich der bereits aufgeführte signifikante Effekt bei der Unterscheidung jegliche Behandlung vs. nicht erfolgter Behandlung.

4.3 ASS verändert die Thrombusstruktur

Die Thromben der vorliegenden in-vitro-Studie, welche unter Hinzugabe von ASS hergestellt wurden, zeigten signifikant höhere Lyseraten in allen Gruppen A-E im Vergleich

zu den Thromben ohne ASS ($p < 0,001$; Tabelle 4). Wie bereits beschrieben, verschwinden zudem die signifikanten Unterschiede der unterschiedlichen Thrombolysenmethoden mit DSPA oder rt-Pa. Bestehen bleibt lediglich der signifikante Unterschied zwischen jeglicher Behandlung vs. nicht erfolgter Behandlung. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich zugunsten jeglicher Behandlung.

Die bekannte Wirkung des Thrombozytenaggregationshemmers ASS besteht in der irreversiblen Hemmung der Thrombozyten und somit ihrer Interaktion. Diese Inhibierung erfolgt durch die Acetylierung des bei den Thrombozyten vorkommenden Enzyms Cyclooxygenase-1 (COX-1). Diese Acetylierung bewirkt eine Hemmung des Enzyms woraus eine fehlende Synthese des Thromboxan A_2 resultiert. Thromboxan A_2 wiederum ist von entscheidender Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung und -aggregation in der primären Hämostase. Dabei kann das Enzym in kernlosen Zellen, wie den Thrombozyten nicht erneuert werden sodass die Inhibierung der Thrombozyten 7-10 Tage andauert und wiederum der Lebensdauer eines Thrombozyten entspricht (Meier und Oelz, 1989). Dieses gilt als Hauptwirkung von ASS und wird aufgrund dieses Kenntnis im Rahmen der Sekundärprophylaxe bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt.

Doch scheint das nicht der einzige Effekt von ASS bei der Regulation der physiologischen Blutgerinnung zu sein. Verschiedene Studien konnten beweisen, dass zusätzlich zur Hemmung der primären Hämostase, ASS auch in die Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase eingreift:

Beispielsweise fanden Ajjan et al. (2009) heraus, dass ASS zusätzlich zur Acetylierung der COX ebenfalls eine Acetylierung des Gerinnungsfaktors I, dem Fibrinogen bewirkt. Fibrinogen ist ein Glykoprotein, welches aus 6 Polypeptidketten besteht: 2α , 2β und 2γ . Diese Polypeptide bilden, verbunden durch Disulfid-Brücken, ein Hexamer (Ajjan und Grant, 2005). Ein schematischer Aufbau des Fibrinogenmoleküls ist im Anhang 7.1 Abbildung 1 zu sehen.

Im Rahmen der physiologischen Blutgerinnung wird Fibrinogen in Fibrinmonomere durch das mittels der Gerinnungskaskade aktivierte Thrombin (Gerinnungsfaktor IIa) gespalten. Hierbei bindet Thrombin an Fibrinogen und setzt über Abspaltung der Aminosäuren-Enden der α - und der β - Untereinheit die Fibrinopeptide A und B frei, woraufhin Fibrin entsteht und die Thrombusformation beginnt.

Zudem werden diese Fibrinmonomere mit Hilfe des aktivierten Faktors XIIIa zu einem dreidimensionalen Fibrinnetzwerk quervernetzt, woraus ein stabiler Thrombus entsteht.

ASS bewirkt eine Acetylierung der α - Untereinheit des Fibrinogens, welches in einer in-vitro-Studie mittels eines monoklonalen Antikörpers bewiesen werden konnte (Ajjan et al., 2009). Folge der Acetylierung durch ASS ist eine gestörte Kernladungsverteilung und somit

eine Strukturveränderung der Proteinoberfläche des Fibrinogenmoleküls (Ajjan et al., 2009). Eine Acetylierung der anderen Untereinheiten scheint möglich, konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Diese Veränderungen der Protein-Oberfläche des Fibrinogens resultieren in einer Zunahme der Dicke der Fibrinmonomere. In verschiedenen in-vitro-Studien wurde herausgefunden, dass durch diese Verdickung der Fibrinfilamente wiederum ein lockeres dreidimensionelles Fibrinnetzwerk während der Thrombusbildung entsteht (Collet et al., 2000; He et al., 2009). Wichtig bei dieser Veränderung ist die Entstehung eines weniger kompakten Fibrinnetzwerkes und die Anzahl der eingebauten Fibrinfilamente. Die Dicke der Filamente allein erbringt keine Änderung der Fibrinolyse. Individuell lassen sich sogar dünnere Fibrinfilamente schneller lysieren als dickere Fibrinfilamente (Collet et al., 2003).

Zusätzlich zur Wirkung auf Fibrinogen wird vermutet, dass sich ASS ebenfalls auf den Gerinnungsfaktor XIII durch eine reduzierte Aktivierung und damit durch eine inkomplette Quervernetzung des Fibrinthrombus auswirkt (Ajjan und Grant, 2005). Der Faktor XIII, welcher ebenfalls durch Thrombin aktiviert wird, ist für die Quervernetzung der Fibrinmonomere an den α - und γ -Untereinheiten durch kovalente Bindungen entscheidend. Durch den Faktor XIII entsteht ein stabiler Fibrinthrombus, welcher vor dem fibrinolytischen Abbau durch Plasmin geschützt ist (Sicker und Hilgenfeld, 2002). Durch die Vermutung der inkompletten Quervernetzung würde die Lockerheit des Fibrinnetzes verstärkt werden.

Inwiefern sich ASS auf den Faktor XIII auswirkt, konnte noch nicht genau ermittelt werden, aber es zeigte sich in einer Studie aus dem Jahr 2003 eine Inhibierung des Faktors XIII durch ASS und somit eine Veränderung der Thrombusstruktur (Undas et al., 2003).

Gleichzeitig ist es sehr interessant, dass gerade Menschen, die eine genetische Veränderung des Gerinnungsfaktors XIII besitzen (XIII^{34Leu}-Variante) besonders gut auf eine ASS-Therapie ansprechen, die in einer geringeren Aktivierung des Gerinnungsfaktors resultiert (Ajjan und Grant, 2005; Undas et al., 2003). Die Häufigkeit in der Bevölkerung beläuft sich auf 25% (Undas et al., 2003). Undas et al. fanden heraus, dass ASS signifikant die Aktivierung von Faktor XIII bei den 34Leu-Trägern im Vergleich zu den nicht-Trägern verringert ($p=0,0009$), welches wiederum in einer inkompletten Quervernetzung des Fibrins mit entsprechender Lockerheit resultiert (Undas et al., 2003). Man weiß, dass gerade Menschen mit Polymorphismus eine Fibrinstruktur mit dünneren Fibrinfilamenten und kleineren Poren aufweisen. Unerwartet ist jedoch, dass diese Menschen scheinbar vor kardiovaskulären Ereignissen geschützt sind (Ajjan et al., 2005). Dieses würde der bereits zuvor genannten Entdeckung von Collet et al entsprechen, die betonen, dass die Dicke der Fibrinfäden allein keine Änderung der Fibrinolyse erbringt, sondern vor allem das weniger kompakte Fibrinnetzwerk (Collet et al., 2003).

Zu betonen ist, dass die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrinfilamenten und die Thrombusbildung durch ASS nicht beeinflusst wird. Selbst die Zeit der Gerinnung bis zur Thrombusbildung wird nicht durch die ASS-Wirkung auf das Fibrinogen verlängert (He et al., 2009). Dieses spiegelte sich auch in der vorliegenden in-vitro-Studie wider. Die Thromben, sowohl ohne als auch mit dem Zusatz von ASS, hatten sich gemäß des in dieser Studie verwendeten standardisierten Gerinnungsprotokolls (siehe 2.2) nach einer Stunde zu einem stabilen Thrombus entwickelt. Es machte sich makroskopisch bereits vor den durchgeführten (Sono-) Thrombolysetherapien eine geringere Rigidität bei den Thromben mit dem Zusatz von ASS bemerkbar, welches durch ein lockeres dreidimensionales Netzwerk erklärbar wäre und auch in anderen Studien bemerkt wurde (He et al., 2001).

Dieser makroskopische Eindruck konnte durch qualitative und semi-quantitative Auswertungen in der durchgeführten Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt werden (siehe Abbildungen 5-8 und Anhang Abbildungen 2-7). Genau wie bereits in anderen in-vitro-Studien (Ajjan et al., 2009; He et al., 2009), zeigte sich bei den REM- und TEM-Bildern ein deutlich lockeres Fibrinnetzwerk bei den hergestellten Thromben mit dem Zusatz von ASS im Gegensatz zu denen ohne ASS. Ajjan et al. und Stanford et al. konnten ebenfalls eine Dickenzunahme der Fibrinfilamente in ihren REM-Bildern nachweisen (Ajjan et al., 2009; Stanford et al., 2015).

Ähnliche Effekte konnten in der Studie von Ajjan et al. zusätzlich in-vivo nachgewiesen werden. Es wurden drei gesunden Probanden für insgesamt sieben Tage täglich 150mg ASS verabreicht. Vor Beginn der ASS-Einnahme und nach Beendigung der sieben Tage wurde jeweils Blut von den drei Probanden entnommen. Es zeigten sich auch hier in den REM-Bildern ein deutlich lockeres Fibrinnetzwerk und eine Zunahme der Fibrinfilamente von $56 (\pm 2,6)$ nm auf $139,1 (\pm 5,5)$ nm, $p < 0,05$ (Ajjan et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus der Acetylierung von Fibrinogen und der Inhibierung von Faktor XIII eine Zunahme der Dicke der Fibrinfilamente mit einem weniger kompakten Fibrinnetzwerk und eine inkomplette Verbindung zwischen den Fibrinfilamenten mit größerer Durchlässigkeit resultiert. Das führte zu der Annahme, dass durch diese Veränderungen in der Fibrinstruktur und damit Veränderung in der Thrombusstruktur, diese weniger resistent gegenüber einer (Sono-) Thrombolysetherapie sind.

4.4 Fibrinolyse wird durch die Fibrinstruktur beeinflusst

Aufgrund des beschriebenen durch ASS hervorgerufenen lockeren Fibrinnetzwerkes ging die Studie davon aus, dass Plasminogenaktivatoren wie rt-PA und DSPA tiefer in den Fibrinthrombus eindringen können. Des Weiteren sollten dickere Fibrinfilamente eine größere Angriffsfläche für die Plasminogenaktivatoren darstellen und somit die Thrombolyse rate erhöhen (Abbildung 8 im Anhang). Dieses würde die signifikant höheren Thrombolyse rates bei den Thromben mit ASS im Vergleich zu den Thromben ohne ASS erklären. Dieses war selbst bei den Kontrollgruppen ohne zusätzliche (Sono-)Thrombolyse sichtbar.

Ähnliches konnte auch in der Studie von Ajjan et al. nachgewiesen werden. Es wurde eine durch hinzugegebenes Plasmin aktivierte Fibrinolyse gemessen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Lyse rate (bis $50\% \pm 3\%$) sowohl bei der in-vitro-Studie mit ASS, als auch in der kleineren bereits im oberen Abschnitt beschriebenen in-vivo-Studie (Ajjan et al., 2009). Man ging auch dort von einer erhöhten Lyse rate aufgrund des weniger kompakten Fibrinnetzwerkes aus.

Die dieser Studie zugrunde liegende Annahme, dass Plasminogenaktivatoren von einem weniger kompakten Fibrinnetzwerk aufgrund einer größeren Angriffsfläche profitieren, wurde auch in anderen Studien untersucht. In einer in-vitro-Studie von 1992 wurde Fibrinogen, welches aus menschlichem Plasma extrahiert wurde, künstlich so modifiziert, dass ein Fibrin mit wesentlich dünneren Fibrinfilamenten entstand und dieses mit einem nicht-modifizierten Fibrin verglichen werden konnte. Diese Fibrin-Varianten kamen mit einem Plasmin-Assay in Kontakt. So konnte man die Aktivierung von Plasminogen durch physiologisch vorkommendes t-Pa und damit die eingeleitete Fibrinolyse nachmessen. Es zeigte sich, dass die Fibrinolyse abhängig von der Fibrinstruktur ist. Das modifizierte Fibrin mit den dünneren Fibrinfilamenten konnte langsamer lysiert werden als die dickeren Fibrinfilamente (Gabriel et al., 1992). Man ging davon aus, dass die Aktivierung von Plasminogen durch t-Pa proportional zur Fibrinfilamenten-Dicke zunimmt, da dort eine größere Bindungsfläche des Plasminogens an die Fibrinfilamente besteht. Auch He et al. gingen davon aus, dass dickere Fibrinfilamente eine größere Kontaktfläche mit einer höheren Anzahl an Bindungsstellen für Plasminogen und t-Pa aufweisen. Zusätzlich wurde eine kürzere Thrombolysezeit aufgrund einer Grobporigkeit des Fibrinnetzwerkes festgestellt (He et al., 2009). Somit findet sich in den Studien bezüglich des Zusammenhangs zwischen Dicke der Fibrinfäden und dessen Lysierbarkeit noch kein Konsens (Collet et al., 2003; He et al., 2009).

Bemerkenswert ist, dass sich die Plasminogenbindungsstelle an der α_2 -Untereinheit des Fibrinogens befindet (Gabriel et al., 1992). Diese Untereinheit erfährt die von He et al. herausgefundene Acetylierung durch ASS und resultiert damit in einer Änderung der Fibrinstruktur (He et al., 2009). Hieraus könnte man schließen, dass gerade diese empfänglicher für Plasminogen und somit für fibrinspezifische Plasminogenaktivatoren wird. Eventuell lassen sich etwaige Unterschiede der Thrombolyseeigenschaften zwischen den Medikamenten dadurch ausgleichen.

In mehreren in-vitro-Studien wurde eine kürzere Thrombolysezeit aufgrund der ASS-Zugabe und somit einer höheren Anfälligkeit für eine Thrombolyse bei Hinzufügen von exogenen t-Pa nachgewiesen (Gabriel et al., 1992; Williams et al., 1995).

In der vorliegenden Studie konnte ASS als wichtiger Faktor für eine Zunahme der Thrombolyserate festgestellt werden. Dies konnte sowohl in den Berechnungen, als auch in den TEM- und REM-Bildern mit einem ausgeprägten thrombolytischen Effekt bei DSPA im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit ASS nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 8). Hierbei erhöht ASS die Thrombolyserate so sehr, dass die in der vorherigen Studie bewiesenen Unterschiede zwischen den (Sono-)Thrombolysestrategien (Roessler et al., 2015) aufgehoben werden. ASS verursacht einen Ceiling-Effekt für die Faktoren MEDIKATION und ULTRASCHALL.

Diese Ergebnisse stimmen mit verschiedenen in-vitro (Ajjan et al., 2009; He et al., 2001; He et al., 2009) und in-vivo-Studien (Antovic et al., 2005; Fatah et al., 1996) überein.

Man kann demnach annehmen, dass ASS in-vivo einen wichtigen Faktor für eine (Sono)-Thrombolysetherapie im Rahmen eines Schlaganfalls oder eines akuten Myokardinfarktes darstellt.

4.5 Klinische Relevanz

Thrombozytenaggregationshemmer gehören zur Basis der Sekundärprophylaxe nach einem kardiovaskulären Event oder nach einem nicht-kardioembolischen Schlaganfall bzw. einer transitorischen Attacke (TIA). Dabei ist ASS heutzutage eines der häufigsten eingesetzten Medikamente im Rahmen der Sekundärprophylaxe.

Es ist mittlerweile bekannt, dass Patienten im Rahmen eines akuten zerebralen oder auch kardiovaskulären Ereignisses eine Thrombusstruktur mit dünneren Fibrinfäden, kompaktem Fibrinnetzwerk und geringerer Durchlässigkeit besitzen (Scott et al., 2004). Dadurch wird

die Fibrinolyse beeinträchtigt. In einer in-vivo-Studie von 2015 wurde die Formationszeit des Thrombus, die mikroskopische Struktur und die Thrombusstärke bei 75 Patienten, die einen ischämischen Schlaganfall erlitten hatten mit 74 gesunden Patienten verglichen. Zudem waren unter den erkrankten Patienten 34 Personen, die bereits einen Thrombozytenaggregationshemmer in ihrer Prämedikation hatten. In dieser Studie zeigte sich unter anderem ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und erkrankten Patienten in der Menge des eingearbeiteten Fibrins in der mikroskopischen Struktur (gemessen in df: fractal dimension).

Es konnte ein insgesamt 40%- höherer Anteil von eingebautem Fibrin bei den erkrankten Patienten im Vergleich zu den gesunden Patienten festgestellt werden, welches den Thrombus kompakter und weniger durchlässig machte. Zusätzlich waren auch die Mengen an Fibrinogen im Blut der erkrankten Personen höher, welches bereits vorher in verschiedenen Studien herausgefunden wurde (Di Napoli und Singh, 2009; Wilhelmsen et al., 1984). Ein wichtiger Unterschied wurde bei denjenigen aufgezeigt, die bereits einen Thrombozytenaggregationshemmer in ihrer Vormedikation hatten: hier zeigten sich ebenfalls geringere Mengen des eingearbeiteten Fibrins mit entsprechender geringen Kompaktheit des Thrombus (Stanford et al., 2015). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass erhöhte Mengen von eingebautem Fibrin dementsprechend mit zuvor erhöhten Fibrinogenmengen im Plasma und geringere Mengen von eingebautem Fibrin mit erniedrigten Fibrinogenmengen im Plasma, hervorgerufen durch ASS-Einnahme, einhergehen.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Thrombolyse mit rt-Pa, die an einem Teil der erkrankten Patienten durchgeführt wurde, ebenfalls zu reduzierten Fibrinogenmengen führte (Stanford et al., 2015).

Leider ging die Studie nicht auf das Outcome der Patienten mit ASS und zusätzlicher Thrombolyse mit rt-Pa ein. Es wurde lediglich ASS mit der Thrombolyse verglichen, bei der sich eine signifikant kürzere Ischämiezeit bei der Therapie mit rt-Pa im Gegensatz zu ASS allein darstellen ließ, $p=0,001$ (Stanford et al., 2015).

Ein erhöhtes Fibrinogen stellt einen Risikofaktor für kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen dar. Es ist zum Beispiel erhöht bei Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, arterieller Hypertonie und Hyperlipidämie. Diese sind weitere wichtige kardio- und zerebrovaskuläre Risikofaktoren.

Es ist noch nicht vollends geklärt, ob es lediglich als ein Akute-Phase-Protein im Rahmen der inflammatorischen Prozesse, welche im Rahmen eines akuten vaskulären Ereignisses ebenfalls eine bedeutende Rolle spielen, erhöht im Plasma zu finden ist. Trotzdem wird Fibrinogen durch Thrombin bei der Gerinnung in Fibrin gespalten, welches die

Thrombusstruktur aufbaut. Dabei weiß man, dass bei erhöhten Fibrinogenmengen die Rate durch Thrombin abgespaltendem Fibrinopeptid A ansteigt und dieses mit einem dichteren Fibrinnetzwerk assoziiert ist (Scott et al., 2014). Interessanterweise befindet sich dieses Fibrinopeptid A in dem Fibrinogenmolekül an der Zentralregion E, welche aus den Amino-Termini aller Untereinheiten gebildet wird (siehe Anhang 7.1. Abbildung 1). He et al. konnten 2009 beweisen, dass ASS Lysin-Rückstände des Amino-Terminus der α -Untereinheit acetyliert und sich dadurch die Fibrinstruktur hinsichtlich eines weniger kompakten Fibrinnetzes verändert (He et al., 2009). Man könnte dementsprechend annehmen, dass durch die Einnahme von ASS geringere Fibrinogenmengen im Blut und somit weniger Fibrinopeptid A abgespalten wird, woraus ein lockeres Fibrinnetzwerk entsteht. Dies könnte eine Erklärung für den signifikant höheren Thrombolyseerfolg unter ASS in dieser Studie sein.

„Time ist brain“ (Nabavi und Ringelstein, 2007) ist eine bekannte Formulierung in der klinischen Behandlung des akuten Schlaganfalls. Dieses beinhaltet aber nicht nur die Wichtigkeit der schnellen Therapie im Sinne eines besseren Outcomes, sondern auch, dass die entstandenen Thromben sich mit Laufe der Zeit schlechter lysieren lassen. Obwohl die Ergebnisse nicht signifikant waren, konnten Stanford et al. feststellen, dass die Thromben der Patienten, welche innerhalb einer kürzeren Zeit des festgelegten 4,5 Stunden-Thrombolysezeitfenster lysiert wurden, weniger fibrinkompakte Thromben hatten als diejenigen, die zu einem späteren Zeitpunkt, welcher näher an den 4,5 Stunden lag, versorgt wurden (Stanford et al., 2015).

4.6 ASS und Thrombolyse mit rt-PA in-vivo

Sowohl ASS, als auch rt-Pa gehen mit einem Risiko für intra- oder extrakraniellen Blutungen einher. Deswegen sollte man sich die Frage stellen, ob eine Kombination aus beiden Medikamenten die Blutungsrisiken drastisch erhöhen.

Diese Frage stellten sich ebenfalls Broeg-Morvay et al., welche retrospektiv in einer Monozenter-Studie Blutungskomplikationen und Outcome von Schlaganfallpatienten verglichen. Darunter waren Patienten, welche eine Thrombolysetherapie mit rt-Pa erhielten oder mit rt-Pa und zusätzlich ASS; dieses dann entweder als Bridging-Therapie oder aber als ASS-Prämedikation (Broeg-Morvay et al., 2017). Ebenfalls hatte sich die randomisierte klinische ARTIS-Studie mit diesem Thema befasst, bei der 300mg ASS innerhalb von 90 Minuten nach Thrombolysetherapie mit rt-Pa begonnen wurde und bei der ein günstigeres

Outcome dieser Patienten erreicht werden konnte. Diese Studie wurde aber aufgrund einer zunehmenden Rate an intrakraniellen Blutungen beendet (Zinkstok und Roos, 2012). Anders als in ARTIS- Studie erhielten die Patienten bei Broeg-Morvay et al. ASS erst über 90 Minuten nach der Thrombolysetherapie. Erfreulicherweise zeigte sich hier keine erhöhten Blutungskomplikationen bei den Patienten. Das Outcome und die Rekanalisationsrate der Patienten unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Patienten mit rt-Pa + ASS oder nur rt-Pa. Dass es keinen erheblichen Unterschied zwischen den Patientengruppen gab und dass man sogar eine Tendenz zum besseren Outcome bezüglich der Patienten ohne ASS feststellte, erklärte man sich dadurch, dass die Patienten, die ASS bereits in der Vormedikation hatten, älter waren und mehr Komorbiditäten aufwiesen (Broeg-Morvay et al., 2017).

Letztendlich lässt sich daraus schließen, dass eine Thrombolysetherapie bei Patienten mit ASS in der Vormedikation keine Kontraindikation darstellen sollte. Es sollte aber darauf geachtet werden, ASS nicht simultan mit einer Thrombolysetherapie anzuwenden. Die aktuellen Leitlinien besagen, dass ASS erst 24 Stunden nach Thrombolysetherapie, aber binnen 48 Stunden begonnen und dauerhaft eingenommen werden sollte (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2013; gültig bis 2020; European Stroke Organisation, 2008).

4.7 Dosierung von ASS

Diese in-vitro-Studie stellt ein (Sono-)Thrombolyse-Szenario dar, in dem der zu behandelnde Patient ASS bereits als Prämedikation einnimmt. Aufgrund dessen wurde ASS vor Herstellung der Thromben dem Blut der Blutspender hinzugefügt. Eine Bolusgabe von ASS reicht aus, um eine Prämedikation zu imitieren. Die COX-1 der Thrombozyten wird irreversibel gehemmt und diese Wirkung hält über die gesamte Lebensdauer (7-10 Tage) der Thrombozyten an (Meier und Oelz, 1989). Die Halbwertszeit von ASS beträgt ungefähr 20 Minuten bevor es zu seinem Hauptmetaboliten Salicylsäure hydrolysiert wird. Lediglich die nicht hydrolysierte Acetylsalicylsäure bewirkt eine Hemmung der COX-1 in den Thrombozyten (Patrick et al., 2015).

Außerdem bemerkten He et al., dass Salicylsäure allein ebenfalls keinen Effekt auf das Fibrinogen besitzt (He et al., 2009). In ihrer Studie wurde das Fibrinogen sowohl Acetylsalicylsäure, als auch Salicylsäure allein ausgesetzt. Salicylsäure allein veränderte nicht die gemessene Permeabilität des Fibrin-Gels, woraus man schloss, dass Salicylsäure allein keinen Effekt auf eine Strukturveränderung des Fibrinogens besitzt (He et al., 2009).

Aufgrund dessen konnten die ASS-Thromben mit einer einzelnen Bolusgabe hergestellt werden.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwiefern sich unterschiedliche Thrombolysestrategien im Rahmen einer ASS-Prämedikation auswirken. Die Effekte von ASS sollten bei Patienten sichtbar werden, bei denen sich im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls ein Thrombus gebildet hatte und die ASS bereits in ihrer Vormedikation einnahmen. Es galt nicht herauszufinden, inwiefern sich Thrombolysetherapien mit der zeitgleichen Gabe von ASS auswirken. Deswegen wurde in den hier durchgeführten Experimenten ASS nicht zeitgleich mit der (Sono-) Thrombolyse eingesetzt.

Die ASS-Dosierung wurde in dieser Studie so ausgewählt, dass weder der ASS-Effekt noch die Effekte von rt-PA oder DSPA nicht überwiegen konnte.

Laut der European Stroke Organisation ist es erlaubt, bei ASS-naiven Patienten eine Loading-dose von ASS zwischen 160-325mg zu geben (European Stroke Organisation, 2008). Gemäß der zu dem Zeitpunkt der Experimente gängigen Vorgehensweise wurde eine Loading-dose von 250mg ASS gewählt.

Berechnet man diese Loading-dose anhand von Nadlers Formel mit einer Annahme von 5000ml Blutvolumen, einem Gewicht von 70kg und einer Körpergröße von 180cm (männliches Geschlecht), kann eine äquivalente Dosis für die 10ml gefüllten Citratröhrchen von 0,05mg/ml berechnet werden (Nadler et al., 1962). Für eine Sekundärprophylaxe mit ASS wird eine Empfehlung zur Einnahme von 100mg täglich ausgesprochen. Ab einer täglichen Menge von über 150mg ASS erhöht sich das Risiko unerwünschter schwerwiegender Blutungskomplikationen, insbesondere gastrointestinaler Blutungen (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2013; gültig bis 2020). Es zeigte sich aber in einer Studie von 1991, dass in den Dosisbereichen von ASS zwischen 75 und 162,5mg und zwischen 162,5 bis 325mg keine Unterschiede in den Blutungskomplikationen besteht (The Dutch TIA Trial Study Group, 1991). Insgesamt gesehen überwiegt der Nutzen der Sekundärprophylaxe gegenüber den Blutungskomplikationen (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2013; gültig bis 2020).

Interessanterweise fanden He et al. heraus, dass es in-vitro dosisabhängige Effekte im Bereich von ASS-Konzentrationen zwischen 0,04 und 2,2mmol/l (0,005mg/ml und 0,3mg/ml) gibt. Dabei besteht ein größerer Effekt in der Thrombolyserate bei niedrigen Konzentrationen (He et al., 2009)

Die kürzeste durch Plasminogen ausgelöste Fibrinolyserate wurde bei einer Konzentration von 0,07mmol/l (0,09mg/ml) festgestellt. Dadurch, dass man in dieser Studie ebenfalls

festgestellt hat, dass Salicylsäure allein keinen Effekt auf eine Strukturveränderung des Fibrinogens besitzt, nahm man bei höheren Konzentrationen von ASS an, dass durch die ebenfalls daraus entstandenen höheren Konzentrationen von Salicylsäure, dieses einen blockierenden Effekt der Acetylierung des Fibrinogens hat (He et al., 2009). Die Dosierung im Fall der vorliegenden Studie mit einer Konzentration von 0,05mg/ml entspricht ungefähr der Hälfte der Dosierung mit der kürzesten Thrombolyserate von He et al. Diese Konzentration hatte damit einen sichtbaren Effekt auf eine Fibrinogenstrukturveränderung mit einem signifikanten Effekt in der Kontrollgruppe A. Ein blockierender Effekt durch den Hauptmetaboliten Salicylsäure dürfte nur gering ausfallen.

4.8 ASS vs. andere Thrombozytenaggregationshemmer

ASS ist eines der wichtigsten Thrombozytenaggregationshemmer im Rahmen der Sekundärprophylaxe nach einem nicht-kardioembolischen ischämischen Schlaganfall oder nach einer TIA. Aktuell sind die zugelassenen Thrombozytenaggregationshemmer für Sekundärprophylaxe des ischämischen Schlaganfalls/TIA in Deutschland: ASS, eine Kombination von ASS mit Dipyridamol, Clopidogrel und Ticlopidin. Keines dieser Medikamente ist den anderen gegenüber überlegen. Laut Empfehlung zur Sekundärprophylaxe sollten Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall oder TIA ASS erhalten. Alternativ kann auch Clopidogrel oder die Kombination von ASS mit retardiertem Dipyridamol gegeben werden. Wobei Dipyridamol aktuell von den Kostenträgern in der ambulanten Behandlung nicht mehr erstattet und aufgrund dessen nicht mehr eingesetzt wird. Auch Ticlopidin wird bei auftretenden Blutbildveränderungen (Leukopenien) kaum noch verwendet (Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2013; gültig bis 2020).

Derzeit hat sich in den meisten europäischen Ländern eine Sekundärprophylaxe mit ASS 100mg pro Tag gegenüber anderen Thrombozytenaggregationshemmern durchgesetzt.

Alternativ wird bei Patienten mit aufkommenden Nebenwirkungen unter ASS Clopidogrel verabreicht. Clopidogrel hemmt irreversibel die Bindung von Adenosinphosphat (ADP) an den Thrombozytenrezeptor P2Y₁₂. Dadurch wird die ADP-abhängige Thrombozytenaggregation inhibiert.

In verschiedenen Studien (CAPRIE-Studie, 1996; MATCH-Studie, 2004) wurde die Wirksamkeit gegenüber ASS überprüft. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Clopidogrel und ASS und somit besteht keine Überlegenheit eines der beiden Medikamente (CAPRIE Steering Committee, 1996; Diener et al., 2004). Zudem konnte

festgestellt werden, dass die Nebenwirkungen hinsichtlich möglicher Blutungskomplikationen in etwa gleich waren, mit einer gering höheren Rate für gastrointestinale Blutungen unter ASS (0,49 vs 0,71 %; $p < 0,05$) (CAPRIE Steering Committee, 1996).

In einer Metaanalyse von 1994 wurden verschiedene Studien hinsichtlich geringerer Fibrinogenmengen im Plasma unter Ticlopidin untersucht. Hierbei zeigte sich eine Verringerung des Fibrinogens unter Ticlopidin im Gegensatz zu einem Placebo (Mazoyer et al., 1994). Aufgrund des heutzutage fehlenden Einsatzes von Ticlopidin wurde in einer Multizenter-Studie, welche 184 Patienten involvierte, Fibrinogenmengen im Plasma bei einer Einnahme von ASS gegenüber einer Einnahme von Clopidogrel untersucht. Es handelte sich dabei um Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt durchgemacht hatten und seitdem ASS oder Clopidogrel einnahmen. Die Untersuchungen fanden 1, 3 und 6 Monate nach dem Ereignis statt. Es fand sich kein Unterschied in den Fibrinogenmengen im Plasma während der Einnahme von ASS oder Clopidogrel. Es zeigte sich lediglich ein erhöhter Fibrinogenspiegel im Rahmen des Akutereignisses (Woodward et al., 2004). Leider wurde keine Placebogruppe in diese Studie involviert, sodass es unklar war, ob ASS oder Clopidogrel sich überhaupt auf Fibrinogenmengen im Plasma auswirkten. Aus den heutigen Erkenntnissen ist bekannt, dass unter ASS die Menge an eingebautem Fibrin erniedrigt ist, welches einen Rückschluss auf eine ebenfalls reduzierte Menge an Fibrinogen im Plasma geben könnte. Inwieweit sich Clopidogrel auf Fibrinogen auswirken könnte, wurde bislang noch nicht untersucht.

Aufgrund der fehlenden Überlegenheit eines der Medikamente gegenüber den anderen, kann entweder ASS, Clopidogrel oder ASS + Dipyridamol als Sekundärprophylaxe nach einem ischämischen Schlaganfall oder TIA eingenommen werden. Wichtig ist, dass die Sekundärprophylaxe binnen 48 Stunden, aber nicht innerhalb der ersten 24 Stunden nach Akutereignis begonnen wird und dass diese dauerhaft eingenommen wird. Es sei denn, dass sich im weiteren Verlauf Kontraindikation ergeben oder eine orale Antikoagulation nötig wird (European Stroke Organisation, 2008; Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2013; gültig bis 2020).

4.9 Sonothrombolyse unter ASS

Die Sonothrombolyse stellt eine mögliche Therapie zur Rekanalisation bei einem akuten Gefäßverschluss dar.

In dieser Studie wurde ein diagnostischer Ultraschall in einem colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus mit einer Frequenz von 2-MHz und einer Intensität (ISPTA, spatial-peak temporal-average intensity) von 0.179 W/cm^2 verwendet. Ähnliche Einstellungen des Ultraschalls sind in verschiedenen Studien gewählt worden (Eggers et al., 2003; Eggers et al., 2008; Pfaffenberger et al., 2005). Pfaffenberger et al. zeigten allerdings, dass nur der pulse-wave-Modus einen positiven Effekt auf die Thrombolyse hatte (Pfaffenberger et al., 2005).

Bei den Thromben ohne den Zusatz von ASS konnten positive Effekte unter der Hinzunahme von Ultraschall festgestellt werden (Gruppen C und E), allerdings waren diese nicht signifikant (siehe Tabelle 5). Man geht davon aus, dass durch die Hinzunahme von Ultraschall die Eindringtiefe und die Bindungsaffinität der Medikamente an das Fibrinnetzwerk durch mechanische Fragmentierung und Kavitation der Ultraschallwellen erhöht werden kann (Francis et al., 1995; Siddiqi et al., 1998). Dass dieser Effekt sich nicht signifikant ausgewirkt hat, könnte an unterschiedlichen experimentellen Modellen, einem nicht ausreichenden Ultraschallfenster und an den hergestellten Thromben (Größe und Art der Thromben) liegen. Die Thromben, welche hier sehr thrombozytenreich sind könnten dementsprechend ein stärkeres Fibrinnetz aufweisen. Dieses wurde bereits 2014 vermutet, als ein ebenfalls nicht signifikanter Effekt bei der Sonothrombolyse festgestellt wurde (Roessler et al., 2014).

Zudem wurde nicht der am stärksten wirksame Ultraschall im pulsed-wave Modus verwendet, sondern der klinisch häufig verwendete colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus zur farbduplexsonographischen Darstellung der Hirngefäße, wie sich in dem eher niedrigen Mechanical Index (MI) von 0,6 als Maß für die Ultraschallintensität zeigte. Mit optimierten Einstellungen können MI-Werte um 1,3 bis 1,4 im pulsed-wave Modus erreicht werden.

Bei den ASS-Thromben konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt zugunsten der Sonothrombolyse festgestellt werden. Dieses liegt aber vor allem daran, dass ASS die Thrombolyseraten aller Thrombolysemethoden signifikant erhöht und man in dem Fall von einem Ceiling-Effekt für ULTRASCHALL durch ASS ausgeht. Daraus folgt, dass die Wirkung von ASS bestehende Unterschiede, wie zum Beispiel den signifikanten

Unterschied bei den ASS-freien-Thromben zwischen DSPA + US und rt-PA + US zugunsten DSPA + US ($p=0,01$), aufhebt. Der Effekt von ASS und Thrombolyse jeglicher Methode ist so groß, dass man jede nutzen kann.

Inwieweit eine Sonothrombolyse einen festen Bestandteil in der Therapie eines ischämischen Schlaganfalls ausmachen sollte, muss noch untersucht werden. Eine Metaanalyse, welche im Jahr 2018 publiziert wurde, verglich insgesamt 16 durchgeführte in-vivo-Studien von 1994-2017 (Auboire et al., 2018).

Hierunter waren ebenfalls Studien, welche Ultraschallkontrastverstärker (Mikrosphären, micro-bubbles) nutzten. Diese werden intravenös appliziert und können unter Ultraschalleinfluss eine bestimmte Energie entwickeln, welche beim Zerplatzen diese Energie abgeben und die Wirkung von Ultraschall verstärken. Unter diesen 16 Studien untersuchten 5 Studien die Sicherheit der Nutzung des transkraniellen Ultraschalls. 2 Studien untersuchten die Wirksamkeit von rt-Pa+ Ultraschall, 4 Studien die Sicherheit und die Wirksamkeit von transkraniellen Ultraschall und 5 Studien die Sicherheit und Wirksamkeit von rt-Pa+ Ultraschall.

Bezüglich der Wirksamkeit nutzen die Hälfte der Studien (8 von 16) die Infarktgröße als Bewertung, während 4 neurologische Scoresysteme nutzten. Die meist genutzte Bewertung der Wirksamkeit war aber die Rekanalisationsrate. Des Weiteren wurden unterschiedliche Modelle und verschiedene Ultraschalleinstellungen für die Untersuchungen genutzt. Eine ähnliche Einstellung, die bei allen Studien genutzt wurde, war die Frequenz, welche zwischen 800kHz und 3MHz lag. Auboire et al. vermuteten, dass dieses auf einer Erkenntnis einer Studie beruht, in welcher festgestellt wurde, dass eine niedrige Frequenz (in dem Fall 300kHz) das Risiko an intrakraniellen Blutungen erhöht (Daffertshofer et al., 2005).

Man kann aufgrund der Heterogenität der Ultraschalleinstellungen nicht sagen, welche Einstellung am wirksamsten ist. Insgesamt zeigten alle Studien positive Effekte bei der Behandlung mit transkraniellen Ultraschall allein oder auch mit zusätzlicher Gabe von rt-Pa im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Bezüglich der Sicherheit ergab sich ein Konsens in allen Studien: die Rate an intrakraniellen Blutungen zeigte sich nicht höher als in den Kontrollgruppen.

Insgesamt gesehen waren sich Auboire et al. einig, dass die zusätzliche Applikation von Ultraschall einen wesentlichen thrombolytischen Effekt besitzt. Einig waren sie sich auch, dass es noch wenige Studien zum Thema Sicherheit des transkraniellen Ultraschalls während der Thrombolysetherapie gibt. Dies wäre ein wichtiges Thema für weitere Untersuchungen. Zusätzlich stellten sie in Aussicht, dass der transkranielle Ultraschall auch nach Thrombektomie genutzt werden könnte (Auboire et al., 2018).

4.10 Limitierungen der Studie

In dieser in-vitro-Studie hinsichtlich der Frage des Thrombolyse-Erfolges verschiedener (Sono-)Thrombolysestrategien mit ASS in der Prämedikation wurde ein statisches Modell genutzt. Für reproduzierbare Messungen wurde ein bereits erprobtes standardisiertes Gerinnungsprotokoll zur Herstellung der Thromben genutzt (Roessler et al., 2014; Roessler et al., 2015).

Verglichen mit dem menschlichen Blut im Körper zeigten sich die hergestellten Thromben reich an Thrombozyten und ärmer an roten und weißen Blutkörperchen. Dieses Gerinnungsprotokoll wurde bereits 2014 erprobt und mit in-vivo-Thrombozyten verglichen (Roessler et al., 2014). Es wurde ein Gerinnungsprotokoll für die Herstellung von Thromben gefunden, in dem die hergestellten Thromben eine große histologische Ähnlichkeit mit in-vivo-Thrombozyten aufwiesen. Zudem hatten diese Thrombozyten-reichen Thromben eine ausreichende Stabilität für die Experimente und es konnten adäquate Lyseraten mit rt-Pa nachgewiesen werden (Roessler et al., 2014). Diese Umverteilung der Blutkörperchen den verwendeten Thromben spiegelt den Fahraeus-Lindqvist-Effekt in englumigen Blutgefäßen wider, bei dem es zu einer scheinbaren Abnahme der Blutviskosität in Blutgefäßen mit abnehmendem Durchmesser kommt. Hierbei kommt es aufgrund der Fluidität der Erythrozyten und der wandnahen Scherkräfte zur Umverteilung der Blutkörperchen. Die Erythrozyten weichen in den Axialstrom aus, sodass ein zellarmer Randstrom entsteht. Dieser zellarme Randstrom am Endothel, an welchem die Blutgerinnung beginnt, ist wiederum reich an Thrombozyten. Aus diesem Grund wurden Thrombozyten-reiche Thromben verwendet.

Dieser Reichtum an Thrombozyten könnte allerdings eine höhere ASS-induzierte Hemmung der Thrombozyten zur Folge haben, als es in-vivo der Fall ist.

Das vorliegende Modell ist nicht in der Lage die komplexe Interaktion zwischen dem entwickelnden Thrombus und dem Endothel zu simulieren. Auch die gegenseitige physiologische Hand in Hand einhergehende Beeinflussung zwischen Gerinnung und Fibrinolyse können in diesem Modell nicht berücksichtigt werden.

Es ist außerdem ein statisches Modell, sodass dort kein physiologischer Blutfluss herrschen kann und Scherkräfte im Blutfluss nicht dargestellt werden können. Aufgrund dessen wurde ein pulsatile Modell, welches den physiologischen Blutfluss nachempfunden, zur Untersuchung der (Sono-)Thrombolyse entwickelt (Roessler et al., 2011). Man könnte so die durchgeführten Experimente mit ASS ebenfalls in dem pulsatilen Modell durchführen.

Ebenfalls beruhen die vorliegenden semiquantitativen Analysen zur Bestimmung des prozentualen Anteils des Fibrins in den REM-Bildern auf einer kleinen Anzahl. Es konnten lediglich signifikante Unterschiede in der Kontrollgruppe A (mit ohne ohne ASS) aufgezeigt werden. Aufgrund der kleinen Anzahl an erstellten REM-Bilder ist davon auszugehen, dass es nicht gelang weitere signifikante Unterschiede des prozentualen Anteils des Fibrins zwischen den verschiedenen (Sono-)Thrombolysestrategien mit und ohne ASS zu bestimmen. Bei reiner Betrachtung der Bilder ist anzunehmen, dass es große Unterschiede zwischen den Thromben ohne und mit ASS nicht nur in der Kontrollgruppe geben müsste.

Eine weitere Limitierung dieser Studie ist, dass der Schädelknochen beim Menschen nicht berücksichtigt wurde. Pfaffenberger et al. fanden in einem in-vitro-Experiment heraus, dass ein pulsed-wave Ultraschall mit 1,8 MHz ohne die Hinzunahme eines Schädelknochens die Thrombolyse rate signifikant erhöht ($p=0,00015$, rt-PA+ PW-US vs. rt-PA allein). Unter Hinzunahme eines Schädelknochens (Dicke $>1,9\text{mm}$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Thrombolysemethoden (Pfaffenberger et al., 2005). Zu Bedenken gilt ebenfalls, dass es sicherlich eine große Variabilität in der Schädelknochendicke bei Patienten gibt.

Des Weiteren war der in dieser Untersuchung verwendete Ultraschall mittels eines für den diagnostischen Routine-Gebrauch verwendeten Gerät nicht für die maximale Energieabgabe eingestellt, sondern verwendete den klinisch am häufigsten verwendeten Ultraschall-Modus, den colour-coded (Farbduplexsonographischen) Modus. So könnte die Ultraschallwirkung möglicherweise unterschätzt worden sein.

Zusätzlich anzumerken ist die variierte Anzahl der durchgeführten Experimente zwischen den unterschiedlichen Thromben-Gruppen (A-E). Insgesamt wurden 238 Thromben hergestellt und den verschiedenen (Sono-)Thrombolysestrategien unterworfen. Dabei wurden 42 Thromben für A, 68 Thromben jeweils für B und D und 30 Thromben für C und E hergestellt. Die unterschiedliche Anzahl erklärt sich anhand der Platzverfügbarkeit in dem statischen Modell und des gespendeten Blutes von den Blutspendern, die für diese Studie in Frage kamen.

Positiv hervorzuheben ist allerdings, dass eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Therapien hergestellt wurde, da die Anzahl der Thromben mit der rein medikamentösen Therapie (rt-Pa vs. DSPA) und die der Thromben mit der Sonothrombolyse (rt-Pa + US vs. DSPA + US) identisch war.

Trotz der genannten Limitierungen tragen dieses Modell und diese Experimente zu einem besseren Verständnis der höheren Thrombolyserate bei Patienten mit ASS in der Prämedikation bei.

4.11 Fazit

Die aktuellen Schlaganfall-Leitlinien geben vor, dass zu einer Sekundärprophylaxe unter anderem ASS in einer täglichen Dosierung von 100mg gehört, welches binnen 48 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome, wenn keine Kontraindikationen vorliegen, dauerhaft eingenommen werden sollte.

Die Ergebnisse der vorliegenden in-vitro-Studie zeigen, dass ASS einen Ceiling-Effekt bezüglich der Thrombolyseraten bei den (Sono-)Thrombolysestrategien bewirkt. Dabei zeigten sich signifikant erhöhte Thrombolyseraten bei den ASS-Thromben im Vergleich zu den ASS-freien Thromben bei jeglicher Thrombolysestrategie (bei jeder Strategie $p < 0,001$).

Die irreversible Hemmung der COX-1 in den Thrombozyten durch ASS und die damit hervorgerufene Beeinträchtigung der Gerinnung ist gut erforscht. Zusätzlich zu dieser Wirkung acetyliert ASS ebenso Lysin-Rückstände am Fibrinogen und bewirkt so eine Strukturveränderung des Fibrinnetzwerks und der einzelnen Fibrinfilamente. In den REM- und TEM-Bildern ließ sich ein weniger kompaktes Fibrinnetzwerk mit einem resultierenden weniger resistenten Thrombus gegenüber einer Thombolyse darstellen. Durch das lockere Fibrinnetzwerk und die dickeren Fibrinfilamente ging die Studie von einer größeren Angriffsfläche und eine mögliche größere Eindringtiefe der Thrombolysemedikamente aus. In der vorangegangenen Studie von Roessler et al (2015) zeigte sich eine Überlegenheit von DSPA gegenüber rt-Pa und einen nichtsignifikanten Effekt von zusätzlicher Ultraschallapplikation. In dieser Studie werden diese Unterschiede durch den Ceiling-Effekt von ASS aufgehoben.

Zudem zeigte sich, dass die Ergebnisse der vorliegenden in-vitro-Experimente mit den Ergebnissen vorangegangener in in-vivo-Studien mit rt-Pa-Thrombolyse bei Patienten mit ASS in der Prämedikation übereinstimmten.

5 Zusammenfassung

Der akute Schlaganfall ist die führende Ursache für eine neurologische Funktionsstörung und die zweithäufigste Todesursache weltweit. Im Rahmen der Sekundärprophylaxe nach zerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen wird in der überwiegenden Anzahl der Fälle eine lebenslange Medikation mit Aspirin® (ASS) begonnen. Angesichts der Häufigkeit dieses Medikaments in der Prämedikation von Patienten wurde ein experimentelles Setting entwickelt, in dem es herauszufinden galt, inwieweit ASS in der Prämedikation einen Einfluss auf unterschiedliche (Sono-)Thrombolysenethoden in-vitro hat.

Gemäß einem erprobten, standardisierten Gerinnungsprotokoll wurden zwei verschiedene Formen von Thromben hergestellt: Thromben ohne den Zusatz von ASS und Thromben mit dem Zusatz von ASS. Anschließend wurden diese Thromben in einem einstündigen Experiment verschiedenen (Sono-)Thrombolysenstrategien unterworfen. Für beide Thrombenformen mit und ohne ASS galt dabei: Gruppe A: Kontrollgruppe, Gruppe B: Actilyse (rt-Pa, 60kU/ml), Gruppe C: rt-Pa und Ultraschall (US, 2MHz+0,179W/cm²), Gruppe D: Desmoteplase (DSPA, 2µg/ml) und Gruppe E: DSPA und US. Nach einer Stunde wurde die Thrombolyserate, anhand des Gewichts vor und nach der (Sono-)Thrombolysen bestimmt. Zudem wurden die Thromben mit einem Elektronenmikroskop hinsichtlich ihrer Fibrinstruktur untersucht.

In beiden Formen von Thromben zeigte sich eine signifikant höhere Thrombolyserate bei allen (Sono-)Thrombolysenstrategien verglichen mit der Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,001$). Der Zusatz von ASS erhöhte die Thrombolyserate bei allen (Sono-)Thrombolysenstrategien ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) und führte zu einem Ceiling-Effekt bezüglich der (Sono-)Thrombolysenethoden. Vorherige Unterschiede bei den Thromben ohne ASS bestanden nicht mehr.

Eine semiquantitative Analyse bei der Elektronenmikroskopie zeigte eine erniedrigte Fibrindichte bei den Thromben mit dem Zusatz von ASS. Es konnte ein signifikanter Unterschied in dem prozentualen Anteil des Fibrins in allen Thrombengruppen festgestellt werden ($p = 0,005$). In paarweisen Vergleichen fand sich ein signifikanter Unterschied lediglich bei den Gruppen A und E, jeweils mit und ohne ASS (jeweils $p = 0,029$).

ASS in der Prämedikation führt in-vitro zu einer signifikant höheren Thrombolyserate. ASS hemmt nicht nur die Cyclooxygenase-1 in den Thrombozyten und damit ihre Interaktion, sondern acetyliert ebenfalls Lysin-Rückstände an der α - Untereinheit des Fibrinogens, welches zu einer Strukturveränderung des Fibrins führt. Dabei nimmt die Dicke der

Fibrinfilamente zu und es entsteht ein weniger kompaktes und inkomplett vernetztes Fibrinnetzwerk, welches leichter lysiert werden kann. Dieses konnte auch bereits in einer in-vivo-Studie festgestellt werden. Es zeigten sich in einer weiteren in-vivo-Studie keine höheren Raten an Blutungskomplikationen unter ASS und einer Thrombolyse mit rt-Pa, sodass eine ASS-Prämedikation keine Kontraindikation für eine Thrombolysetherapie darstellen sollte. Inwieweit Patienten von einer ASS-Prämedikation hinsichtlich eines günstigeren Outcomes nach einem Schlaganfall profitieren, muss noch genauer untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Ajjan RA, Grant P: Role of clotting factors and fibrin structure in predisposition to atherothrombotic disease. *Expert Rev. Cardiovas. Ther.*3:1047-59;2005.

Ajjan RA, Standeven M, Khanbhai M et al.: Effects of Aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:712-17;2009.

Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, et al.: CLOTBUST Investigators. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 351:2170-8;2004.

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* 373:1849-60;2009.

Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002: Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324:71-86;2002.

Antovic A, Perneby C, Ekman GJ et al.: Marked increase of fibrin gel permeability with very low dose ASA treatment. *Thromb Res* 116:509–17;2005.

Auboire L, Sennoga CA, Hyvelin JM et al.: Microbubbles combined with ultrasound therapy in ischemic stroke: A systematic review of in-vivo preclinical studies. *PLoS ONE* 13: e0191788;2018 (Tag des Zugriffs: 31.05.2018).

Bergmann SR, Fox KA, Ter-Pogossian MM et al.: Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator. *Science* 220:1181-83;1983.

Bonita R.: Epidemiology of stroke. *Lancet* 339:342-44;1992.

Broeg-Morvay A, Mordasini P, Slezak A et al.: Does Antiplatelet Therapy during Bridging Thrombolysis Increase Rates of Intracerebral Hemorrhage in Stroke Patients? *PLoS ONE* 12(1): e0170045.;2017 (Tag des Zugriffs: 28.05.2018).

Broos K, Feys HB, De Meyer SF et al.: Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews* 25:155-67;2011.

CAPRIE Steering Committee: A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 348:1329-39;1996.

Collet JP, Lesty C, Montalescot G et al.: Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem.* 278:21331–35;2003.

Collet JP, Park D, Lesty C 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.* 20:1354-61;2000.

Crabbe SJ, Cloninger CC: Tissue plasminogen activator: a new thrombolytic agent. *Clin Pharm* 6:373-86;1987.

Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P 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*. 36:1441-46;2005.

Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Neurologie: S3-Leitlinie-Schlaganfall: Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke. Stand 31.01.2015, gültig bis 2020 (Tag des Zugriffs 18.05.2018).

Di Napoli M, Singh P: Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients?: Why, how, when. *Stroke* 40:1549-52;2009.

Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM et al.: Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 364:331-37;2004.

Donnan GA, Hommel M, Davis SM et al.: Streptokinase in acute ischaemic stroke. *Lancet* 346:56;1995.

Eggers J, Koch B, Meyer K et al.: Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 53:797–800;2003.

Eggers J, König IR, Koch B et al.: Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and rt-PA in acute middle cerebral artery main stem occlusion – Results from a randomized study. *Stroke* 39:1470–75;2008.

Eggers J, Ohlrich M, Roessler F: Sonothrombolyse mit transkraniellem Ultraschall. *Schattauer, Nervenheilkunde* 31:428-31;2012.

European Stroke Organisation: Guidelines for management of ischaemic stroke 2008 (Tag des Zugriffs 18.05.2018). (Weblink: http://www.congrex-switzerland.com/fileadmin/files/2013/esostroke/pdf/ESO08_Guidelines_Original_english.pdf)

Fatah K, Beving H, Albage A et al.: Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? *European Heart Journal* 17:1362-66;1996.

Francis CW, Bline A, Lee S et al.: Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol* 21:419-24,1995.

Furlan AJ, Eyding D, Albers GW et al. (DEDAS Investigators): Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 37:1227-31;2006.

Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM: The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem* 267:24259-63;1992.

Greenhall AM, Schmidt U, Joermann G: *Diphylla ecaudata*. *The American Society of Mammalogists* 227:1-3,1984.

Hacke W 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* 8:141-50;2009.

Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y et al.: 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;2005.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al.: Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. ECASS-Investigators. *The New England Journal of Medicine* 359:1317-29;2008.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C: Intravenous Thrombolysis with Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Hemispheric Stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274:1017-25;1995.

Hawkey C: Plasminogen activator in saliva of the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Nature* 211:434-35;1966.

He S, Bark N, Wang H et al.: Effects of Acetylsalicylic Acid on Increase of Fibrin Network Porosity and the Consequent Upregulation of Fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol*™ 53:24-29;2009.

He S, Blombäck M, Yoo G et al.: Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann NY Acad Sci* 936:531-35;2001.

Heuschmann PU et al: Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 37:333-40;2010.

Hommel M, Boissel JP, Cornu C: Termination of trial of streptokinase in severe acute ischaemic stroke. *Lancet* 345:57;1995.

Ibrahim MM, Sebastian J 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* 30:508-13;2010.

Ichinose A, Kisiel W, Fujikawa K: Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett* 175:412-18;1984.

IST-3 group: Sandercock P, Wardlaw JM, Lindley RI et al.: The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet*. 379:2352-63;2012.

Johnston SC, Easton JD, Farrant M, et al. (Clinical Research Collaboration): Neurological Emergencies Treatment Trials Network, and the POINT Investigators. Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA. *N Engl J Med*. 379:215-25;2018.

Kehrel BE: Blutplättchen. *Biochemie und Physiologie. Hämostasiologie* 28:289-98;2008.

Khandelwal P, Yavagal DR, Sacco RL: Acute Ischemic Stroke Intervention. *Journal of the American College of Cardiology* 67:2631-44;2016.

Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Ringleb PA, Veltkamp R: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls- Ergänzung 2015, Rekanalisierende Therapie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Auflage 5, 2012. Version Stand 5.Oktober 2015; gültig bis 5.Oktober 2020.

Kummer R, Alberts GW, Mori E: The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke (DIAS) clinical trial programm. *International Journal of Stroke* 7:589-96;2012.

Kwah AV, Kessler C: Schlaganfall- Epidemiologie, Risikofaktoren und Genetik. Hämostasiologie 26:187-97;2006.

Li X, Ling L, Li C et al.: Efficacy and safety of desmoteplase in acute ischemic stroke patients. A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 96:18(e6667);2017.

Liberatore GT, Samson A, Bladin C et al.: Vampire Bat Salivary Plasminogen Activator (Desmoteplase) A Unique Fibrinolytic Enzyme That Does Not Promote Neurodegeneration. *Stroke* 34:537-43;2003.

Mazoyer E, Ripoll L, Boisseau MR et al.: How does ticlopidine treatment lower plasma fibrinogen? *Thromb. Res.* 75:361-70;1994.

Medcalf RL: Desmoteplase: discovery, insights and opportunities for ischemic stroke. *British Journal of Pharmacology* 165:75-89;2012.

Meier PJ, Oelz O: Acetylsalicylsäure als Plättchenhemmer. *Pharma-Kritik* 11:61-4;1989.

Miner J, Hoffhines A: The Discovery of Aspirin's Antithrombotic Effects. *Tex Heart Inst* 34:179-86;2007.

Mishra NK, Diener HC, Lyden PD et al.: Influence of Age on Outcome from Thrombolysis in Acute Stroke. A Controlled Comparison in Patients from the Virtual International Stroke Trials Archive (VISTA). *Stroke* 41:2840-48;2010.

Nabavi DG und Ringelstein EB. Der ischämische Schlaganfall: Eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. W. Kohlhammer Verlag, Stuttgart;2007.

Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T: Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 51:224-32;1962.

Paciaroni M, Medeiros E, Bogousslavsky J: Desmoteplase. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 9: 773-78;2009.

Patrick J, Dillaha L, Armas D et al.: A randomized trial to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of a single dose of an extended-release aspirin formulation. *Postgrad Med* 127:573-80;2015.

Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, Kollmann C et al.: Can a Commercial Diagnostic Ultrasound Device Accelerate Thrombolysis? An In Vitro Skull Model. *Stroke* 36:124-28;2005.

Rajput B, Degen SF, Reich E et al.: Chromosomal locations of human tissue plasminogen activator and urokinase genes. *Science* 230:672-74;1985.

Rassow J, Hauser K, Netzker R et al.: Kapitel: Reaktion auf Verletzungen: Blutstillung und Blutgerinnung. *Duale Reihe. Biochemie, 2. Auflage.* Thieme, Stuttgart 736-51;2008.

Ren Y, Li C, Chang J et al.: Hi1a as a Novel Neuroprotective Agent for Ischemic Stroke by Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a. *Translocal stroke research.* Springer 2017 (Tag des Zugriffs 18.05.2018) (Weblink: <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0575-x>)

Robert-Koch-Institut: *Journal of Health Monitoring* 2017 2(1) DOI 10.17886/RKI-GBE-2017-010.2017 (Tag des Zugriffs 24.05.2018). (Weblink: <https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBE>)

DownloadsJ/JoHM_2017_01_gesundheitliche_lage.pdf;jsessionid=83EB4C425E410F0C451ACDCB5E5492F6.1_cid390?__blob=publicationFile)

Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, et al.: Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. *BMC Neurology* 11:58;2011.

Roessler FC, Teichert A, Ohlrich M et al.: Development of a new clot formation protocol for standardized in-vitro investigations of sonothrombolysis. *J Neurosci Methods* 237:26-32;2014.

Roessler FC, Wang Z, Schumacher S et al.: In vitro examination of the thrombolytic efficacy of desmoteplase and therapeutic ultrasound compared to rt-PA. *Ultrasound Med Biol* 41:3233-40;2015.

Salonen EM, Saksela O, Vartio T et al.: Plasminogen and Tissue-type Plasminogen Activator Bind to Immobilized Fibronectin. *J Biol Chem* 260:12302-07;1985.

Sañák D, Kuliha M 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* 67:52-56;2012.

Sandercock PA, Counsell C, Gubitz GJ et al.: Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 16:CD000029. doi: 10.1002/14651858.CD000029.pub2;2008.

Schellinger P et al.: Combined lysis of thrombus with ultrasound and systemic tissue plasminogen activator for emergent revascularization in acute ischemic stroke (CLOTBUST-ER): design and methodology of a multinational phase 3 trial. *World Stroke Organisation* 1141-48;2015.

Schleuning WD, Alagon A, Boidol W et al.: Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity. *Ann NY Acad Sci* 667:395-403;1992.

Scott EM, Ariens RA, Grant PJ: Genetic and Environmental Determinants of Fibrin Structure and Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1558-66;2004.

Sicker T, Hilgenfeld R: Blutgerinnungsfaktor XIII: Aktivierung, Substrate und Struktur einer Transglutaminase. *Hämostaseologie* 22:21-7;2002.

Siddiqi F, Odrjijn TM, Fay PJ et al.: Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood* 91:2019-202;1998.

Stanford SN, Sabra A, D'Silva L et al.: The changes in clot microstructure in patients with ischaemic stroke and the effects of therapeutic intervention: a prospective observational study. *BMC Neurology* 15:35;2015.

Tanswell P, Seifried E, Stang E et al.: Pharmacokinetics and hepatic catabolism of tissue-type plasminogen activator. *Arzneimittelforschung* 41:1310-19;1991.

The Dutch TIA Trial Study Group. A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. The Dutch TIA Trial Study Group. *N Engl J Med* 325:1261-66,1991.

The NINDS study group (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA stroke study group): Tissue Plasminogen Activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine* 333:1581-87;1995.

Toni D, Lorenzano S, Agnelli G et al.: Intravenous thrombolysis with rt-PA in acute ischemic stroke patients aged older than 80 years in Italy. *Cerebrovasc Dis.* 25:129-35;2008.

Tsivgoulis G, Alexandrov AV: Ultrasound-enhanced thrombolysis in acute ischemic stroke: potential, failures, and safety. *Neurother* 4:420-27;2007.

Undas A, Sydor W, Brummel K et al.: Aspirin Alters the Cardioprotective Effects of the Factor XIII Val34Leu Polymorphism. *Circulation* 107:17-20;2003.

Wang Y1, Wang Y, Zhao X, et al. (CHANCE Investigators): Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med.* 369:11-9;2013.

Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K et al.: Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med.* 311:501-05;1984.

Williams S, Fatah K, Ivert T et al.: The effect of acetylsalicylic acid on fibrin gel lysis by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:718-25;1995.

Witt W, Maass B, Baldus B et al.: Coronary thrombolysis with Desmodus salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation* 90:421-26;1994.

Woodward M, Lowe GD, Francis LM et al.: A randomized comparison of the effects of aspirin and clopidogrel on thrombotic risk factors and C-reactive protein following myocardial infarction: the CADET trial. *J. Thromb. Haemost.* 2:1934-40;2004.

World Health Organisation: fact sheet: cardiovascular diseases (CVDs), Stand Mai 2017 (Tag des Zugriffs 25.05.2018). (Weblink: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)))

Zamarron C, Lijnen HR Collen D: Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 259:2080-83;1984.

Zinkstok SM, Roos YB: Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial. *Lancet* 380:731-7;2012.

7 Anhang

7.1 Abbildungen

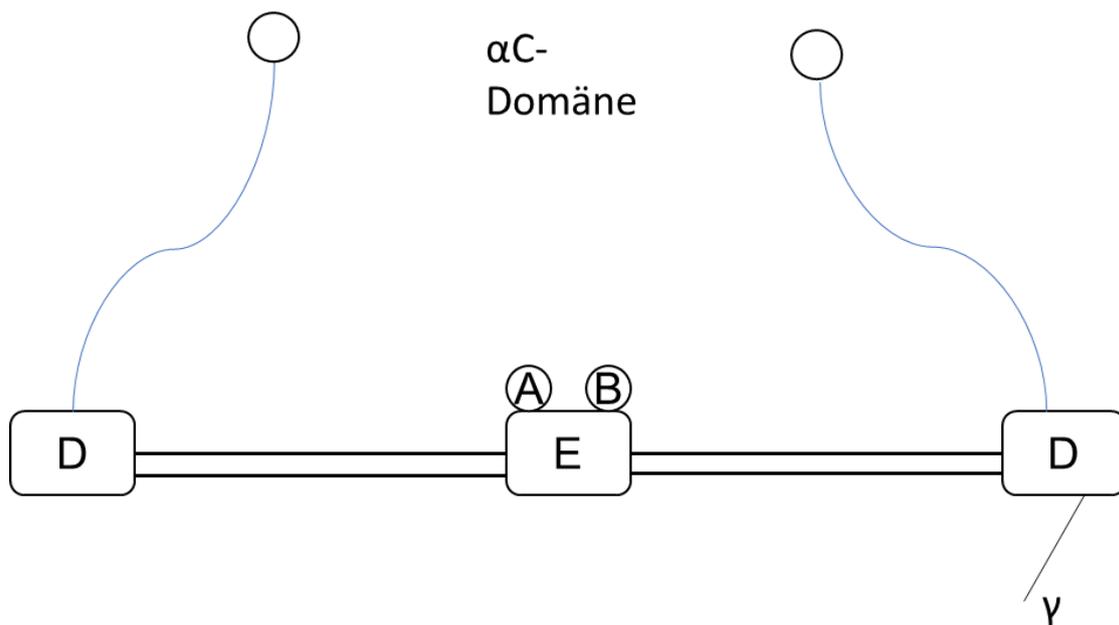


Abbildung 1: Struktur eines stark schematisierten Fibrinmoleküls. Es bestehen 6 Polypeptidketten: $2\alpha, 2\beta, 2\gamma$, welche ein Hexamer bilden (nicht dargestellt). Das Molekül hat 3 Hauptstrukturen: E-Domäne, welche aus den Aminosäuren-Anteilen aller 6 Polypeptidketten besteht und die Fibrinopeptide A und E besitzt und die beiden äußeren D-Strukturen, welche Carboxyl-Anteile der β und γ -Ketten besitzen. Die Verbindung zwischen E und D enthält die Carboxyl-Domäne der β und γ -Ketten. Die Carboxyl-Anteile der α -Ketten sind als α C-Domäne an den D-Strukturen erkennbar. (γ : Funktionale Variante der γ -Kette (7-15% Häufigkeit), hat eine Bindungsstelle für Thrombin und Faktor XIII.)

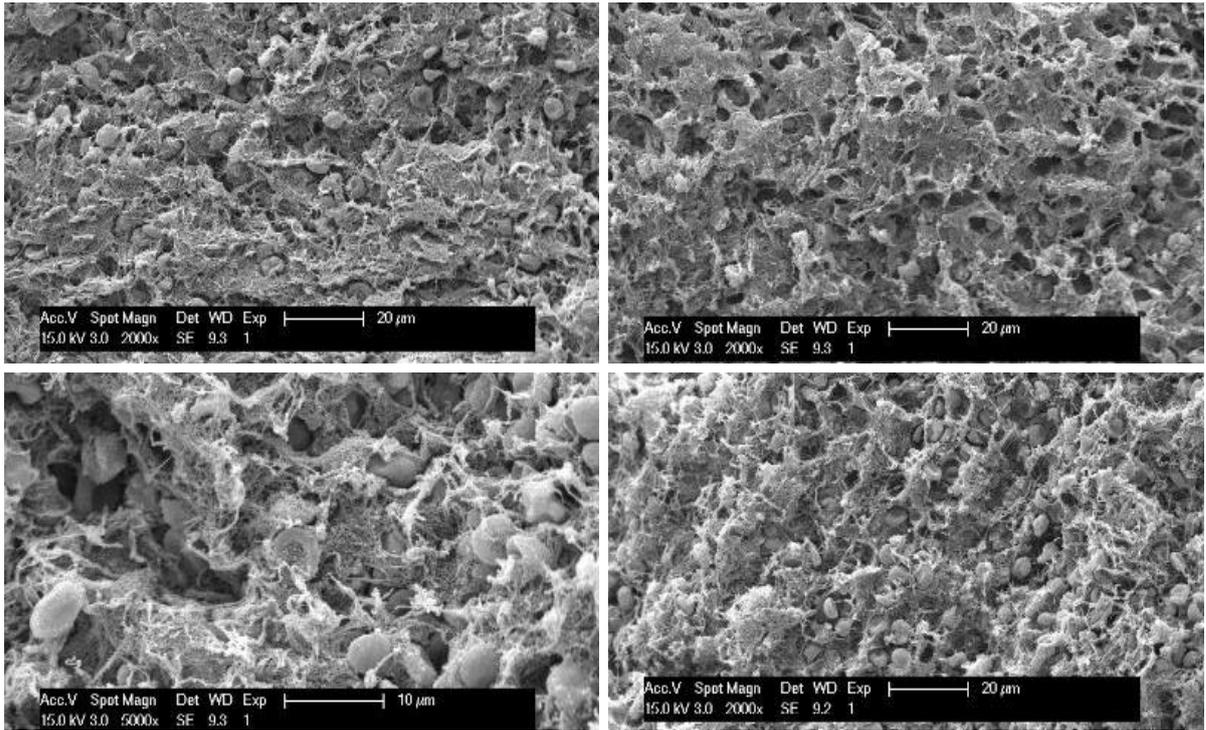


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopie. Kontrollgruppe A ohne Zusatz von ASS.

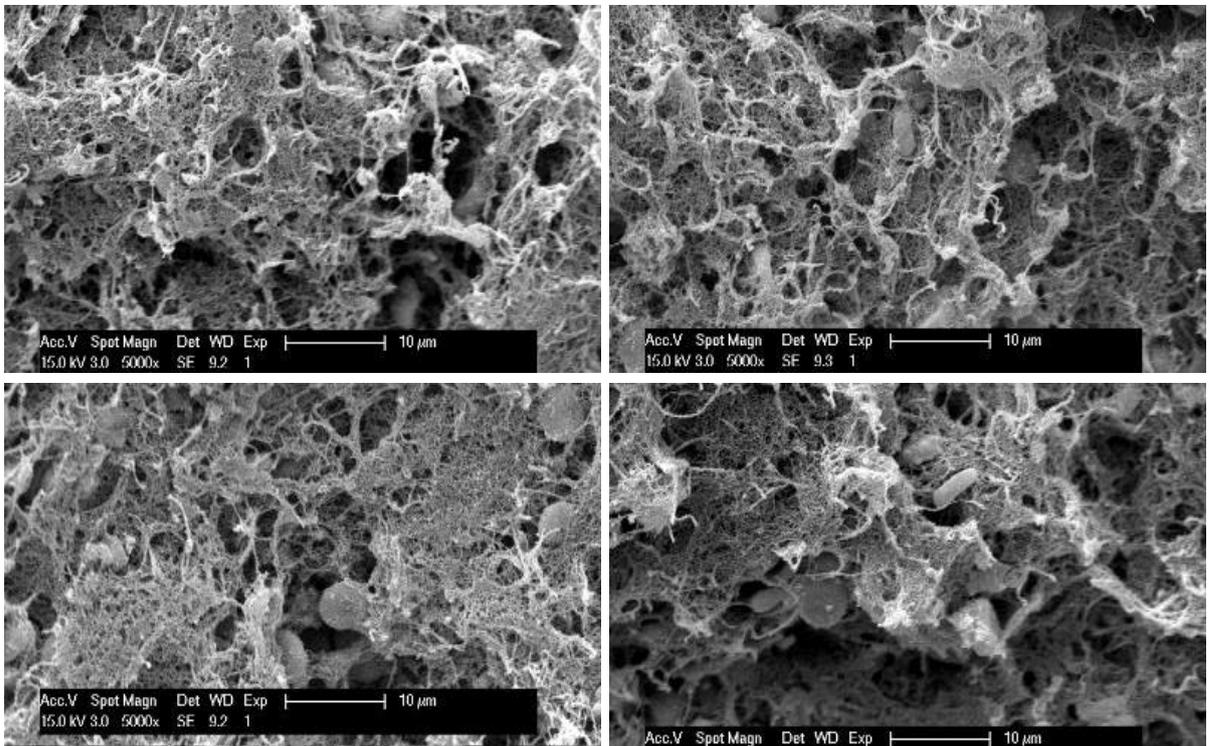


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopie. Kontrollgruppe A mit Zusatz von ASS.

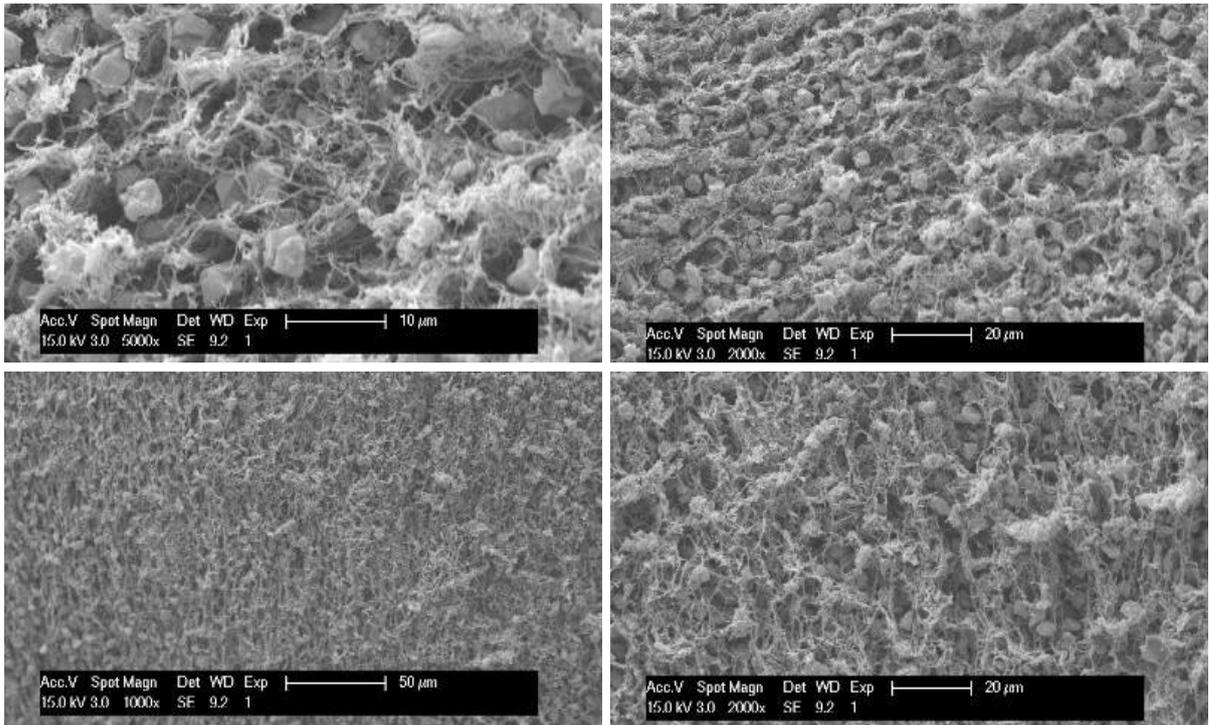


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopie. Gruppe B (rt-Pa) ohne ASS

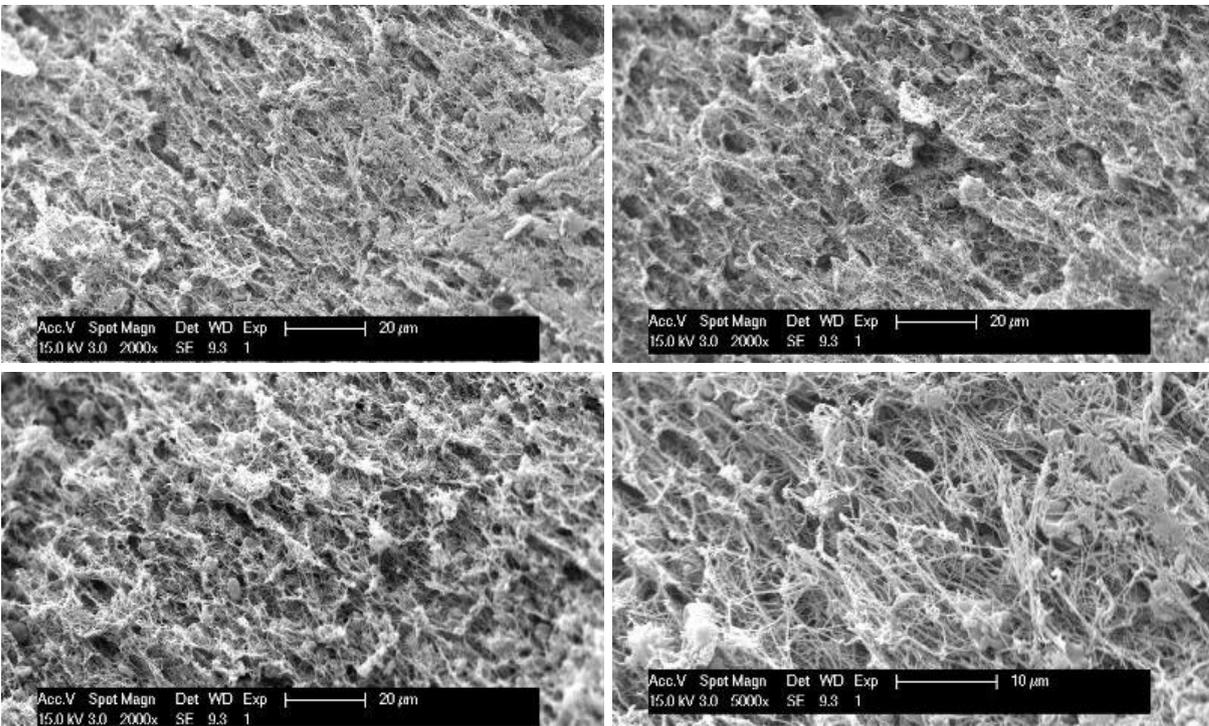


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopie. Gruppe B (rt-Pa) mit ASS

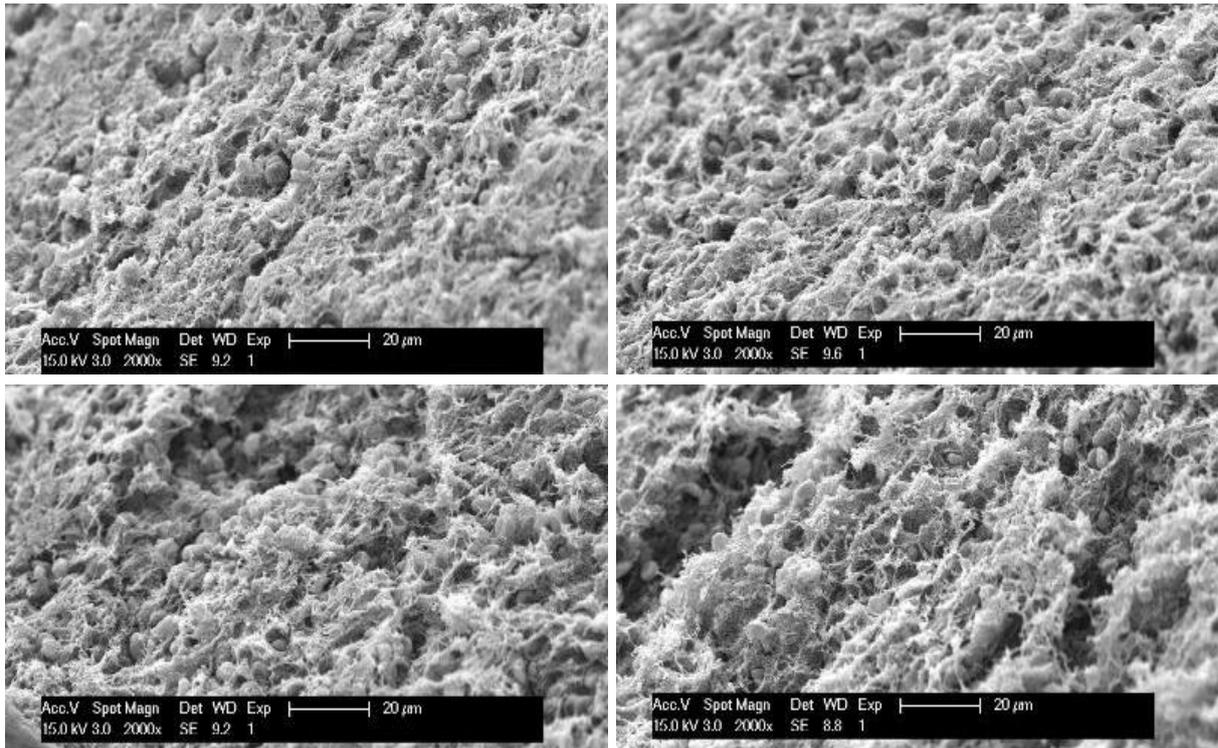


Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopie. Gruppe C (rt-Pa+ US) ohne ASS

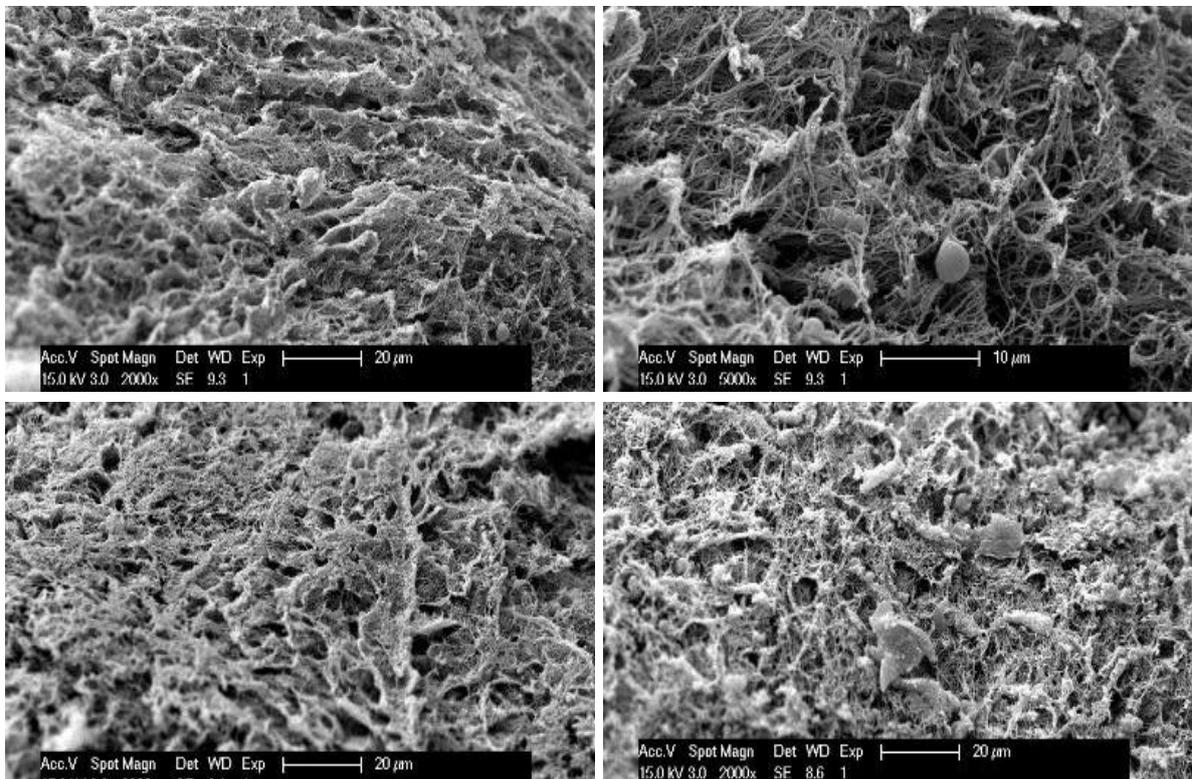


Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopie. Gruppe C (rt-Pa + US) mit ASS

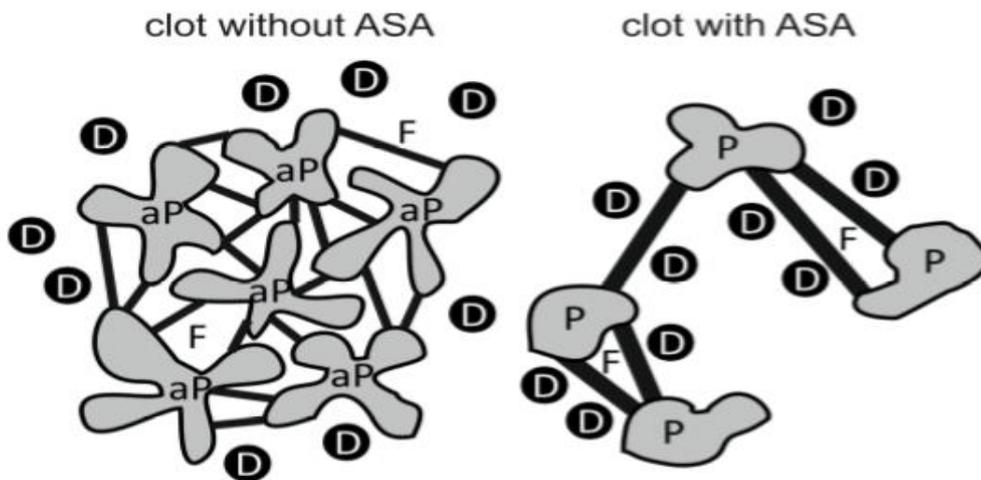


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Einflusses von ASS auf die Thrombusstruktur. Aktivierte Plättchen (aP) und weniger aktivierte Plättchen (P) sind durch Fibrin (F) miteinander vernetzt. ASS inhibiert Cyclooxygenase-1 und damit die Synthese von Thromboxan A₂. Dieses führt zu einer geringeren Thrombozytenaggregation und Thrombozytenaktivierung. Zudem acetyliert ASS Lysin-Rückstände am Fibrinogen, woraus ein weniger kompaktes Fibrinnetzwerk entsteht. Aufgrund dessen können Thrombolysemedikamente (drugs, D) tiefer in den Thrombus eindringen, welches zu einer höheren Thrombolyse rate führt.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

- α -Granula: Alpha-Granula
- AIS: Akuter ischämischer Schlaganfall
- ASS: Aspirin
- ATT: Antithrombotic Trialists
- BC: Buffy Coat
- BMI: Body-Mass-Index
- CAPRIE: Trial of Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events
- CCT: kraniale Computertomographie
- DEDAS: Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke
- df: fractal dimension
- DGN: Deutschen Gesellschaft für Neurologie
- DIAS: The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial
- DSPA: Desmodus Rotundus Salivary Plasminogen Activator; Desmoteplase
- ECASS: European Cooperative Acute Stroke Study
- IST-3: Third International Stroke Trial
- MRT: Magnetresonanztomographie
- NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale
- NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke
- NNT: number needed to treat
- OHS: Oxford Handicap Scale
- PFP: Plättchen-freies-Plasma
- PRP: Plättchen-reiches-Plasma
- REM: Rasterelektronenmikroskop
- rt-Pa: Rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
- TEM: Transmissionselektronenmikroskop
- TIA: transitorische ischämische Attacke
- t-Pa: Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
- US: Ultraschall
- vs.: Versus
- vWF: von-Willebrand-Faktor

7.3 Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. F. Roessler
Klinik für Neurologie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Stellv. Vorsitzende
Frau Prof. Dr. med. M. Schrader
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine
Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-
luebeck.de

Aktenzeichen: 07-193
Datum: 09. August 2012

Versuche zur Untersuchung der Wirkmechanismen der Sonothrombolyse mit Desmoteplase und Optimierung an einem statistischen in-vitro-Modell

Hier: Amendment 2 – Ihr Schreiben vom 19. Juli 2012 (Eingang 08.08.2012)

Sehr geehrter Herr Dr. Roessler,

Sie informieren uns in Ihrem Schreiben vom 19.07.2012 über das oben genannte Forschungsvorhaben. Es handelt sich dabei um eine Versuchsreihe, die der Vorgehensweise im unter dem AZ 07-193 bereits zustimmend bewerteten Studienvorhaben weitgehend entspricht. Die Untersuchungen erfolgen im Rahmen einer experimentellen Doktorarbeit. Bei regulären Blutspenden sollen für dieses Vorhaben zusätzlich jeweils 6-8 ml Blut von gesunden Blutspendern für die oben genannte Studie entnommen werden. Dieses Amendment habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen. Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

7.4 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die durch Ihre Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein Dank gilt dem Direktor der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck, Herrn Professor Dr. med. Thomas Münte für die Genehmigung, meine Dissertation in seiner Klinik anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jürgen Eggers für die freundliche Betreuung, die Ideengebung und die große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank meinem Betreuer Dr. med. Dr. rer. medic. Florian C. Roessler, für die begeisternde Hilfe bei der Durchführung der Experimente, bei Hilfestellungen und der Zusammenarbeit bei der Anfertigung der Publikation.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Blutspendezentrums am Campus Lübeck bedanken, ohne deren Hilfe ich die Experimente nicht hätte durchführen können.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Ulrich Gärtner vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen für die Bereitstellung des elektronenmikroskopischen Bildmaterials.

Mein außerordentlicher Dank gilt Carl Vahldieck, ohne dessen Geduld und liebevolles Verständnis diese Arbeit nicht hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht, differenzierten Anmerkungen und vor allem die Unterstützung und der Halt haben mir immer wieder Kraft gegeben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Marion und Joachim Kasperski und meinem Bruder Michael Schumacher, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben, immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

7.5 Lebenslauf

Sabrina Schumacher

Spillerstraße 11 · 23564 Lübeck · Tel.: +49-0172-1720140

Sabrina.Schumacher1988@yahoo.de



■ Persönliche Daten

Name:	Sabrina Schumacher
Geburtsdatum:	22.07.1988
Geburtsort:	Lüdenscheid
Familienstand:	Ledig, keine Kinder
Konfession:	Evangelisch

■ Schulbildung

1995- 1996:	Grundschule in Herne
1996- 1999:	Grundschule in Adendorf
1999- 2001:	Orientierungsstufe in Adendorf
2001- 2008:	Gymnasium Johanneum in Lüneburg
Juni 2008:	Abitur am Gymnasium Johanneum

■ Studium

Oktober 2008 - August 2010: Göttingen	Humanmedizin, Georg- August- Universität
August 2010:	1. Staatsexamen, Georg- August- Universität Göttingen
April 2011- Juli 2015:	Humanmedizin, Universität zu Lübeck
April 2014:	2. Staatsexamen, Universität zu Lübeck
Juni 2015:	3. Staatsexamen, Universität zu Lübeck
07. Juli 2015:	Approbation

■ Berufliche Laufbahn

August 2015 – Dezember 2015:	Assistenzärztin in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe UKSH Lübeck
Seit Januar 2016:	Assistenzärztin in der Kardiologie Sana Klinik Lübeck

■ Publikationsverzeichnis

07. Mai 2014: Posterpräsentation: The impact of acetylsalicyl acid on in-vitro sonothrombolysis auf der European Stroke Conference in Nizza

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.

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(3-4): 128-137

Schumacher S, Weil J: Vermeintliche Therapieresistenz. Erst nach Jahren fand man die Hochdruckursache. *Cardiovasc* 2018; 18(2): 30-31