

Die Rolle der Neuroinflammation in der Genese von ischämischen Hirninfarkten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Laura Verena Bergmann, geb. Piotrowski

aus Hagen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dr. med. Konstantinos Gousias
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.09.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	6
1.1 Einleitung	6
1.2 Material und Methoden	8
1.3 Ergebnisse	13
1.4 Diskussion	15
1.5 Zusammenfassung	18
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	19
2. Veröffentlichung	28
Abstract	28
Introduction	29
Materials and Methods	29
Results	32
Discussion	34
References	37
3. Danksagung	39

Abkürzungsverzeichnis

ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
AF	Vorhofflimmern
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
CCI	Charlson Comorbidity Index
CI	Konfidenzintervall
CitH3	Citrulliniertes Histone 3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie
IgG	Immunglobulin G
IL-17/IL-17a	Interleukin-17/-17a
IL-22	Interleukin-22
IQR	Interquartilbereich
IVT	Intravenöse Thrombolyse
LDG	Low Density Granulozyten
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
MT	Mechanische Thrombektomie

NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophil extracellular traps
NETosis	Prozess der NET-Ausbildung
NIHSS	National Institutes of Health Schlaganfallskala
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase-4
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ROS	Sauerstoffradikale
RPM	Umdrehungen pro Minute
rtPA	Gewebeplasminogenaktivator
SD	Standardabweichung
TICI	Thrombolyse bei Hirninfarkt
TNF α	Tumornekrosefaktor α
WBC	Weißer Blutkörperchen

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Als Schlaganfall bezeichnet man ein akut einsetzendes fokal-neurologisches Defizit aufgrund einer gefäßbedingten Erkrankung des Gehirns. Hierbei kommt es zu einer Schädigung des Hirngewebes durch einen Gefäßverschluss oder eine intrazerebrale Blutung (Pschyrembel, 2020; Hankey, 2017). Allein in Deutschland treten jedes Jahr ca. 260.000 Schlaganfälle auf (Heuschmann et al., 2010). Mit ca. 80 % bilden ischämische Schlaganfälle die größte Subgruppe (Kolominsky-Rabas et al., 2015; Nimptsch und Mansky, 2012). Diese haben verschiedene Ursachen, doch trotz ausführlicher Diagnostik und Forschung handelt es sich bei ca. 25 % der Fälle um kryptogene Schlaganfälle (Kolominsky-Rabas et al., 2015). Als empfohlene Therapieoption kommt eine mechanische Thrombektomie (MT) in Kombination mit einer intravenösen Thrombolyse (IVT) mittels Gewebefibrinolyse (rtPA) in Frage (Bracard et al., 2016). In einer Metaanalyse zur Anwendung von rtPA bei 6.756 akuten Schlaganfallpatienten zeigten Emberson et al. (2014), dass eine Behandlung mit rtPA innerhalb des 4,5-Stunden-Zeitfensters die Chancen auf ein gutes klinisches Outcome signifikant erhöht, jedoch profitieren nicht alle Patienten von einer IVT mit rtPA (Macrez et al., 2011; Powers et al., 2018). Durch Ergänzung einer MT, bei der der Thrombus mittels Stent-Retriever über einen Katheter aus dem verschlossenen Gefäß geborgen wird (Ringleb et al., 2015), kann das klinische Outcome der Patienten verbessert werden (Lambrinos et al., 2016). Gerade Patienten mit einem kryptogenen Schlaganfall zeigen trotz leitliniengerechter Behandlung eine höhere Sterblichkeit und ein schlechteres Outcome (Al Khathaami et al., 2019) und haben somit ein höheres gesundheitliches Risiko für Langzeitfolgen (Heuschmann et al., 2011; Takashima et al., 2017). Endovaskuläre Therapien wie die MT haben diesbezüglich ein neues Forschungsfeld eröffnet, das die Analyse der für den intrakraniellen Verschluss verantwortlichen Thromben, insbesondere der rtPA-resistenten Thromben, ermöglicht. (Ducroux et al., 2018). Ein genaueres Verständnis über den Pathomechanismus der Thrombogenese und weiterer zirkulierender thrombogener Faktoren im Serum von Schlaganfallpatienten kann bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen helfen, um langfristig das klinische

Outcome von bisher therapieresistenten Schlaganfallpatienten zu verbessern. Neuere Forschungen deuten darauf hin, dass hier vor allem die Neuroinflammation eine große Rolle in der Genese arterieller Thromben spielt (Brühl et al., 2012; Manda-Handzlik und Demkow, 2019; Perez-de-Puig et al., 2015). Es kommt zur Bildung einer Immunthrombose, dabei ist die Synthese von sogenannten Neutrophil extracellular traps (NET) entscheidend (Carestia et al., 2020), welche erstmals 2004 von Brinkmann et al. beschrieben wurden. NET sind Netze aus glatten Filamenten mit einem Durchmesser von 17 nm. Diese bestehen aus extrazellulärer DNA und Proteinen, welche von Neutrophilen ausgeschüttet werden (Brinkmann et al., 2004).

Damit Neutrophile NET bilden, müssen diese stimuliert werden. In den vergangenen Jahren wurden viele verschiedene Stimulationsmechanismen herausgefunden, wie zum Beispiel die Infektionen mit Bakterien, Pilzen oder Viren wie HIV oder COVID-19 (Fuchs et al., 2007; Brinkmann et al., 2004; Saitoh et al., 2012; Skendros et al., 2020). Aber auch körpereigene Auslöser wie Antikörper bei Vaskulitiden der kleinen Gefäße (Kessenbrock et al., 2009) und Antigen-Antikörper-Komplexe bei Patienten mit Psoriasis (Lande et al., 2007) oder systemischem Lupus erythematoses (Garcia-Romo et al., 2011) wurden identifiziert. Allen Auslösern gemeinsam ist die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) innerhalb der Neutrophilen, welche die Ausschüttung von Neutrophiler Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO) aus den Granula stimuliert. ROS stimuliert außerdem die Peptidylarginin-Deiminase-4 (PAD4), diese citrulliniert das Histone H3, wodurch es seine positive Ladung verliert und in Zusammenspiel mit NE zu einer Dekondensation des Chromatins in den DNA-Strängen führt (Masuda et al., 2016; Papayannopoulos et al., 2010). Fuchs et al. (2007) demonstrierten in Zellkulturversuchen, dass nach wenigen Stunden MPO und NE zum Zerfall der Kernhülle führen und sich die dekondensierte DNA im Nucleoplasma mit dem Zytoplasma zu einer homogenen Masse vermischt. Schließlich reißt die Zellmembran und das Innere der Zelle wird in den extrazellulären Raum ausgestoßen und bildet so NETs. Neben MPO und NE konnten z.B. auch IL-17/ IL-17A, TNF α sowie weitere Chemokine und Interferone als kausal für den Prozess der NET-Ausbildung (NETosis) identifiziert werden (Kolaczowska und Kubes, 2013; Lee et al., 2017; Sur Chowdhury et al., 2014). Diese Faktoren sind wohlmöglich für ein erhöhtes thrombogenes Risiko verantwortlich.

Nicht alle neutrophilen Granulozyten besitzen das gleiche Potenzial zur NETosis. Vor allem Low Density Granulozyten (LDG) mit ihrer Expression von CD66b⁺ besitzen proinflammatorische Eigenschaften und bilden NETs aus (Carmona-Rivera und Kaplan, 2013). NETs sind rtPA resistent und lassen sich nur durch Hinzunahme von DNase-I auflösen (Fuchs et al., 2010). Möglicherweise findet sich hier eine Ursache des Versagens der IVT bei Schlaganfallpatienten und bildet damit einen neuen Ansatz für die Behandlung von therapieresistenten und kryptogenen Schlaganfällen, welche im Rahmen dieser Studie weiterführend untersucht werden sollte.

Ziel der Studie war es, die Rolle der Immunthrombose bei Schlaganfallpatienten zu beleuchten und weitere thrombogene Risikofaktoren zu identifizieren. Da in vielen Studien der Zusammenhang zwischen einer arteriellen Thrombose und NETosis gezeigt werden konnte, gehen wir davon aus, dass auch bei der Entstehung von akuten Verschlüssen zerebraler Arterien die Immunthrombose eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck verglichen wir das immunologische Profil von Schlaganfallpatienten mit einer Kontrollgruppe. Außerdem verglichen wir das NETosis-Potenzial der Neutrophilen beider Gruppen und analysierten die Zusammensetzung von geborgenen Thromben aus der MT unserer Schlaganfallpatienten.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Patienten

Wir analysierten zwischen Februar und Mai 2018 prospektiv die Proben und Daten von 48 erwachsenen Patienten (>18 Jahre) mit akutem ischämischem Schlaganfall als Folge eines großen einseitigen Arterienverschlusses, d.h. Verschluss der intrakraniellen Arteria carotis interna (ACI), Arteria cerebri media (ACM) oder Arteria basilaris/vertebralis, welche zur notfallmäßigen Behandlung und mechanischen Thrombektomie (MT) in die neuroradiologische Abteilung des Alfred-Krupp-Krankenhaus in Essen eingeliefert wurden. Als Kontrollgruppe dienten 16 altersgleiche Patienten mit Lumbago, die in den neurochirurgischen Abteilungen des St. Marien Hospitals Lünen und des BG Bergmannsheils Bochum behandelt wurden. Ausschlusskriterien waren aktive Krebserkrankungen, eine Chemotherapie, aktive

bakterielle oder virale Infektion, eine Autoimmunerkrankung in der Anamnese oder eine aktuelle immunmodulatorische Medikation. Patienten, bei denen kritische Parameter, wie der Zeitpunkt des Auftretens der Schlaganfallsymptome, nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Somit blieben nach Anwendung der Ausschlusskriterien 35 Schlaganfallpatienten in der Untersuchungsstichprobe und 16 Patienten in der Kontrollgruppe für die endgültigen Analysen übrig. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Ruhr-Universität Bochum (Votum der Ethikkommission 17-6060) und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Votum der Ethikkommission 2020-310-f-S) genehmigt und im Deutschen Klinischen Studienregister angemeldet (ID: DRKS00013278). Alle Methoden wurden gemäß geltenden Leitlinien und Vorschriften durchgeführt, sowie die Zustimmung aller Patienten bzw. derer gesetzlichen Vertreter eingeholt.

Die Blutabnahme der Untersuchungsgruppe erfolgte vor der MT und IVT mittels rtPA, sodass eine Veränderung der Blutzellen und Serumproben durch oben genannte Maßnahmen vermieden wurde. Gleichfalls wurden die Patienten ohne zeitliche Verzögerung gemäß der deutschen Leitlinien zur Behandlung von Schlaganfällen (Mader und Schwenke, 2020) therapiert. Die Blutentnahme der Kontrollgruppe erfolgte im Rahmen einer Routine-Blutentnahme während der stationären Aufnahme.

Folgende Variablen der Patienten wurden aus der Anamnese erfasst: Geschlecht (weiblich/männlich), National Institutes of Health Schlaganfallskala (NIHSS) bei Aufnahme/ nach MT und bei Entlassung, Zeitpunkt des Auftretens der Schlaganfallsymptome ($< 4,5$ vs. $\geq 4,5$ h), Komorbiditäten (arterielle Hypertonie/ Diabetes mellitus/ Nierenerkrankung/ Lebererkrankung/ Herzinfarkt/ Lungenerkrankung/ nicht aktive Krebserkrankung mit Diagnosezeitpunkt > 5 Jahre), Charlson Comorbidity Index (CCI), Lage und Ort des Arterienverschlusses, Vorgeschichte eines älteren abgegrenzten Infarkts (ja/nein), Vorhofflimmern (AF) (ja/nein), Behandlungsmodalitäten (MT vs. MT und IVT), Thrombolyse bei Hirninfarkt (TICI), Score der Rekanalisation, Einnahme von neuen oralen Antikoagulantien/ Vitamin-K-Antagonisten/ Thrombozytenaggregationshemmer und Alter.

1.2.2 Isolierung von Neutrophilen, PBMCs und CD4-Zellen

Laborchemisch untersuchten wir im Blut die absolute Anzahl an weißen Blutkörperchen (WBC), Neutrophilen, LDGs und CD4-Zellen. Hierfür wurden je 20 ml Blut in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Monovetten gefüllt und mit je 2,5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. In einer Dichtegradientenzentrifugation (Lymphozyten-Separations Medium; 1077 GE Healthcare) über 25 Minuten bei 600 g und 4 °C konnten Neutrophile von Lymphozyten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), worunter auch die LDGs fallen, isoliert werden. Die PBMCs wurden mittels Pipette abgesaugt, in ein weiteres Falcontube zusammen mit 20 ml PBS überführt und auf Eis für eine spätere Durchflusszytometrie (FACS) gelagert. Die gewonnenen Neutrophilen wurden weiterführend in einer Erylyse mittels hypotoner Natriumchloridlösung von Erythrozyten bereinigt und standen anschließend für die FACS und Zellkulturversuche zur Verfügung.

1.2.3 FACS-Analyse von Oberflächenmarkern und intrazellulären Markern

Für die FACS-Färbung wurden je 300-400 µl der Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml RPMI-Medium 1640 (Gibco, GE Healthcare) in ein Glastube überführt und bei 1400 RPM und 4 °C für 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit den verdünnten Farbstoffen nach Tabelle 1 vermischt und für 30 Minuten auf Eis gelagert.

Tab. 1: Oberflächen-/Intrazellulärer Marker und entsprechende Farbstoffe

Oberfläche-/ Intrazellulärer Marker	Fluorochrome	Zellen	Firma	Verdünnung
CD11c	PcP-Cy5	Myeloide Zellen, dendritische Zellen, NK-Zellen	BioLegend	1:150
CD14	PE	Monozyten	BioLegend	1:200
CD15	APC	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten	BioLegend	1:100
CD16	APC-Cy7	Neutrophile, NK-Zellen, Makrophagen	BioLegend	1:150
CD56	BV510	NK-Zellen	BioLegend	1:100
CD66b	FITC	Granulozyten, LDGs	BioLegend	1:100
CD 4	BV650	Monozyten, Makrophagen, T-Helferzellen	BioLegend	1:100
IFN- γ	PB	Monozyten, T-Helferzellen	BioLegend	1:100
IL-22	PE	Monozyten, T-Helferzellen	BioLegend	1:100
IL-17	PcP	TH-17-Zellen	BioLegend	1:100

Weiter wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Zur intrazellulären Färbung der Zytokinspiegel von CD4⁺-Zellen wurden die PBMCs mit 5 ng/mL Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Sigma-Aldrich) und 500 ng/mL Ionomycin (Sigma-Aldrich) stimuliert. 30 Minuten nach Stimulationsbeginn wurden 5 µg/mL Brefeldin A (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, um die Freisetzung der Zytokine aus dem Intrazellularraum zu verhindern. Die Stimulation wurde nach 5 Stunden gestoppt und die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, mit 0,05 % Saponin (Sigma-Aldrich) behandelt und intrazellulär mit Farbstoffen nach Tabelle 1 gefärbt.

Die Expressionswerte aller Färbungen wurden mittels FACS (BD FACS Canto II) bestimmt, diese Daten wurden in FlowJo V10.1 analysiert und die Statistiken in GraphPad Prism 5.0 berechnet.

1.2.4 Stimulierung der NET-Bildung in vitro

Die NET-Bildung wurde in vitro durch Ausplattieren gereinigter Neutrophiler in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium 1640 (Gibco, GE Healthcare) vorbereitet und mit 10 mM HEPES und 0,2 % Humanserumalbumin ergänzt. Die Zellen ruhten für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) beschichteten 24er Wellplatte (Sarstedt GmbH). Anschließend wurden die Neutrophilen mit 100 ng PMA (positive Kontrolle) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) (negative Kontrolle) für 3 h behandelt. Die Proben wurden anschließend entweder direkt mit 5 mM Sytox Green (Life Technologies) für 10 min gefärbt und mit 4% PFA fixiert oder mit rekombinanter DNase-I (Roche) für 30 min vor der Fixierung behandelt. Die NET-Bildung wurde anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager. Z2; Carl Zeiss) unter Verwendung eines 10x (numerische Apertur 0,3) Plan-Neofluar Vergrößerungsobjektives dargestellt und fotografiert. Die Bilder wurden mit der Software ImageJ (Version 1.52a) analysiert, indem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen wurde.

1.2.5 Quantifizierung der NETosis mit Sytox Green

Um zu quantifizieren, wie stark das Plasma der Schlaganfallpatienten die Neutrophilen zur NETosis anregen, führten wir eine weitere in vitro Stimulation durch. Dafür wurden 1×10^5 Neutrophile in 100 µl RPMI-Medium 1640 (Gibco, GE Healthcare) auf eine 96er

Wellplatte aufgetragen und für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Neutrophilen mit 100 ng PMA (positive Kontrolle), DMSO (negative Kontrolle) oder den verschiedenen Patientenseren (50 %) stimuliert und für 3 h wie oben beschrieben inkubiert. Zur anschließenden Fluoreszenzfärbung wurde im Verhältnis von 1:2000 Sytox Green (Life Technologies) in jedes Well pipettiert und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde mit einem Platten-Lesegerät (TECAN Infinite M1000 Pro) die Fluoreszenzintensität photometrisch mit einer Wellenlänge von 485/583 nm gemessen.

1.2.6 Bestimmung von DNase-I

Zur Quantifizierung von DNase-I in Seren der Patienten mit ischämischem Schlaganfall im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen wurde ein ELISA für DNase-I (MBS285079; MyBioSource) gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Seren wurden im Dichtegradienten 1:3 verdünnt.

1.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von NETs und CD66b in Thromben

Die gewonnenen Thromben wurde umgehend in Tissue Teck O.C.T. Lösung (Sakura Finetek) konserviert und bei -80 Grad bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für den Kryostatschnitt wurden die Proben auf -20 °C erwärmt und in 9 µm dicke Proben geschnitten. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Human-CD66b-PE-Antikörper (BioLegend), Sytox Green (Thermo Fisher Scientific) oder DAPI (Thermo Fisher Scientific) und einem Kaninchen-Anti-human-Cit-3H-Antikörper (abcam) über Nacht bei 4 °C. Die Cit-H3-Expression wurde mit einem sekundären Ziegen-Antikaninchen-FITC-Antikörper sichtbar gemacht, als Negativkontrolle diente die Färbung mit IgG-PE und IgG-FITC (BioLegend). Alle Proben wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioImager.Z2 (Carl Zeiss) untersucht und mit der Software ImageJ (Version 1.52a) analysiert.

1.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse unserer klinischen und molekularen Daten wurde mit SPSS (Version 26, IBM Deutschland, Ehningen, Deutschland) und GraphPad (Software Prism 5.0, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Standardverfahren wurden für univariate Daten angewandt (Exakter Test nach Fisher, Chi-Quadrat Test, Shapiro-Wilk-Test,

Kruskal-Wallis-Test, die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ gesetzt) sowie multivariate Analysen (ANOVA mit Bonferroni's multiplem Vergleichstest Test, binäre logistische Regression mit Rückwärts-Wald Methode). Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder als Median \pm (Interquartilbereich [IQR]) im Falle einer nicht-normalen Verteilung dargestellt und mit ANOVA bzw. Mann Whitney U-Test verglichen. Kategorische Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test analysiert. Die Korrelation zwischen den Entzündungsparametern wurde mit dem Spearman-Rho-Test durchgeführt. Alle Konfidenzintervalle (CI) wurden mit 95,0 % bewertet.

1.3 Ergebnisse

Datsi et al. (2022) untersuchten Proben und Daten von 35 Schlaganfallpatienten, der Altersmedian lag bei 77 Jahren. Bei 14 Patienten (40,0%) lagen mehr als 4,5 Stunden zwischen Symptombeginn und Zeitpunkt der MT, ein Wake-up Stroke, das heißt Symptombeginn während des Schlafens, lag bei 6 Patienten (17,1%) vor. Gemessen anhand der NIHSS wurden bei Aufnahme 9 Patienten (25,7%) mit leichten Symptomen, 15 Patienten (42,9%) mit mittleren Symptomen und 11 Patienten (31,4%) mit schweren Symptomen eines Schlaganfalls in die Studie eingeschlossen. Zur Dokumentation weiterer Vorerkrankungen unserer Patienten nutzen wir den CCI, hierbei wiesen 18 Patienten (51,4%) einen CCI von 0 oder 1 auf. Bei 7 Patienten (20,0%) war bereits ein Vorhofflimmern bekannt, bei weiteren 8 Patienten (22,8%) konnte während des Krankenhausaufenthalts ein Vorhofflimmern neu diagnostiziert werden. Vor der MT wurde bei 14 Patienten (40,0%) eine IVT durchgeführt, bei 94,3% aller Schlaganfallpatienten konnte eine erfolgreiche Rekanalisierung erreicht werden.

Unsere Kontrollgruppe war bezüglich der untersuchten demographischen sowie klinischen Parameter vergleichbar.

In den Untersuchungen bezüglich des immunologischen Profils der Schlaganfallpatienten und der Kontrollgruppe konnten einige signifikante Unterschiede festgestellt werden. So zeigten Schlaganfallpatienten eine höhere absolute Anzahl an neutrophilen Granulozyten ($p = 0,007$), LDGs ($p = 0,003$) und DNase-I Expression ($p \leq 0,001$). Außerdem war die absolute Anzahl an CD4⁺-Zellen ($p = 0,005$) und ihrer proinflammatorischen Zytokine IL-17 ($p \leq 0,001$), INF- γ ($p \leq 0,001$) und IL-22 ($p \leq 0,001$) im

Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 3 der Originalpublikation). Lediglich bezüglich der absoluten Anzahl an CD66b⁺- Neutrophilen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die in der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMCs und Neutrophilen konnten erfolgreich gefärbt werden. In der FACS-Analyse zeigte sich unter den isolierten Neutrophilen eine mittlere Reinheit von 98,9% in beiden Untersuchungsgruppen. Die darin enthaltenen CD66b⁺-Neutrophilen wurden im gleichen relativen Verhältnis bei Schlaganfallpatienten identifiziert wie bei der Kontrollgruppe. Innerhalb der PBMCs wurden LDGs als CD14⁺CD16⁺CD66b⁺-Lymphozyten definiert und konnten als Population innerhalb der FACS-Analyse dargestellt werden. Schlaganfallpatienten zeigten auch hier eine signifikant erhöhte Anzahl an LDGs ($p = 0,003$), jedoch zeigte sich erneut ein gleicher Anteil an CD66b⁺- Neutrophilen innerhalb der PBMCs in beiden Untersuchungsgruppen (siehe Abbildung 1 der Originalpublikation).

In den Zellkulturversuchen gelang es die isolierten Neutrophilen mittels PMA zur NETosis zu stimulieren. Die von PMA induzierte NE und die dadurch induzierten NETs ließen sich in der Fluoreszenzmikroskopie mittels DAPI bzw. Sytox Green darstellen. Abbildung 3 der Originalpublikation zeigt, dass Neutrophile von Schlaganfallpatienten ein höheres Potential haben NETs zu bilden als die Neutrophilen der Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Gleichzeitig zeigten auch nicht stimulierte Neutrophile der Schlaganfallgruppe (Negativkontrolle mit DMSO) eine erhöhte MFI im Vergleich zur Negativkontrolle der Kontrollgruppe ($p \leq 0.01$) und bereits gebildete NETs ließen sich schlechter durch DNase-I auflösen ($p \leq 0.01$).

Auch das Serum von Schlaganfallpatienten, welches anstelle von PMA zur NETosis-Stimulation genutzt wurde, zeigte ein höheres Potenzial NETosis in isolierten Neutrophilen auszulösen im Vergleich zum Serum der Kontrollgruppe ($p \leq 0.01$). Im Serum der Schlaganfallpatienten konnte außerdem eine signifikant erhöhte DNase-I-Aktivität ($p \leq 0.001$) mittels ELISA nachgewiesen werden.

In den geborgenen Thromben aus der MT konnten CD66b⁺-Neutrophile nachgewiesen werden sowie Cit-H3-Expression, sodass von echter NETosis und nicht nur Apoptose ausgegangen werden kann. Gleichzeitig ließen sich NETs darstellen, diese fanden sich

vor allem im Randbereich der Thromben, aber auch im Zentrum des Thrombus und gehäuft um die CD66b⁺-Neutrophile. Je mehr CD66b⁺-Neutrophile in einem Thrombus nachgewiesen wurden, desto mehr NETs fanden sich in diesen ($r_s = 0,564$, $p = 0,002$). Gleichzeitig korreliert der relative Anteil an CD66b⁺-Neutrophilen in PBMCs der Schlaganfallpatienten positiv mit einer höheren Anzahl an NETs in den geborgenen Thromben ($r_s = 0,472$, $p = 0,013$). Darüber hinaus profitierten Patienten mit weniger CD66b⁺-Neutrophilen in Thromben mehr von einer MT, da sich ihr NIHSS nach Intervention stärker verbesserte ($p = 0,038$). Auch nach Anpassung aufgrund möglicher Störvariablen wie z.B. Alter, Geschlecht oder Therapieform konnte durch die Berechnung von Partialkorrelationen ein unabhängiger Zusammenhang zwischen niedrigen Werten an CD66b⁺-Neutrophilen in Thromben mit einer stärkeren Verbesserung der NIHSS nach MT ($p = 0,045$) nachgewiesen werden.

Bezüglich klinischer Patientendaten zeigte sich, dass vor allem Schlaganfallpatienten mit Symptombeginn > 4,5 h eine erhöhte DNase-I-Aktivität im Serum ($U = 30$, $p = 0,045$) und mehr NETosis in den geborgenen Thromben ($U = 30$, $p = 0,032$) haben. Andere signifikante klinische Parameter im Zusammenhang mit der Immunthrombose ließen sich nicht identifizieren.

Jedoch konnte ein Zusammenhang zwischen anderen immunologischen Parametern und dem Outcome entdeckt werden. Patienten mit einem NIHSS < 5 bei Aufnahme zeigten insgesamt eine niedrigere Anzahl an Neutrophilen im Blut ($p = 0,046$). Bei Patienten mit verbessertem NIHSS nach der MT wurden niedrigere IL-22-Werte ($p = 0,012$) und weniger Monozyten ($p = 0,039$) gefunden. In einer multivariaten Analyse zur Bestimmung potenzieller prognostische Faktoren für ein günstigeres kurzfristiges Outcome, definiert als NIHSS < 5 bei Entlassung, konnte kein unabhängiger Parameter entdeckt werden.

1.4 Diskussion

Es wird schon lange eine Beteiligung des Immunsystems und der Neuroinflammation an Schlaganfällen vermutet. Dass vor allem Leukozyten eine große Rolle dabei spielen (Arumugam et al., 2005; Christensen und Boysen, 2004), konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, aber auch andere Entzündungsparameter wie Zytokine und Chemokine

(Brea et al., 2009; Chamorro et al., 2012; Liesz und Kleinschnitz, 2016). Es wird angenommen, dass durch die Ischämie, den Zelltod und den oxidativen Stress eine intensive Entzündungsreaktion ausgelöst wird, auf die eine vorübergehende Immunsuppression folgt (Gill und Veltkamp, 2016; Liesz und Kleinschnitz, 2016; Ruhnau et al., 2017). Noch ungeklärt ist jedoch die Frage, ob die Neuroinflammation nur eine Folge des Schlaganfalls ist oder auch ein Auslöser sein kann. Bei einem Schlaganfall kommt es auch zur Ansammlung von Neutrophile, welche an dem geschädigten Endothel haften (Brinkmann und Zychlinsky, 2012). Darbousset et al. (2012) konnten Neutrophile sogar als Schlüsselpartner neben Thrombozyten bei der Entstehung von arteriellen Thromben identifizieren. Diese haften bereits vor der Thrombozytenaktivierung und -aggregation an das geschädigte Endothel. Diese Erkenntnis könnte für Neutrophile als Auslöser eines Schlaganfalls sprechen.

In arteriellen und venösen Thromben konnten bereits NETs identifiziert werden (Fuchs et al., 2010; Martinod und Wagner, 2014). Genchi et al. (2021) untersuchten Thromben von 80 Schlaganfallpatienten und konnten in allen Thromben NETs nachweisen, jedoch war der Anteil an NETs in Thromben kardioembolischer Ätiologie im Vergleich zu atherosklerotischer Ätiologie am größten. Auch sie vermuten, dass hier eine weitere Art der Thrombogenese vorliege, welche in der TOAST-Klassifikation nicht abgebildet ist. Datsi et al. (2022) konnten in den Thromben aller Schlaganfallpatienten NETs mittels Immunofluoreszenzfärbung nachweisen.

Diese Hypothese kann durch die mangelnde Wirksamkeit einer IVT untermauert werden, da der Angriffspunkt von rtPA das Fibrin ist. Mangold et al. (2015) beschleunigten die Lyse koronarer Thromben ex vivo durch Hinzugabe von DNase-I. Ebenso wiesen Ducroux et al. (2018) NET in 108 Thromben von Schlaganfallpatienten nach. In einem Versuch zur Thrombolyse ex vivo war eine Kombination aus rtPA mit DNase-I einer Behandlung mit rtPA allein deutlich überlegen. Auch die Zusammensetzung von Thromben kann die Wirksamkeit der Thrombolyse mit rtPA beeinflussen, da erythrozytenreiche Thromben im Vergleich zu thrombozytenreichen Thromben als anfälliger für diese Thrombolyse beschrieben werden (Kirchhof et al., 2003; Niessen et al., 2003). Die oben genannten Studien identifizieren NET als potenzielles pharmakologisches Ziel, um die Effizienz der IVT zu steigern.

Da die NET-Bildung in Thromben eine systemische Veränderung des Immunsystems widerspiegelt, könnten die Bildung und der Abbau von NETs bei Schlaganfallpatienten auch in der Peripherie gestört sein. Daher zielten Datsi et al. (2022) darauf ab, die Rolle der NETs, die Wirksamkeit von DNase-I und die Freisetzung von NETs aus CD66b⁺-Neutrophilen bereits im Blut zu analysieren und später einen Zusammenhang mit den geborgenen Thromben nachzuweisen. Zu diesem Zweck isolierten wir Neutrophile von Schlaganfallpatienten und gesunder Kontrollpersonen und verglichen das Potenzial NETs in vitro zu bilden und diese mittels DNase-I abzubauen. Hierbei fanden wir große Unterschiede, Neutrophile von Schlaganfallpatienten zeigen ein höheres Potenzial NETs auszubilden und lassen sich schlechter durch DNase-I auflösen im Vergleich zu NETs der gesunden Kontrollpersonen (siehe Abbildung 3 der Originalpublikation). Datsi et al. (2022) zeigten, dass bereits die isolierten Neutrophilen aus dem peripheren Blut diese Eigenschaften besitzen. Dies könnte die Hypothese unterstützen, dass NETosis zur Thrombosebildung führen kann. Demnach wäre NETosis nicht nur eine Folge der Neuroinflammation, sondern eine Ursache eines Schlaganfalls. Vallés et al. (2017) zeigten, dass die Werte für NET und citH3 im Serum bei Schlaganfallpatienten auch in einer 12-monatigen Nachuntersuchung signifikant erhöht waren. Unter diesem Gesichtspunkt können NET und CD66b⁺-Neutrophile als potenzielles therapeutisches Ziel nicht nur während der IVT, sondern auch hinsichtlich einer Prophylaxe von Bedeutung sein.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von NET an der Entstehung von ischämischen Schlaganfällen zeigten Datsi et al. (2022) mit der Tatsache, dass bei Patienten, deren Symptome länger bestanden, mehr NETs in ihren Thromben und eine höhere DNase-I-Aktivität im Serum nachgewiesen werden konnte. Dieser Nachweis deutet auf eine intrinsische Aktivierung einer Thrombolyse durch DNase-I hin. Kim et al. (2020) untersuchten den Prozess der NETosis bei chronischen Hämodialysepatienten und fanden keine Korrelation zwischen NET-Bildung und DNase-I Aktivität im Serum, wohingegen Vaibhav et al. (2020) eine reduzierte DNase-I-Aktivität bei erhöhten Werten für zirkulierende NETs bei Patienten mit traumatischen Hirnverletzungen feststellten. Sie interpretierten die geringe DNase-I-Aktivität als Pathomechanismus für ein schlechteres Outcome und als Ursache der Neuroinflammation. Es bedarf weiterer Forschung, um die

Bedeutung der DNase-I besser zu verstehen und als Therapieoption in Betracht zu ziehen.

Um weitere Parameter zu identifizieren, die für eine Neuroinflammation ursächlich sind, haben wir uns das immunologische Profil unserer Schlaganfallpatienten in einer Fall-Kontroll-Studie mit gesunden Kontrollpersonen angeschaut. Unsere Studie konnte signifikante Unterschiede bezüglich einer erhöhten absoluten Anzahl an Neutrophilen, LDGs sowie IL-17, IL-22 und IFN- γ -produzierenden CD4⁺-T-Zellen nachweisen. Solche hohen Konzentrationen an Zytokinen können die Granulopoese im Knochenmark beeinflussen und zu einer schnelleren Mobilisierung von Neutrophilen beitragen, wodurch eher LDGs entstehen (Hassani et al., 2020). Es wurde bereits beschrieben, dass LDG eine erhöhte Fähigkeit zur spontanen NET-Ausbildung besitzen (Carmona-Rivera und Kaplan, 2013; Kanamaru et al., 2018). Unsere Ergebnisse bestätigen frühere Berichte über erhöhte Werte von proinflammatorischen Zytokinen in der akuten Phase des ischämischen Schlaganfalls (Malone et al., 2019). Nach Durchführung der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse zwischen den immunologischen Markern im Blut und in den Thromben der untersuchten Patienten, beobachteten wir eine signifikante Korrelation von CD66b⁺-Neutrophilen im Blut und in den Thromben mit der Anzahl der NETs in den Thromben. Da CD66b ein Oberflächenmarker für die Aktivierung von Neutrophilen ist, könnte ein Zusammenhang darin bestehen, dass die Immunthrombose durch eine erhöhte NETosis und die anschließende Bildung von Thromben durch abnormal aktivierte Neutrophile gefördert wird. Unter normalen Umständen wandern Neutrophile während ihrer kurzen Lebensdauer in Richtung Gewebe durch die Arterien ohne am Gefäßendothel zu haften. Bestimmte Oberflächenmarker der Neutrophilen, wie z. B. CD66b, können jedoch die Adhäsion dieser Zellen am Endothel beeinflussen und sie aktivieren, was zur apoptotischen NET-Bildung führt (Manfredi et al., 2018; Villanueva et al., 2011).

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist der Zusammenhang von Parametern der Immunthrombose und dem Outcome der Schlaganfallpatienten. Novotny et al. (2020) analysierten 71 Thromben von Schlaganfallpatienten und stellten fest, dass Patienten mit großen Mengen an NETs ein schlechteres Outcome hatten. Auch in unserer Studie konnten wir zeigen, dass ein niedriger Wert an CD66b⁺-Neutrophilen in Thromben mit

einer stärkeren Verbesserung des Outcomes nach einer MT korreliert. Grundsätzlich können höhere CD66b- oder NET-Werte einen malignen Schlaganfallparameter darstellen, da erhöhte Werte zu Ausbildung resistenterer Thromben gegenüber der MT führen (Jolugbo und Ariëns, 2021; Staessens et al., 2021).

Aufgrund einiger Einschränkungen unserer Studie, wie z.B. der Stichprobengröße, sind keine weitreichenden Schlussfolgerungen bezüglich einer veränderten Immunität aller Schlaganfallpatienten möglich. Auch ist aufgrund des Studiendesigns keine Aussage über ein langfristiges Outcome möglich. Gleichfalls konnten wir durch ein prospektives Design und eine ausgewogene Fall-Kontroll-Studie wichtige Daten zur Expression und Funktion spezifischer Parameter der Immunthrombose im peripheren Blut und in den Thromben liefern.

1.5 Zusammenfassung

Wir verglichen das periphere immunologische Profil von Schlaganfallpatienten mit dem von gesunden Kontrollpersonen, Serumproben wurden funktionell auf die Bildung und Clearance von NETs untersucht, sowie die Zusammensetzung der geborgenen Thromben analysiert.

Das periphere Blut von Schlaganfallpatienten zeigte signifikant erhöhte Werte für DNase-I, LDG, CD4⁺-Zellen sowie der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17, INF- γ und IL-22. Wir fanden erhöhte Werte von DNase-I im Serum und NETs in Thromben bei Schlaganfallpatienten mit einer Symptombdauer > 4,5 Stunden. Niedrige CD66b⁺-Werte in Thromben waren mit einem besseren Outcome nach MT verbunden. Neutrophile von Schlaganfallpatienten zeigten ein höheres Potenzial NETs auszubilden und eine schlechtere Auflösung mittels DNase-I im Vergleich zu Neutrophilen gesunder Kontrollpersonen.

Diese Studie liefert neue Erkenntnisse über die Rolle von aktivierten Neutrophilen, LDG und NET-Bildung beim ischämischen Schlaganfall. Die beobachteten Veränderungen des Immunsystems können auch vor einem Schlaganfall auftreten und den thrombogenen Verschluss großer intrakranieller Arterien begünstigen. Somit könnten NET und CD66b als potenzielle pharmakologische Ziele in der Schlaganfalltherapie

dienen. Dennoch sind zukünftig größere Studien erforderlich, um die Rolle der Immunthrombose bei der Entstehung des Schlaganfalls zu entschlüsseln.

1.6 Literaturverzeichnis

Al Khathaami AM, Al Bdah B, Alnosair A, Alturki A, Alrebdi R, Alwayili S, Alhamzah S, Alotaibi ND. Predictors of poor outcome in embolic stroke of undetermined source. *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)* 2019; 24: 164–167

Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-Cells. *NMM* 2005; 7: 229–242

Bracard S, Ducrocq X, Mas JL, Soudant M, Oppenheim C, Moulin T, Guillemin F. Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2016; 15: 1138–1147

Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrera P, Castillo J. Inflammatory and neuroimmunomodulatory changes in acute cerebral ischemia. *CED* 2009; 27 Suppl 1: 48–64

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 2004; 303: 1532–1535

Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198: 773–783

Brühl M-L von, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *T Exp Med* 2012; 209: 819–835

Carestia A, Davis RP, Davis L, Jenne CN. Inhibition of immunothrombosis does not affect pathogen capture and does not promote bacterial dissemination in a mouse model of sepsis. *Platelets* 2020; 31: 925–931

Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 2013; 35: 455–463

Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nature reviews. Neurology* 2012; 8: 401–410

Christensen H, Boysen G. C-reactive protein and white blood cell count increases in the first 24 hours after acute stroke. *Cerebrovasc Dis (Basel, Switzerland)* 2004; 18: 214–219

Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, Renné T, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012; 120: 2133–2143

Datsi A, Piotrowski L, Markou M, Köster T, Kohtz I, Lang K, Plöttner S, Käfferlein HU, Pleger B, Martinez R, Pintea B, Fried R, Müller M, Chapot R, Gousias K. Stroke-derived neutrophils demonstrate higher formation potential and impaired resolution of CD66b + driven neutrophil extracellular traps. *BMC Neurol* 2022; 22: 186

Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, Delbosc S, Boisseau W, Deschildre C, Ben Maacha M, Blanc R, Redjem H, Ciccio G, Smajda S, Fahed R, Michel J-B, Piotin M, Salomon L, Mazighi M, Ho-Tin-Noe B, Desilles J-P. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 2018; 49: 754–757

Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, Brott T, Cohen G, Davis S, Donnan G, Grotta J, Howard G, Kaste M, Koga M, Kummer R von, Lansberg M, Lindley RI, Murray G, Olivot JM, Parsons M, Tilley B, Toni D, Toyoda K, Wahlgren N, Wardlaw J, Whiteley W, del Zoppo GJ, Baigent C, Sandercock P, Hacke W. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2014; 384: 1929–1935

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231–241

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15880–15885

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3: 73ra20

Genchi A, Semerano A, Gullotta GS, Strambo D, Schwarz G, Bergamaschi A, Panni P, Simionato F, Scomazzoni F, Michelozzi C, Pozzato M, Maugeri N, Comi G, Falini A, Roveri L, Filippi M, Martino G, Bacigaluppi M. Cerebral thrombi of cardioembolic etiology have an increased content of neutrophil extracellular traps. *J Neurol Sci* 2021; 423: 117355

Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Curr Opin Pharmacol* 2016; 26: 26–32

Hankey GJ. Stroke. *Lancet* 2017; 389: 641–654

Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, van Aalst C, Bongers S, Hietbrink F, Koenderman L, Vrisekoop N. On the origin of low-density neutrophils. *J Leukoc Biol* 2020; 107: 809–818

Heuschmann P, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas P, Berger K. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 2010; 37: 333–340

Heuschmann PU, Wiedmann S, Wellwood I, Rudd A, Di Carlo A, Bejot Y, Ryglewicz D, Rastenyte D, Wolfe CDA. Three-month stroke outcome: the European Registers of Stroke (EROS) investigators. *Neurology* 2011; 76: 159–165

Jolugbo P, Ariëns RAS. Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 2021; 52: 1131–1142

Kanamaru R, Ohzawa H, Miyato H, Yamaguchi H, Hosoya Y, Lefor AK, Sata N, Kitayama J. Neutrophil Extracellular Traps Generated by Low Density Neutrophils Obtained from Peritoneal Lavage Fluid Mediate Tumor Cell Growth and Attachment. *J Vis Exp* 2018; 138: 58201

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemärck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15: 623–625

Kim J-K, Lee HW, Joo N, Lee HS, Song YR, Kim HJ, Kim SG. Prognostic role of circulating neutrophil extracellular traps levels for long-term mortality in new end-stage renal disease patients. *Clin Immunol* 2020; 210: 108263

Kirchhof K, Welzel T, Mecke C, Zoubaa S, Sartor K. Differentiation of white, mixed, and red thrombi: value of CT in estimation of the prognosis of thrombolysis phantom study. *Radiology* 2003; 228: 126–130

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159–175

Kolominsky-Rabas PL, Wiedmann S, Weingärtner M, Liman TG, Endres M, Schwab S, Buchfelder M, Heuschmann PU. Time trends in incidence of pathological and etiological stroke subtypes during 16 years: the Erlangen Stroke Project. *Neuroepidemiology* 2015; 44: 24–29

Lambrinos A, Schaink AK, Dhalla I, Krings T, Casaubon LK, Sikich N, Lum C, Bharatha A, Pereira VM, Stotts G, Saposnik G, Kelloway L, Xie X, Hill MD. Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. *The Canadian journal of neurological sciences. Can J Neurol Sci* 2016; 43: 455–460

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, Cao W, Wang Y-H, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder J-M, Liu Y-J, Gilliet M. Plasmacytoid

dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449: 564–569

Lee KH, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim H, Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS, Yun BH, Han Y, Lee D, Lee SY, Yoo BH, Lee KH, Kim TL, Kim H, Shim JS, Nam W, So H, Choi S, Lee S, Shin JI. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2017; 16: 1160–1173

Liesz A, Kleinschnitz C. Regulatory T Cells in Post-stroke Immune Homeostasis. *Transl Stroke Res* 2016; 7: 313–321

Macrez R, Ali C, Toutirais O, Le Mauff B, Defer G, Dirnagl U, Vivien D. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 2011; 10: 471–480

Mader FM, Schwenke R. 2020. Schlaganfall, S3-Leitlinie. Verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/053-011I_S3_Schlaganfall_2021-03.pdf (Zugriffsdatum: 27.08.2020)

Malone K, Amu S, Moore AC, Waeber C. Immunomodulatory Therapeutic Strategies in Stroke. *Front Pharmacol* 2019; 10: 630

Manda-Handzlik A, Demkow U. The Brain Entangled: The Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to the Diseases of the Central Nervous System. *Cells* 2019; 8: 1477

Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Immunol.* 2018; 9: 288

Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, Simon D, Laimer D, Bangert C, Kammerlander A, Mascherbauer J, Winter M-P, Distelmaier K, Adlbrecht C, Preissner KT, Lang IM. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res* 2015; 116: 1182–1192

Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 2014; 123: 2768–2776

Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers. *Clin Chim Acta* 2016; 459: 89–93

Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann K-A. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 2003; 34: 2019–2024

Nimptsch U, Mansky T. Trends in acute inpatient stroke care in Germany--an observational study using administrative hospital data from 2005-2010. *Dtsch Arztebl Int.* 012; 109: 885–892

Novotny J, Oberdieck P, Titova A, Pelisek J, Chandraratne S, Nicol P, Hapfelmeier A, Joner M, Maegdefessel L, Poppert H, Pircher J, Massberg S, Friedrich B, Zimmer C, Schulz C, Boeckh-Behrens T. Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology* 2020; 94: e2346-e2360

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; 191: 677–691

Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urra X, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta neuropathol* 2015; 129: 239–257

Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B, Jauch EC, Kidwell CS, Leslie-Mazwi TM, Ovbiagele B, Scott PA, Sheth KN, Southerland AM, Summers DV, Tirschwell DL. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2018; 49: e46-e110

Pschyrembel. 2020. Schlaganfall. Verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Schlaganfall/K0PSS> (Zugriffsdatum: 24.08.2020)

Ringleb PA, Veltkamp R, Hamann GF, Röther J, Jansen O, Groden C. 2015. S2k-Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Rekanalisierende Therapie. Verfügbar unter https://www.dsg-info.de/images/stories/DSG/PDF/Leitlinien/030140_LL_akuter-ischaemischer-schlaganfall_final.pdf (Zugriffsdatum: 27.08.2020)

Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. *J Immunol Res* 2017; 2017: 5140679

Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 109–116

Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, Ntinopoulou M, Sertaridou E, Tsironidou V, Tsigalou C, Tektonidou M, Konstantinidis T, Papagoras C, Mitroulis I, Germanidis G, Lambris JD, Ritis K. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* 2020; 130: 6151–6157

Staessens S, François O, Desender L, Vanacker P, Dewaele T, Sciot R, Vanhoorelbeke K, Andersson T, Meyer SF de. Detailed histological analysis of a thrombectomy-resistant ischemic stroke thrombus: a case report. *Thromb J* 2021; 19: 11

Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: R122

Takashima N, Arima H, Kita Y, Fujii T, Miyamatsu N, Komori M, Sugimoto Y, Nagata S, Miura K, Nozaki K. Incidence, Management and Short-Term Outcome of Stroke in a General Population of 1.4 Million Japanese - Shiga Stroke Registry. *Circ J* 2017; 81: 1636–1646

Vaibhav K, Braun M, Alverson K, Khodadadi H, Kutiyawalla A, Ward A, Banerjee C, Sparks T, Malik A, Rashid MH, Khan MB, Waters MF, Hess DC, Arbab AS, Vender JR, Hoda N, Baban B, Dhandapani KM. Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Sci Adv* 2020; 6: eaax8847

Vallés J, Lago A, Santos MT, Latorre AM, Tembl JI, Salom JB, Nieves C, Moscardó A. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb Haemost* 2017; 117: 1919–1929

Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler M, Bruce AT, Kaplan MJ. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 187: 538–552

RESEARCH



Stroke-derived neutrophils demonstrate higher formation potential and impaired resolution of CD66b + driven neutrophil extracellular traps

Angeliki Datsi^{1†}, Laura Piotrowski^{2†}, Markella Markou³, Thomas Köster⁴, Isabelle Kohtz⁵, Kerstin Lang⁶, Sabine Plöttner⁶, Heiko Udo Käfferlein⁶, Burkhard Pleger⁷, Ramon Martinez⁸, Bogdan Pintea⁸, Roland Fried⁹, Marcus Müller¹⁰, Rene Chapot^{11†} and Konstantinos Gousias^{12,13,14**†}

Abstract

Background: Recent evidence suggests a merging role of immunothrombosis in the formation of arterial thrombosis. Our study aims to investigate its relevance in stroke patients.

Methods: We compared the peripheral immunological profile of stroke patients vs. healthy controls. Serum samples were functionally analyzed for their formation and clearance of Neutrophil-Extracellular-Traps. The composition of retrieved thrombi has been immunologically analyzed.

Results: Peripheral blood of stroke patients showed significantly elevated levels of DNase-I ($p < 0.001$), LDG ($p = 0.003$), CD4 ($p = 0.005$) as well as the pro-inflammatory cytokines IL-17 ($p < 0.001$), INF- γ ($p < 0.001$) and IL-22 ($p < 0.001$) compared to controls, reflecting a T_H1/T_H17 response. Increased counts of DNase-I in sera ($p = 0.045$) and Neutrophil-Extracellular-Traps in thrombi ($p = 0.032$) have been observed in patients with onset time of symptoms longer than 4,5 h. Lower values of CD66b in thrombi were independently associated with greater improvement of NIHSS after mechanical thrombectomy ($p = 0.045$). Stroke-derived neutrophils show higher potential for Neutrophil-Extracellular-Traps formation after stimulation and worse resolution under DNase-I treatment compared to neutrophils derived from healthy individuals.

Conclusions: Our data provide new insight in the role of activated neutrophils and Neutrophil-Extracellular-Traps in ischemic stroke. Future larger studies are warranted to further investigate the role of immunothrombosis in the cascades of stroke.

Trial registration: DRKS, DRKS00013278, Registered 15 November 2017, https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00013278

[†]Angeliki Datsi, Laura Piotrowski, Rene Chapot and Konstantinos Gousias contributed equally to this work.

*Correspondence: kostasgousias@yahoo.com

¹² Department of Neurosurgery, K LW St Paulus Corporation, St Marien Academic Hospital Lünen, Westfälische Wilhelms-University Münster, Altstadtstrasse 23, 44534 Lünen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: Stroke, Thrombus, Neutrophil-Extracellular-Traps, CD66b+ , Immunothrombosis

Background

Mechanical thrombectomy (MT) combined with intravenous thrombolysis (IVT) appears as the superior therapeutic choice for recanalization after large artery strokes [1]. However, despite impressive breakthrough achievements in endovascular retrieval procedures no similar advances have been noticed in the pharmacological therapy since its establishment in the '90s [2]. The use of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) demonstrates strong limitations [3, 4]; even if applied within the first hours of symptoms' onset only a small fraction of patients with large artery occlusions may benefit from arterial reperfusion [5]. The clinical failure of rtPA-IVT may rely on our limited knowledge about the underlying pathomechanisms of thrombogenesis. Analysis of the cellular thrombus composition as well as of potential circulating thrombogenic factors in serum of stroke patients may improve our understanding.

Recently, neuroinflammation has emerged as a novel key regulator of arterial thrombosis in stroke patients [6–14]. In the context of the so called immunothrombosis neutrophil markers, such as CD66b may be activated or neutrophil extracellular traps (NET) may be released, potentially contributing to the rtPA failure. Since NET comprise a network of extracellular chromatin fibers, they may form scaffolds which enclose platelets and subsequently activate the intrinsic coagulation cascades promoting thrombosis [6].

Naturally, the process of NET formation is an important regulator of innate immunity and mainly initiated upon contact with microbes by releasing antimicrobial traps composed of chromatin and neutrophil proteins from their nucleus or mitochondria. The formation of NETs can be initiated by ROS, the inflammasome or other triggers, leading to chromatin decondensation, associated with antimicrobial proteins. Upon ROS production the neutrophil elastase (NE) translocates to the nucleus, where it cleaves the histones. There it comes to chromatin decondensation, which is enhanced by the metalloprotease MPO [15–17]. Noteworthy, NETosis is an important player of immunothrombosis and potential therapeutic target also in Covid-19 [18].

Our study aims to analyze the role of immunothrombosis in generating large intracranial artery occlusions. For this scope we compared the immunological profile of stroke patients and controls. Additionally, we studied the composition of retrieved thrombi. Further in vitro stimulation of patients' and controls' neutrophils aimed to reveal their different thrombogenic potential.

Methods

Patients

We analyzed prospectively 48 (consecutive adult (>18 years) patients with acute ischemic stroke as a consequence of a large unilateral arterial occlusion, i.e. occlusion of intracranial arteria carotis interna (ACI), arteria cerebri media (ACM) or arteria basilaris/vertebralis, who underwent mechanical thrombectomy (MT) at the Neuroradiological Department of Alfried Krupp Hospital in Essen between February and May 2018. 16 age matched patients with low back pain treated at the Neurosurgical Departments of St Marien Academic Hospital of Luenen and of BG Bergmannsheil University Hospital of Bochum served as control group. Patients suffering from an active cancer disease under chemotherapy or from an active bacterial or viral infection, with a history of autoimmune disease or under immunomodulatory medication were excluded from our study. Patient charts were reviewed and all pertinent clinical data were entered into a computer-based database. Patients for whom critical parameters, such as onset time of stroke symptoms, could not be clearly determined were excluded. This left 35 stroke patients and 16 controls for the final analyses. The study was approved by the Ethic Committees of the Ruhr University of Bochum (ethics committee vote 17–6060) and of the Westfaelische Wilhelms University of Münster (ethics committee vote 2020–310-f-S) (German Clinical Trials Register-ID: DRKS00013278). All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all patients or legal representatives.

MT was performed as described previously [4]. The time of IVT and the conservative treatment in general were in line with the German guidelines for acute therapy of ischemic stroke-recanalization therapy [4, 5]. Peripheral blood was collected prior to MT and serum as well as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained upon density gradient centrifugation performed within 4 h after withdrawal (median time 2 h).

The demographic and clinical categorical variables studied were sex (m/f), National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission, after MT and at discharge, onset time of stroke symptoms (< 4.5 vs. ≥ 4.5 h), comorbidities, Charlson Comorbidity Index (CCI) in general (0 vs. 1–2 vs. >2) or each comorbidity in particular (yes/no, Table 1), location and site of arterial occlusion, history of older demarcated infarct (yes/no) or atrial fibrillation (AF) (yes/no), treatment modalities (MT vs.

Table 1 Study group demographics

Variable		stroke patients (n = 35)	controls (n = 16)	p value
Males		18 (51.4%)	7 (43.8%)	n.s.
Age median (median, range)		77 (70.9, 26–98)	76.5 (70.7, 31–99)	n.s.
Anticoagulation	yes	13 (37.1%)	6 (37.5%)	n.s.
Type of anticoagulation				n.s.
	ASS	7 (20.0%)	3 (18.8%)	
	Clopidogrel	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	ASS+Clopid	1 (2.8%)	0 (0.0%)	
	VKA	2 (5.6%)	1 (6.7%)	
	NOAC	3 (8.5%)	2 (12.5%)	
History of previous stroke	yes	6 (17.1%)	2 (12.5%)	n.s.
History of AF ^a	yes	7 (20.0%)	3 (18.8%)	n.s.
CCI ^b				n.s.
	0–1	18 (51.4%)	9 (60.0%)	
	2–3	15 (42.8%)	6 (37.5%)	
	>3	2 (5.7%)	1 (6.7%)	
Art.hypertension	yes	17 (48.5%)	10 (62.5%)	n.s.
Diabetes	yes	5 (14.2%)	3 (18.8%)	n.s.
Renal disease	yes	1 (2.8%)	1 (6.7%)	n.s.
Liver disease	yes	2 (5.7%)	2 (12.5%)	n.s.
Pulmonary disease	yes	4 (11.4%)	2 (12.5%)	n.s.
Myocardial infarct /heart failure	yes	8 (22.8%)	3 (18.8%)	n.s.
PVD ^c	yes	3 (8.5%)	1 (6.7%)	n.s.
Cancer ^d	yes	5 (14.2%)	2 (12.5%)	n.s.

^a AF Atrial fibrillation, ^bCCI Charlson Comorbidity Index, ^cPVD Peripheral vascular disease or bypass, ^d Non active cancer disease diagnosed at least 5 years before MT

MT and IVT), thrombolysis in cerebral infarction (TICI) score of recanalization, intake of novel oral anticoagulants, vitamin K antagonists, or antiplatelet drugs. Age and the expression values of our laboratory parameters were studied as continuous variables. In case of serum and PBMC, this included absolute counts of WBC, neutrophils, DNase-I, low-density granulocytes (LDG), CD4 cells as well as intracellular IL-17, IL-22 and INF- γ production by CD4 cells. Furthermore, we analyzed the relative frequencies and absolute counts of isolated neutrophils, in particular of CD66b cells. In case of thrombi, the expression of CD66b and presence of NETs was assessed.

The primary endpoint of our study was to investigate statistical differences for parameters of immunothrombosis, i.e. neutrophil markers, DNase-I and cytokines between stroke patients and healthy controls. After in vitro stimulation of patients' and controls' neutrophils we also aimed to reveal their different thrombogenic potential. A further clinical endpoint within the subgroup of stroke patients was short-term patients' functional outcome assessed as NIHSS at discharge (favorable outcome defined as NIHSS 0–4). In addition, we investigated whether our studied laboratory parameters in

serum, PBMC and thrombi were differentially expressed with distinct clinical characteristics or disparate applied therapy.

Neutrophil isolation

Approx. 20 mL peripheral blood were obtained from stroke patients and healthy controls in blood collection tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and PBMCs as well as neutrophils were isolated by density gradient centrifugation (lymphocyte separation medium; 1077 GE Healthcare). Serum was collected in reaction tubes, PBMCs in 50 mL centrifuge tubes. Neutrophils were obtained by lysing erythrocytes according to previously published methods [19]. Based on this method, activation of neutrophils is minor and prevented by the use of ion-free buffers. Serum samples were stored at -80°C until further use, whereas PBMCs were used directly for flow cytometric (FACS) analysis and purified neutrophils for FACS and cell culture experiments.

Flow cytometry

Frequencies of LDG and monocytes within PBMCs as well as the cell number and purity of neutrophils were

defined in single cell suspensions of 1×10^6 cells/mL. Surface staining for anti-human: CD15-APC (BioLegend), CD14-PE (BioLegend), CD16-APC-Cy7 (BioLegend) and CD66b-FITC (BioLegend) was performed for 15 min at 4°C. Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Viability dye (Zombie NIR, BioLegend) was used to determine dead cells.

Intracellular cytokine levels from CD4⁺ cells, were determined by stimulating PBMCs with 5 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) for 5 h upon addition of Brefeldin A (BioLegend). Stimulation was stopped and cells were fixed with 4% PFA, treated with 0.05% saponin (Sigma-Aldrich) and stained intracellularly with anti-human: CD4-BV650 (BioLegend), IFN- γ -PB (BioLegend), IL-17-PcP (BioLegend) and IL-22-PE-Cy7 (BioLegend) (all 1:100). Expression levels were determined via flow cytometry (BD FACS Canto II), obtained data analysed with FlowJo V10.1 and statistics calculated in GraphPad Prism 5.0.

Stimulation of NET formation *in vitro*

NET formation was investigated *in vitro* by plating purified neutrophils at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI Medium 1640 (Gibco, GE Healthcare) supplemented with 10 mM HEPES and 0.2% human serum albumin. Cells rested for 1 h at 37°C and 5% CO₂ in a poly-L-lysine (Sigma Aldrich) coated 24 well plate (Sarstedt GmbH). Afterwards neutrophils were treated with 100 mM PMA (positive control) or DMSO (negative control) for 3 h. Samples were subsequently either stained directly with 5 μ M Sytox Green (Life Technologies) for 10 min and fixed with 4% PFA or treated with recombinant DNase-I (Roche) for 30 min before fixation. NET formation was assessed with fluorescence microscopy (AxioImager.Z2; Carl Zeiss) using 10x (numerical aperture 0.3) Plan-Neofluar magnification objectives. Images were analyzed with ImageJ software (version 1.52a).

Quantification of NETosis with sytox green

Formation of NETs was quantified by plating 1×10^5 neutrophils in 100 μ L/well on a 96 flat-bottom well-plate in triplicates. Cells rested for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Afterwards neutrophils were stimulated with 100 mM PMA (positive control), DMSO (negative control) or the different patients' sera (50%) and incubated for 3 h. 5 μ M Sytox Green (Life Technologies) was added to each well and incubated for 10 min. Fluorescence intensity was measured directly at a wavelength of 485/583 nm with a TECAN Infinite M1000 Pro plate reader.

Determination of DNase-I

Quantification of DNase-I in sera of patients with ischemic stroke in comparison to the assessed controls was obtained by performing an ELISA for DNase-I (MBS285079; MyBioSource) according to the manufacturers protocol. Sera were diluted 1:3 during the density centrifugation gradient.

Cryostat sectioning

Retrieved thrombi of patients with ischemic stroke were directly embedded in Tissue Teck O.C.T. Compound (Sakura Finetek) and stored at -80°C until further processing. For cryostat sectioning samples were warmed up to -20°C and two to three sections of 9 μ m thickness were placed on each microscope slide. Up to 6 microscope slides were prepared and stored at -80°C until immunofluorescence staining was performed.

Immunofluorescence staining

Cryosamples were thawed, unspecific proteins were blocked with 5% Bovine Serum Albumin (BSA, Miltenyi Biotec) for 30 min, washed with PBS and stained with anti-human CD66b-PE antibody (BioLegend) and Sytox Green (Thermo Fisher Scientific) or DAPI (Thermo Fisher Scientific) and a rabbit-anti-human Cit-3H antibody (abcam) over night at 4°C. Cit-H3 expression was visualized with a secondary goat-anti-rabbit-FITC antibody. IgG-PE and IgG-FITC (BioLegend) staining served as negative controls. Slides were mounted with antifade mounting medium (vectashield). Samples were examined on an AxioImager.Z2 (Carl Zeiss). Images were analyzed with ImageJ software (version 1.52a).

Statistical analysis

The statistical analysis of our clinical and molecular data was performed using SPSS (version 26, IBM Deutschland, Ehningen, Germany) and GraphPad (Software Prism 5.0, San Diego, California, USA). Standard procedures were employed for univariate (Fisher exact test, Chi-square test, Shapiro-Wilk test, Kruskal-Wallis test, statistical significance was set to $p < 0.05$) and multivariate analyses (ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, binary logistic regression, backward Wald stepwise method) as indicated (binary variables: NIHSS 0–4 vs. > 4; NIHSS improvement after MT yes/no). Continuous variables were presented as mean \pm standard deviation (SD) or as median \pm (interquartile range [IQR]) in case of non-normal distribution and were compared using the ANOVA or Mann Whitney U test, respectively. Categorical variables were analyzed using the Chi-square test. Correlation between inflammatory parameters was

Table 2 NIHSS and location of arterial occlusion

NIHSS	at admission	at discharge
0–4	9 (25.7%)	17 (48.5%)
5–15	15 (42.9%)	6 (17.1%)
>16	11 (31.4%)	12 (34.2%)
Occlusion of		
MCA	22 (62.9%)	
ACI	7 (20%)	
Basil/Vertebr.	6 (17.1%)	

performed by Spearman Rho. All confidence intervals (CI) were assessed at 95.0%.

Results

Patient demographics

We reviewed 35 patients (18 males) with unilateral large artery occlusion. Median age was 77 years. In 14 patients (40.0%) the time of symptoms onset was longer than 4.5 h; wake up strokes have been noted in 6 patients (17.1%) (Table 1). 9 patients (25.7%) presented at admission with symptoms of minor (NIHSS 0–4), whereas 11 (31.4%) with symptoms of severe (NIHSS>16) stroke. (Table 2) 18 patients (51.4%) presented with a Charlson Comorbidity Index (CCI) of 0 or 1. A history of AF was known in 7 (20.0%) of our patients; in another 8 (22.8%) cases AF was first diagnosed during their hospitalization. 14 patients (40.0%) have been administered IVT prior to MT. Successful recanalization, i.e. TICI 2b, 2c or 3 has been achieved in all but 2 patients (94.3%). Our controls were comparable to our stroke patients in terms of all demographical and clinical parameters studied. The demographics of our stroke patients and controls are demonstrated in Tables 1 and 2.

Differences of immunological phenotype between stroke patients and controls

The comparison of the immunological values between stroke patients and healthy controls revealed statistically significant differences, i.e. stroke patients were more likely to express higher absolute counts of granulocytes ($p = 0.007$), DNase-I ($p < 0.001$), LDG ($p = 0.003$) as well as increased CD4 counts ($p = 0.005$) and the CD4 related pro-inflammatory cytokines IL-17 ($p < 0.001$), INF- γ ($p < 0.001$) and IL-22 ($p < 0.001$) (Table 3) (Figs. 1, and 2). Cell counts of CD66b neutrophils were comparable between our two study groups (supplementary Fig. 1). After adjusting for all studied clinical characteristics, such as age, sex, type of anticoagulation, history of previous stroke or atrial fibrillation, the multivariate analysis recognized no independent prognosticator of stroke.

Correlation of values of inflammatory parameters in serum and in thrombus

Higher relative proportions of CD66b in PBMC correlated with higher frequencies of NETs in thrombi of stroke patients ($r_s = 0.472$, $p = 0.013$). To this end, also the values of CD66b expressed in thrombi of stroke patients correlated with the counts of NETs in thrombi ($r_s = 0.564$, $p = 0.002$) (Fig. 2B).

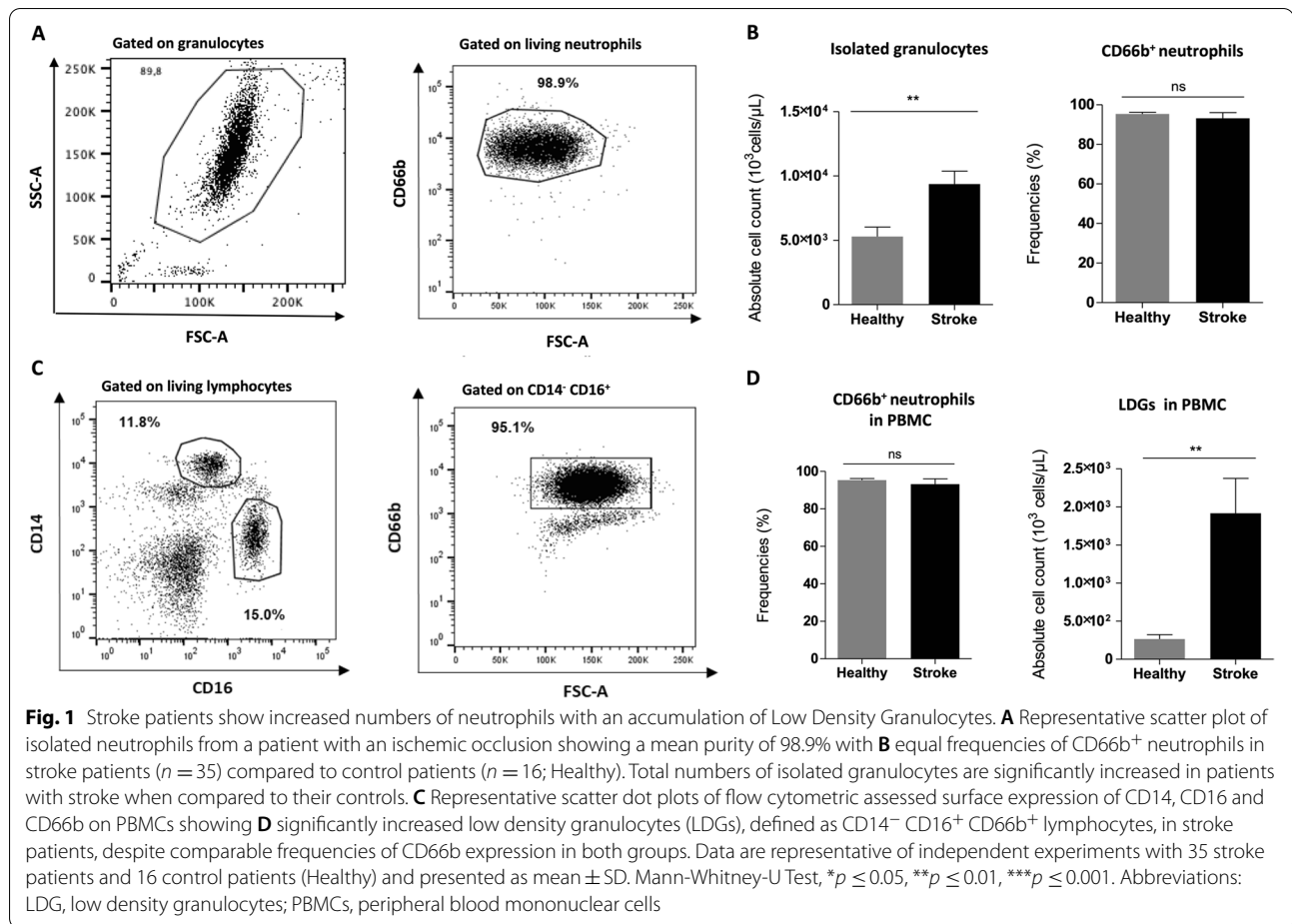
Association of clinical characteristics and immunological profile

Patients with onset time of symptoms longer than 4.5 h showed increased values of DNase-I ($U = 42$, $p = 0.045$) in sera as well as increased NET formation in thrombi ($U = 30$, $p = 0.032$). All studied comorbidities, intake of anticoagulants/antiplatelets, sex and age showed no influence upon values of immunothrombosis at admission.

Table 3 Immunological profile in blood and PBMC of stroke patients and controls

	Stroke patients ($n = 35$) Median (IQR) ^b	Controls ($n = 16$) Median (IQR)	U^a , p value
granulocytes $10^3/\mu\text{L}$	9.23 (5.88–20.73)	5.22 (3.97–7.33)	128 , 0.007
CD66b + neutrophils $10^3/\mu\text{L}$	2.44 (21.75–30.25)	2.03 (10.67–28.80)	n.s
DNase-I U/L	17.03 (13.91–20.72)	12.24 (10.59–13.20)	24.5 , <0.001
IL-17-producing CD4 ⁺ cells/ μL	64.9 (26.6–397.0)	3.18 (2.40–13.70)	17 , <0.001
IL-22-producing CD4 ⁺ cells/ μL	265.1 (132.1–775.1)	6.10 (3.81–9.53)	25.5 , <0.001
INF- γ -producing CD4 ⁺ cells/ μL	632 (172.75–1242,62)	54.24 (30.88–98.30)	55 , <0.001
CD4 cells/ μL	2467 (841–4678)	712 (420–991)	94 , 0.005
LDG $10^3/\mu\text{L}$	1.93 (0.40–6.84)	0.24 (0.14–0.72)	116 , 0.003

^a Mann Whitney test U , ^b non normal distribution



Association of immunological profile and NIHSS

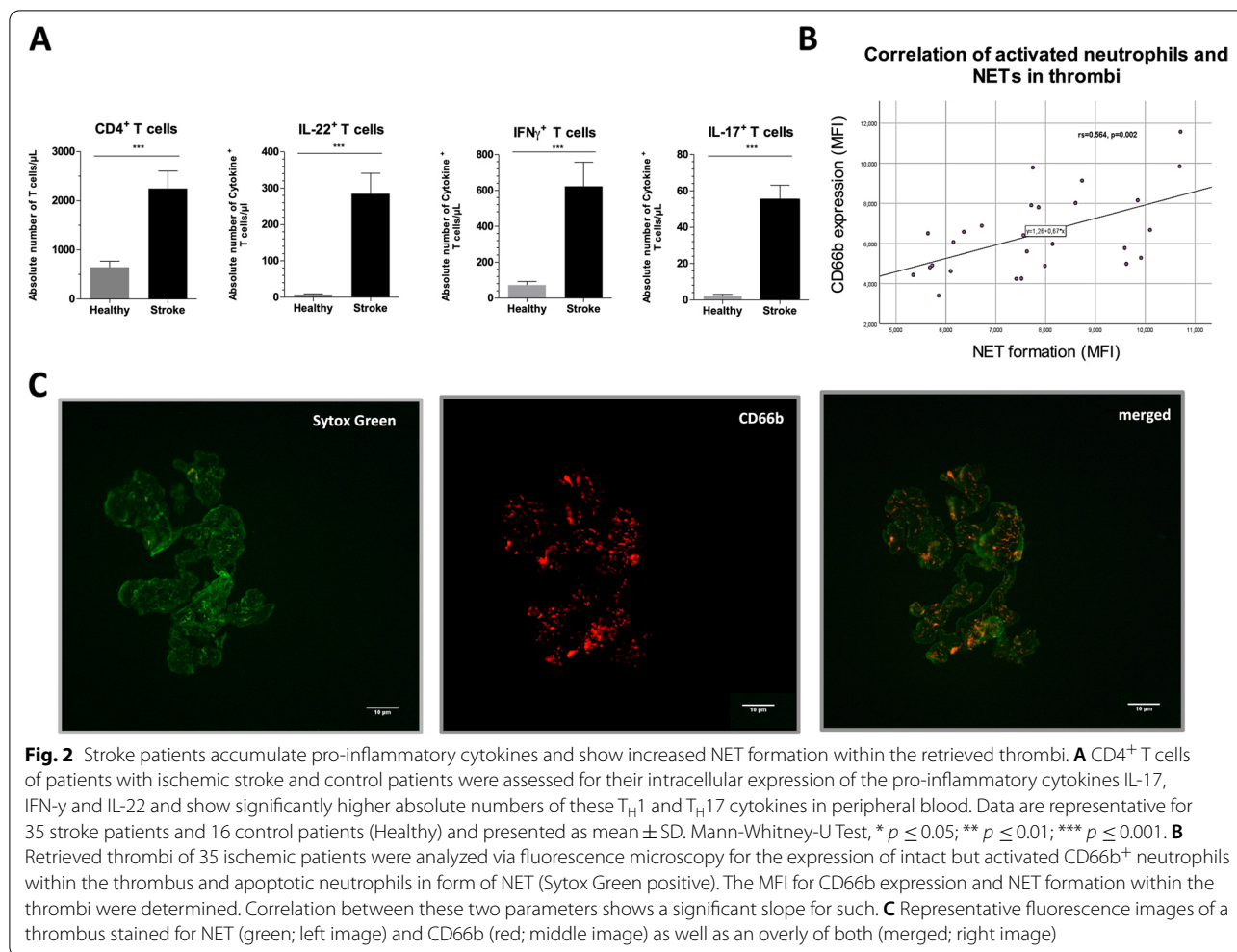
Patients with NIHSS <5 at admission showed significant lower counts of neutrophils than stroke patients with higher NIHSS ($p = 0.046$). Lower values of IL-22 ($p = 0.012$) and monocytes ($p = 0.039$) in peripheral blood were observed in patients with improvement of NIHSS after MT. In addition, patients with lower CD66b in thrombi were more likely to benefit from the MT, as they showed a significant reduction of NIHSS post-intervention ($p = 0.038$). After adjustment for potential confounders, i.e. for sex, age, type of therapy (MT alone vs. MT with IVT) as well as for clinical (such as CCI, intake of anticoagulants/antiplatelets) and immunological (those with $p < 0.05$ in the univariate analysis) parameters, lower values of CD66b in thrombi were independently associated with greater improvement of NIHSS after MT (HR = 0.478 (0.232–0.985), $p = 0.045$ (logistic regression, backward Wald stepwise method).

A similar multivariate analysis (logistic regression, backward Wald stepwise) on potential prognostic factors for a more favorable short-term outcome, defined as

NIHSS <5 at discharge, failed to recognize independent prognosticators.

NET formation potential and thrombus composition

Neutrophils from patients with an ischemic occlusion as well as control patients could be isolated with a mean purity of 98.9%. Neutrophils from stroke patients showed significantly higher NET formation determined via MFI in comparison to control patients (Fig. 3A,B). The stimulation of neutrophils with PMA successfully induced neutrophil elastase (NE) activity, therefore a true NETosis (Fig. 3D). Further, sera obtained from ischemic stroke patients demonstrated a significantly higher potential to induce NET in untreated neutrophils despite significantly higher levels of DNase-I and worse clearance of already formed NET (Fig. 3C,E). The retrieved thrombi of the same patients showed an infiltration of CD66b⁺ neutrophils, which indicates the presence of still intact but activated cells about to promote NETosis. Further, NETosis is accompanied with Cit-H3 expression, which reflects a true NETosis process rather than just necrotic cells (supplementary Fig. 2A,B). However, within the same



thrombi these neutrophils also presented a clear formation of NET mostly at the borders of the thrombus, but also initiating from the neutrophil-accumulations and the center of the thrombus.

Association of IVT and immunological profile

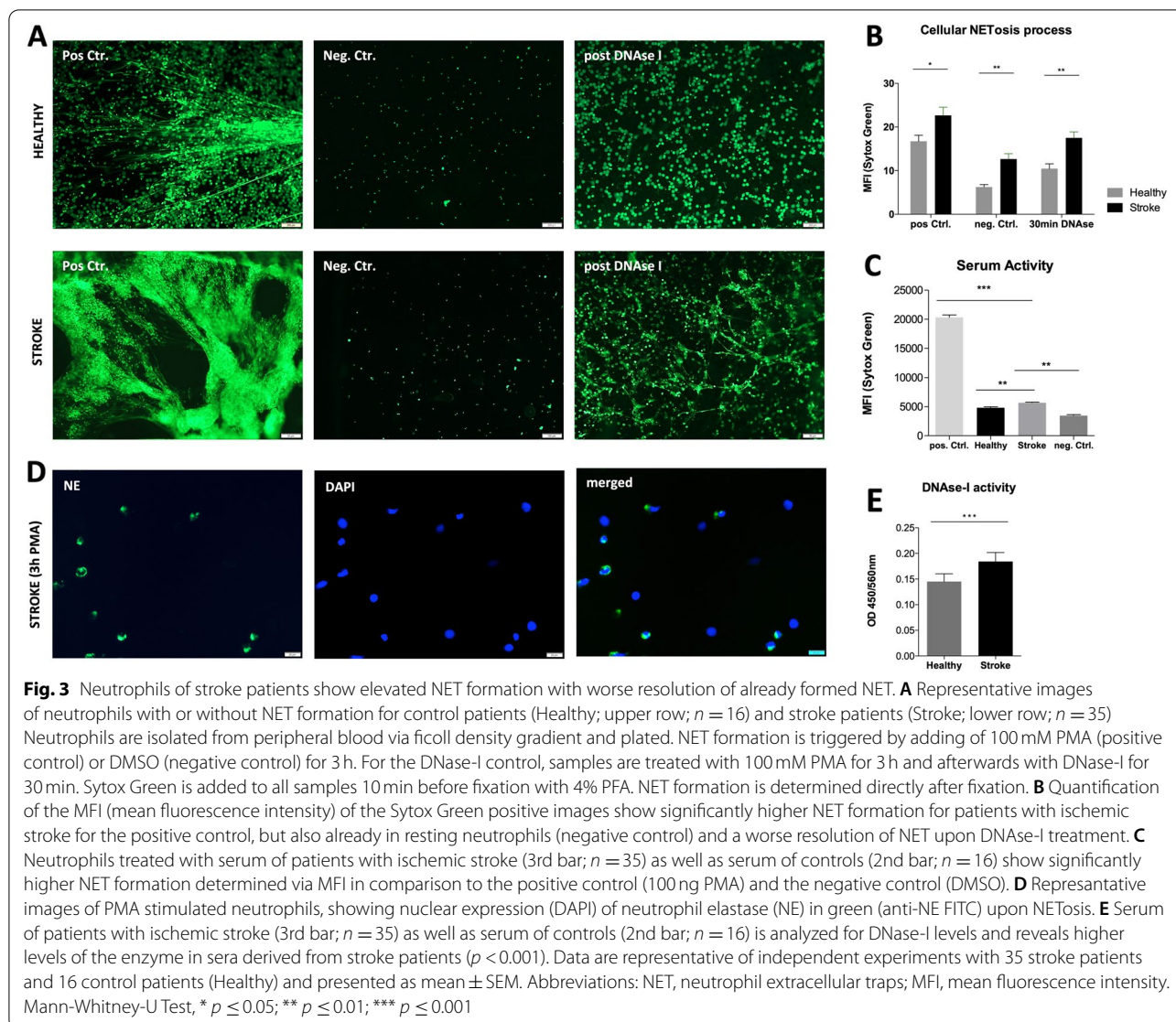
Stroke patients applied MT and IVT vs. MT alone showed a trend for lower values of NET in thrombi ($p = 0.078$) as well as higher counts of DNase-I in serum ($p = 0.004$). After a subgroup comparison of either 21 stroke patients administered IVT vs. 16 controls or 14 stroke patients without IVT vs. 16 controls the above documented differences (please see 'Differences of immunological phenotype between stroke patients and controls') remained still significant.

Discussion

A potential involvement of neuroinflammation in stroke has long been conceived. Increased WBC counts after stroke have been a common notion [20]; moreover,

leukocyte counts were reported to be inverse associated with the clinical outcome in acute ischemic stroke patients [21]. Apart from the abnormalities of the obviously main player of the immunological response, i.e. leukocytes [22], further systemic changes in specific inflammatory parameters, such as cytokines and chemokines have been reported [23–26]. Brain ischemia, cellular death and oxidative stress after ischemic stroke are believed to initiate an intense inflammatory response resulting in a transient immunosuppression [26–29].

However, it is a legitimate question whether the observed neuroinflammation reflects only the response to an established stroke or may also contribute to its genesis, i.e. whether neuroinflammation is also the cause and not only the consequence of stroke [8–10]? Novel insights point towards a pivotal role of inflammation, in particular of NET, in generating venous and arterial thrombosis [30, 31]. Dyer et al. reported that NET formation is a primary regulator of deep vein thrombosis in mice [32]. Release of NET has been evolved also in the



genesis of arterial thrombosis of both coronary as well as intracranial arteries [6, 8, 9, 11–13, 33]. Genchi et al. found increased content of NET in cerebral thrombi of cardioembolic etiology [34]. Klopff et al. support that the cascade of NETosis in stroke may be triggered by alterations of granulopoiesis and subsequently induction of immature LDG, which then undergo spontaneous NET formation [35].

This new knowledge may expand our understanding concerning thrombogenesis in stroke patients. The so called TOAST classification categorizes potential sources of thrombosis; apart from the cardioembolic and atherosclerotic causes, a wide variety of stroke cases remains debatable [36]. According to the clinical experience 25–39% of strokes remain without certain cause

[37]. The lack of comprehensive understanding of stroke pathophysiology is being reflected by the insufficient pharmacological therapy, to date. In cases with large artery strokes less than half of the patients respond to IVT. The identification of immunothrombosis as possible cause of stroke and the encryption of the mechanisms of immune related thrombogenesis may allow a more targeted stroke therapy. Mangold et al. showed a positive association of coronary NET burden with myocardial infarct size and an accelerated lysis of coronary thrombi *ex vivo* after addition of DNase-I [33]. Laridan et al. as well as Ducroux et al. detected NET in ischemic stroke thrombi and reported a more powerful thrombolysis *ex vivo* after combined rtPA and DNase-I administration than rtPA alone [9, 38]. Thus, above studies identify NET

as potential pharmacological target in order to optimize the IVT efficiency.

Our study though aimed to analyze the role of NET, i.e. the efficacy of DNase-I on NET clearance and the pathogenesis of NET release from another aspect. Since NET formation in thrombi reflects a systemic alteration of the immune system, the formation and the degradation of NETs in stroke patients may be abnormal also in the periphery. To this end, we compared the potential of neutrophils of stroke patients vs. healthy controls to promote NET formation and clearance of already formed NET after DNase-I application *in vitro* and found prominent differences. Neutrophils of stroke patients showed indeed a higher formation of NET and a worse resolution upon DNase-I treatment when NETs were already formed compared to neutrophils derived by healthy individuals (Fig. 3). This observation may support the hypothesis that neutrophil dysfunctions may be apparent before the event of stroke and NET formation may contribute to the initial thrombogenic event of a stroke rather than just being released as part of the immune response. Under this aspect, NET may be identified as potential therapeutic target not only during the IVT but more importantly, in terms of prophylaxis. The latter should preferentially aim towards selective targets, like PAD4, which reflects an essential factor for NET formation and not towards general immune pathways, since immunosuppressive drugs may increase the risk of bacterial or viral infections. Even in such cases, patients under PAD4 blockade medication should be carefully selected and closely monitored.

Further indices for a potential involvement of NET in the genesis of ischemic stroke thrombi is given by the fact that in our series patients with longer onset time of symptoms showed higher values of NET in their thrombi but also higher values of DNase-I in their sera, a known degrading enzyme of NET [9, 39, 40], probably as an intrinsic systemic lytic reaction against formation of thrombus. Noteworthy, the values of DNase-I in the sera seem not to be constant but highly dependent on the state of the current immune response. In our series patients with already formed NET showed higher values of DNase-I in the acute phase of stroke. However, Kim et al. studied chronic hemodialysis patients and found no correlation between values of NET and DNase-I in their serum, whereas Vaibhav et al. reported reduced DNase-I activity in patients after traumatic brain injury [41, 42].

As shown before, parameters of neuroinflammation are abnormally expressed in patients with stroke [23, 25, 43, 44]. We conducted a case - control study, to investigate for differences of their immunological profile between stroke and control patients admitted at hospitals for degenerative spinal pathologies. Our study revealed

significant differences, i.e. higher absolute counts of neutrophils, LDGs, as well as IL-22, IL-17 and IFN- γ producing CD4⁺ T cells favoring a T_H1/T_H17 response and pro-inflammatory environment. Such high levels of cytokines and other yet unidentified molecules can affect neutrophil development in the bone marrow and contribute to a quick mobilization of neutrophils thereby generating rather LDG than normal density granulocytes (NDG), going in line with our results showing increased LDG levels in stroke patients (Fig. 1). LDG have already been described with an enhanced capacity to form spontaneous NETs [45]. Systemic and local secretion of pro-inflammatory cytokines has been reported earlier [46, 47]. Our results confirm previous reports of increased values of pro-inflammatory cytokines in the acute phase of ischemic stroke.

After performing Spearman rho statistics to conclude for correlations between the immune values in blood and thrombi of the assessed patients we observed a significant correlation of CD66b in both, blood and thrombi with counts of NETs in thrombi. As CD66b constitutes a surface marker for neutrophil activation, we speculate that immunothrombosis may be promoted by an increased NETosis and subsequent formation of thrombi by abnormally activated neutrophils. Under normal circumstances, neutrophils patrol throughout their short lifespan through the arteries without adhering to the vascular endothelium to migrate towards tissues. However, certain neutrophil surface markers, such as CD66b, can influence the adhesion of these cells to the endothelium and activate them leading to subsequent apoptotic NET formation [48, 49].

The associations found between parameters of immunothrombosis and the response of patients to therapy are of great interest. Novotny et al. analyzed 71 thrombi retrieved from patients with acute ischemic stroke and found poor outcome scores in patients with abundant amounts of NET [50]. Ilie et al. reported a prognostic value of CD66b, since infiltrating CD66b neutrophils in solid tumors [51] showed inverse association with patients' outcome. In principle, higher CD66b or NET values may represent a malign stroke parameter, as increased levels may contribute to greater thrombus formation and may be related to worse outcome. To this end, we documented a clear positive correlation of CD66b and NET values in our studied thrombi. Of note, in our series patients with lower values of CD66b in thrombi and in peripheral blood are more possible to experience a significant reduction of NIHSS, thus a better neurological outcome, after MT. This observation is in line with the hypothesis supported before that firmer thrombus composition, in particular NET dominant thrombi may show higher resistance to mechanical removal [52, 53].

We have to acknowledge that our study is subject to several limitations, such as the sample size, which does not allow far reaching conclusions concerning the alterations of the immunity in stroke patients. In addition, our study does not provide information about long term patients' outcome. However, our project shows several strengths, such as its prospective design and the balanced case-control study. Further, we analyzed not only the expression, but also the function of specific parameters of immunothrombosis in peripheral blood and thrombi.

Conclusions

This study provides new insights into the role of activated neutrophils, LDG and NET formation in ischemic stroke. The observed impairments of the immune system may be apparent also prior to an event of stroke and predispose to the thrombogenic occlusion of large intracranial arteries. Thus, NET and CD66b may be identified as potential pharmacological targets in the therapy of stroke. Nevertheless, larger prospective studies are required to decipher the role of immunothrombosis in the genesis of stroke.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12883-022-02707-0>.

Additional file 1.

Additional file 2.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the patients who agreed to participate in this research study. AD received personal grants in form of laboratory materials from the HMC and contributed parts of it to the realization of this study. High gratitude also to the medical staff of the neuroradiology of the Alfred Krupp Hospital, Essen-Rüttenscheid for the logistical effort during the recruitment process and sample preparation. The results of the project form the doctoral thesis (University of Bonn) of LP.

Authors' contributions

AD, RC and KG designed and conceptualized the study; AD, LP, MM, TK, IK, BP and KG acquired data; AD, LP, MM, TK, IK, BP, RF, RC and KG analyzed data; RF conducted the statistical analysis, AD and KG drafted the manuscript for intellectual content; AD, LP, MM, TK, IK, KL, SP, HUK, BP, RM, BP, RF, MM, RC and KG revised the manuscript for intellectual content. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The research was supported by personal sponsoring of AD by the Hamad Medical Corporation; Doha, Qatar and by personal sponsoring of RC. AD served as international collaborator of the Hamad Medical Corporation and received research support in terms of laboratory material. LP, MM, TK, IK, KL, SP, HUK, BP, RM, BP, RF, MM, RC and KG report no disclosures.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Ethic Committees of the Ruhr University of Bochum (ethics committee vote 17–6060) and of the Westfälische Wilhelms University of Münster (ethics committee vote 2020–310-f-S) (German Clinical Trials Register-ID: DRKS00013278). All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all patients or legal representatives.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. ²Medical School, Rheinische Friedrich-Wilhelms University of Bonn, Sigmund Freud Strasse 25, 53121 Bonn, Germany. ³Department of Neurology and Psychotraumatology, BG Klinikum Duisburg, Großenbaumer Allee 250, 47249 Duisburg, Germany. ⁴Department for Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Bonn Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany. ⁵Ruhr University Bochum, Universitätsstraße 150, Bergmannsheil Bochum, 44801 Bochum, Germany. ⁶Institute for Prevention and Occupational Medicine (IPA) Ruhr University Bochum (IPA), Bochum, Germany. ⁷Department of Neurology, University Hospital Bergmannsheil Bochum, Bürkle-de-la Camp Platz 1, 44079 Bochum, Germany. ⁸Department of BG Neurosurgery and Spinal Surgery, University Hospital Bergmannsheil Bochum, Bürkle-de-la Camp Platz 1, 44079 Bochum, Germany. ⁹Statistics in the Biosciences, TU Dortmund University, Vogelpothsweg 87, 44221 Dortmund, Germany. ¹⁰Department of Neurology, St Marien Academic Hospital Hamm, St Paulus Corporation, Knappenstrasse 19, 59071 Hamm, Germany. ¹¹Department of Radiology and Neuroradiology, Alfried-Krupp-Hospital Rüttenscheid, 45131 Essen, Germany. ¹²Department of Neurosurgery, KLV St Paulus Corporation, St Marien Academic Hospital Lünen, Westfälische Wilhelms-University Münster, Altstadtstrasse 23, 44534 Lünen, Germany. ¹³Medical School, University of Münster, Domagkstrasse 3, 48149 Münster, Germany. ¹⁴Medical School, University of Nicosia, Iliia Papakriakou 21, 2414 Nicosia, Cyprus.

Received: 22 October 2021 Accepted: 4 May 2022

Published online: 20 May 2022

References

- Bracard S, Ducrocq X, Mas JL, Soudant M, Oppenheim C, Moulin T, et al. Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(11):1138–47.
- Munich SA, Vakharia K, Levy EI. Overview of Mechanical Thrombectomy Techniques. *Neurosurgery*. 2019;85(suppl_1):S60–S7.
- Roth JM. Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2011;24(3):257–9.
- Weber R, Nordmeyer H, Hadisurya J, Heddier M, Stauder M, Stracke P, et al. Comparison of outcome and interventional complication rate in patients with acute stroke treated with mechanical thrombectomy with and without bridging thrombolysis. *J Neurointerv Surg*. 2017;9(3):229–33.
- Seners P, Turc G, Maier B, Mas JL, Oppenheim C, Baron JC. Incidence and Predictors of Early Recanalization After Intravenous Thrombolysis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2016;47(9):2409–12.
- Perez-de-Puig I, Miro-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, et al. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol*. 2015;129(2):239–57.
- Bagoly Z, Szegedi I, Kalmadi R, Toth NK, Csiba L. Markers of coagulation and fibrinolysis predicting the outcome of acute ischemic stroke thrombolysis treatment: a review of the literature. *Front Neurol*. 2019;10:513.

8. Manda-Handzlik A, Demkow U. The brain entangled: the contribution of neutrophil extracellular traps to the diseases of the central nervous system. *Cells*. 2019;8(12):1477.
9. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil extracellular traps in arterial and venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45(1):86–93.
10. Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(6):888–901.
11. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The emerging role of nets in venous thrombosis and immunothrombosis. *Front Immunol*. 2016;7:236.
12. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819–35.
13. Thalini C, Demers M, Blomgren B, Wong SL, von Arbin M, von Heijne A, et al. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb Res*. 2016;139:56–64.
14. Thalini C, Hisada Y, Lundstrom S, Mackman N, Wallen H. Neutrophil extracellular traps: villains and targets in arterial, venous, and cancer-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1724–38.
15. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134–47.
16. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(8):467–75.
17. Doring Y, Libby P, Soehnlein O. Neutrophil extracellular traps participate in cardiovascular diseases: recent experimental and clinical insights. *Circ Res*. 2020;126(9):1228–41.
18. Yang J, Wu Z, Long Q, Huang J, Hong T, Liu W, et al. Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap, von Willebrand Factor, and ADAMTS13. *Front Immunol*. 2020;11:610696.
19. Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*. 2008;17:745.
20. Christensen H, Boysen G. C-reactive protein and white blood cell count increases in the first 24 hours after acute stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18(3):214–9.
21. You S, Ou Z, Zhang W, Zheng D, Zhong C, Dong X, et al. Combined utility of white blood cell count and blood glucose for predicting in-hospital outcomes in acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):37.
22. Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells. *NeuroMolecular Med*. 2005;7(3):229–42.
23. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Inflammatory and immunomodulatory changes in acute cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(Suppl 1):48–64.
24. Aroca R, Chamorro C, Vega A, Ventura I, Gomez E, Perez-Cano R, et al. Immunotherapy reduces allergen-mediated CD66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients. *PLoS One*. 2014;9(4):e94558.
25. Chamorro A, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(7):401–10.
26. Liesz A, Kleinschnitz C. Regulatory T Cells in post-stroke immune homeostasis. *Transl Stroke Res*. 2016;7(4):313–21.
27. Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A. Thrombosis, neuroinflammation, and poststroke infection: the multifaceted role of neutrophils in stroke. *J Immunol Res*. 2017;2017:5140679.
28. Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;26:26–32.
29. Gu L, Jian Z, Stary C, Xiong X. T Cells and cerebral ischemic stroke. *Neurochem Res*. 2015;40(9):1786–91.
30. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768–76.
31. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880–5.
32. Dyer MR, Chen Q, Haldeman S, Yazdani H, Hoffman R, Loughran P, et al. Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA. *Sci Rep*. 2018;8(1):2068.
33. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer M, Jakowitsch J, Panzenbock A, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res*. 2015;116(7):1182–92.
34. Genchi A, Semerano A, Gullotta GS, Strambo D, Schwarz G, Bergamaschi A, et al. Cerebral thrombi of cardioembolic etiology have an increased content of neutrophil extracellular traps. *J Neurol Sci*. 2021;423:117355.
35. Klopff J, Brostjan C, Eilenberg W, Neumayer C. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):559.
36. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35–41.
37. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(5):493–501.
38. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, Delbosc S, Boisseau W, Deschildre C, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute ischemic stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754–7.
39. Zhou P, Li T, Jin J, Liu Y, Li B, Sun Q, et al. Interactions between neutrophil extracellular traps and activated platelets enhance procoagulant activity in acute stroke patients with ICA occlusion. *EBioMedicine*. 2020;53:102671.
40. Pena-Martinez C, Duran-Laforet V, Garcia-Culebras A, Ostos F, Hernandez-Jimenez M, Bravo-Ferrer I, et al. Pharmacological modulation of neutrophil extracellular traps reverses thrombotic stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) resistance. *Stroke*. 2019;50(11):3228–37.
41. Kim JK, Lee HW, Joo N, Lee HS, Song YR, Kim HJ, et al. Prognostic role of circulating neutrophil extracellular traps levels for long-term mortality in new end-stage renal disease patients. *Clin Immunol*. 2020;210:108263.
42. Vaibhav K, Braun M, Alverson K, Khodadadi H, Kutianawalla A, Ward A, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Sci Adv*. 2020;6(22):eaax8847.
43. Furlan JC, Vergouwen MD, Fang J, Silver FL. White blood cell count is an independent predictor of outcomes after acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol*. 2014;21(2):215–22.
44. Brea D, Agulla J, Rodriguez-Yanez M, Barral D, Ramos-Cabrer P, Campos F, et al. Regulatory T cells modulate inflammation and reduce infarct volume in experimental brain ischaemia. *J Cell Mol Med*. 2014;18(8):1571–9.
45. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):455–63.
46. Georgakis MK, Gill D, Rannikmae K, Traylor M, Anderson CD, Lee JM, et al. Genetically determined levels of circulating cytokines and risk of stroke. *Circulation*. 2019;139(2):256–68.
47. Malone K, Amu S, Moore AC, Waeber C. Immunomodulatory therapeutic strategies in stroke. *Front Pharmacol*. 2019;10:630.
48. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2011;187(1):538–52.
49. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Mauteri N. The neutrophil's choice: phagocytose vs make neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*. 2018;9:288.
50. Novotny J, Oberdieck P, Titova A, Pelisek J, Chandraratne S, Nicol P, et al. Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology*. 2020;94(22):e2346–e60.
51. Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coelle C, Mouroux J, et al. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2012;118(6):1726–37.
52. Jolugbo P, Ariens RAS. Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2021;52(3):1131–42.
53. Staessens S, Francois O, Desender L, Vanacker P, Dewaele T, Sciort R, et al. Detailed histological analysis of a thrombectomy-resistant ischemic stroke thrombus: a case report. *Thromb J*. 2021;19(1):11.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Dr. med. Konstantinos Gousias bedanken, der mich als Doktorandin angenommen hat und mir die Chance gab, dieses wunderbare Projekt durchzuführen. Ich möchte mich auch für die wertvolle Kritik und seine ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Mein großer Dank gilt ebenso meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Angeliki Datsi, die mir die Grundlagenforschung im Labor beigebracht hat und Tag und Nacht mit Rat, Expertise und ihrer wundervollen Art zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für die Geduld bedanken, die sie während dieser intensiven Zeit voller Höhen und Tiefen mit mir hatten. Danke für eure motivierenden und unterstützenden Worte.