

## Studienprotokoll NET-STROKE

### Neutrophil Extracellular Traps in Stroke (NET-STROKE): NET-Biomarker beim Schlaganfall

Version: 1.1, Datum: 13.11.2022

Autoren: PD Dr. med. Hauke Schneider, PD Dr. med. Jens Witsch

#### Zusammenfassung:

Ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle resultieren häufig in alltagsrelevanter bleibender Behinderung. Beim ischämischen Schlaganfall stehen zur Akutbehandlung rekanalisierende Therapieverfahren zur Verfügung (systemische Lysetherapie, endovaskuläre Therapie), für die Behandlung intrazerebraler Blutungen fehlen bislang effektive kausalerorientierte Therapieverfahren. Sekundäre molekulare und zelluläre Schädigungsmechanismen beeinflussen den klinischen Verlauf und das Behandlungsergebnis von Schlaganfall-Patienten. Hierzu gehören die Störung der Blut-Hirn-Schranke und inflammatorische Prozesse, die in der subakuten Phase zur Ödementwicklung sowie zu sekundärer funktioneller und struktureller Hirngewebschädigung beitragen können. Klinisch können diese Mechanismen innerhalb weniger Tage nach Akutereignis zu vital bedrohlichen intrakraniellen Volumeneffekten führen (raumfordernder Hirninfarkt, perifokales Ödem).

Unklar ist hierbei die Rolle von neutrophilen Immunzellen, die nach zellulärer Schädigung oder Aktivierung die Bildung von extrazellulären, Chromatin-basierten Netzwerk-Strukturen induzieren können (neutrophil extracellular traps, NETs). NETs sind als Teil des Immunsystems an der Infektabwehr beteiligt, wurden jedoch bei anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen als relevant identifiziert, u.a. bei der arteriellen und venösen Thrombusbildung. Eine überschießende NET-Aktivierung kann mechanistisch zu verstärkter Inflammation und Gewebeschädigung führen und stellt damit einen möglichen therapeutischen Ansatz dar.

Ziel der NET-STROKE-Studie ist es, die Bedeutung von NETs bei Patienten mit akutem Schlaganfall zu untersuchen. Hierzu sollen in einer monozentrischen Studie prospektiv klinische Daten und bildgebende Parameter erfasst werden sowie sequentiell NET-Marker quantifiziert werden. Es soll untersucht werden, ob NET-Marker im Plasma/Serum nachweisbar sind und ob NETs als mögliche Schlaganfall-Biomarker mit klinischen und bildgebenden Parametern (Infarkt-/Blutungsvolumen, perifokales Ödem) sowie dem klinischen Behandlungsergebnis korrelieren. Eine weitere Fragestellung ist, ob spezifische NET-Profile bei Schlaganfall-Patienten und bei Subgruppen nachweisbar sind. Die NET-STROKE-Studie kann dazu beitragen, die funktionelle Rolle von NETs bei ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen zu charakterisieren und hierauf basierend neue Ansätze zur Behandlung sekundärer Gewebeschädigung zu entwickeln, die bislang nicht zu Verfügung stehen. In prä-klinischen Studien wurden bereits therapeutische Ansätze für NET-induzierte Pathomechanismen untersucht.

#### Abstract:

Ischemic and hemorrhagic stroke often results in death or severe disability. Intravenous thrombolysis and endovascular thrombectomy are effective treatment options in patients with acute ischemic stroke; however, similarly effective therapies are not available for hemorrhagic stroke. Secondary

molecular and cellular mechanisms contribute to the clinical course and functional outcome of stroke patients, including impaired function of the blood-brain-barrier and inflammatory processes. These processes contribute to the development of brain tissue edema and secondary brain tissue damage, which may result in clinically relevant life-threatening intracranial mass effects (space-occupying infarction, perifocal edema) within the first days after stroke onset.

The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in stroke is largely unknown. NETs are bundles of extracellular neutrophilic DNA decorated with neutrophilic proteins induced by activated neutrophils. In its physiologic role, these NETs trap and kill bacteria, and thereby have beneficial function as a defense mechanism against pathogens; beyond that, they play a role in pathologic processes, e.g., in arterial and venous thrombosis. NETs are a prime candidate mechanism to potentially explain the link between neutrophilic inflammation with its known detrimental effect in the early phase following acute stroke. NET regulation therefore may be a potential target in stroke patients, especially to prevent secondary brain damage.

The NET-STROKE study aims to characterize the role of NETs and their potential to serve as biomarkers in stroke patients. NET-STROKE is a single-center, prospective cohort study evaluating clinical, neuroimaging and blood NET-parameters in patients with ischemic and hemorrhagic stroke. We aim to identify if NETs correlate with clinical and imaging parameters (presence and volumes of infarction / hematoma / perifocal edema volume) and with functional outcome of stroke patients. Furthermore, we aim to identify specific profiles of NET-markers in stroke and in subgroups of patients, e.g., in those with hemorrhagic stroke. The NET-STROKE study is expected to contribute to characterize the mechanistic role of NETs in stroke. Given several potential NET treatments demonstrated in preclinical studies, NETs may serve as potential treatment targets in stroke patients to prevent secondary brain injury and functional impairment.

## **Hintergrund:**

Hirnfarkte sind eine der häufigsten Ursachen für akute zerebrale Funktionsstörungen. Persistierende funktionelle Beeinträchtigungen nach einem Schlaganfall sind für Betroffene und Angehörige gravierend und verursachen hohe Aufwendungen in den Gesundheitssystemen. Die Relevanz von Schlaganfall-Erkrankungen wird in den kommenden Jahrzehnten in Folge der epidemiologischen und sozioökonomischen Entwicklungen zunehmen. Es werden ischämische (ca. 85%) und hämorrhagische (ca. 15%) Schlaganfälle unterschieden, deren Inzidenz regional variiert.<sup>1</sup>

Die Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalles erfolgt evidenzbasiert mittels intravenöser (systemischer) Lysetherapie mit rekombinantem Plasminogenaktivator (rtPA) bzw. Tenecteplase (TNK) sowie bei Nachweis eines proximalen zerebralen Gefäßverschlusses endovaskulär mittels mechanischer Thrombektomie. Zunehmend finden bei der Selektion für rekanalisierende Verfahren bildgebende Kriterien Anwendung. Schlaganfall-Patienten werden in Deutschland in der Regel auf spezialisierten Schlaganfall-Stationen (Stroke Unit) und, falls erforderlich intensivstationär, behandelt; zudem haben sich telemedizinische Konzepte in der Akutversorgung bewährt. Häufigste Ursachen sind ein Vorhofflimmern, eine arterielle Embolie bei Makroangiopathie der hirnversorgenden Gefäße oder eine Mikroangiopathie<sup>2,3</sup>

Hämorrhagische Schlaganfälle sind meist hypertensiv bedingt, treten jedoch u.a. auch in Folge einer zerebralen Amyloidangiopathie oder bei intrakranieller Gefäßmalformationen auf. Bei hypertensiv bedingten Blutungen wird eine Blutdrucksenkung empfohlen, um einen Blutungsprogress zu vermeiden. Evidenzbasierte, kausallorientierte Therapieverfahren stehen bisher nicht zur Verfügung. Bei vital bedrohlichen intrazerebralen Blutungen können operative Therapien eingesetzt werden, viel

versprechend sind hier mikrochirurgische Verfahren. Treten intrazerebrale Blutungen unter einer therapeutischen Antikoagulation auf, werden Gerinnungsfaktoren (PPSB) oder spezifische Pharmaka (Idaruzimumab, Andexanet alpha) eingesetzt, um eine Normalisierung der Gerinnung zu erreichen. Bei ca. 1/3 der Patienten mit intrazerebraler Blutung ist in der Frühphase bildgebend eine Blutungsprogress nachweisbar, häufig korrelierend mit einer klinischen Verschlechterung.<sup>4</sup>

Verschiedene Pathomechanismen sind nach ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall an der Infarktausbildung und anderen Prozessen beteiligt. In der Frühphase und in der subakuten Phase nach Ischämie treten Apoptose und Nekrose infolge von hypoxischer Zellschädigung auf, verbunden mit der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies. Neben diesen akuten ischämischen Mechanismen tragen Reperfusion-induzierte Schädigungsmechanismen zur Ausprägung des Schlaganfalls bei.<sup>5</sup>

Aus klinischer Perspektive relevant ist beim ischämischen Infarkt u.a. das Penumbra-Konzept, das von einem ischämisch bedingt avitalen Infarktkern mit umgebendem, durch rekanalisierende Maßnahmen rettbar Hirngewebe ausgeht (*tissue at risk*, Penumbra-Gewebe). Mit ischämischer Gewebeschädigung einher gehen in unterschiedlicher Ausprägung ein zytotoxisches, interstitielles und vasogenes Ödem, das als Infarktödem zu vital bedrohlichen raumfordernden Infarkten beitragen kann. Die betroffenen Patienten können bei vitaler Bedrohung operativ behandelt werden (Hemikraniektomie, subokzipitale Dekompression). Für spezifische kausallorientierte Verfahren zur Beeinflussung der o.g Pathomechanismen (antiödematöse Therapie, Neuroprotektiva, Hypothermie) steht bislang der Nachweis eines klinischen Nutzens aus.<sup>6,7</sup>

Beim hämorrhagischen Schlaganfall ist in der Frühphase nach einer arteriellen Gefäßruptur v.a. die akute mechanische Kompression von umliegenden Hirngewebe pathomechanistisch relevant. Bei ca. 1/3 der Patienten tritt bildgebend innerhalb der ersten Stunden ein Blutungsprogress auf. Ein weiterer Schädigungsmechanismus ist das perifokale Ödem, das nach wenigen Stunden um das Blutungsareal entsteht und innerhalb von 10 – 14 Tagen ein Maximum erreicht. Das perifokale Ödem kann in diesem Zeitraum zu sekundärer klinischer Verschlechterung führen, bei größeren Blutungen bis hin zur sekundären Herniation, und kann zu zusätzlichen strukturellen Gewebeschäden führen. Sowohl die Vermeidung des sekundären Blutungsprogresses wie auch eine Reduktion des perifokalen Ödems stellen potentielle therapeutische Angriffspunkte dar.<sup>4,8</sup>

Auf molekularer und zellulärer Ebene wurden sowohl apoptotische wie auch nekrotische Formen des Zelluntergangs in hämorrhagisch infarziertem Hirngewebe nachgewiesen. Im Bereich der Blutung kommt es zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, insbesondere von Hämoglobin, mit nachfolgender Freisetzung von Eisen und weiteren zytotoxischen Substanzen, die umliegendes Hirngewebe sekundär schädigen. Ebenfalls zytotoxisch wirken die im Bereich der Blutung erhöhte Konzentrationen von Gerinnungsfaktoren (u.a. Thrombin) und Komplementfaktoren. Diese Mechanismen tragen dazu bei, dass die Blut-Hirn-Schranke im betroffenen Gewebe innerhalb weniger Stunden funktionsgestört und zunehmend permeabel wird. In Analogie zum ischämischen Hirninfarkt kommt es zur Einwanderung von immunologisch aktiven Zellen, insbesondere Neutrophilen, in das Hirngewebe. Inflammatorische Prozesse beginnen innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Blutung und beziehen neben lokal aktivierter Mikroglia eingewanderte Neutrophile und weitere immunologisch aktive Zellen ein. Auch hier spielen wie beim ischämischen Infarkt TLR4-vermittelte Neutrophilen-Translokation eine Rolle. Beobachtet wurden in betroffenem Gewebe erhöhte Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF-alpha, IL1-beta) sowie von Proteasen, z.B. Matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) und 3 (MMP3). Die Regulation dieser inflammatorischen Prozesse und ihre Auswirkungen auf die Blutungsresorption einerseits und die Schädigung zerebralen Gewebes nach Hirnblutungen andererseits sind Gegenstand intensiver

Untersuchungen. Pluripotent wirkende Substanzen mit anti-inflammatorischen Effekten wurden in klinischen Studien untersucht, der Nachweis der klinischen Effektivität steht jedoch aus.<sup>9,10</sup>

### **NETs- Neutrophil extracellular traps**

NETs entstehen nach Freisetzung von Chromatin und DNA aus dem Zellkern und der Externalisierung dieser und anderer nukleärer und zytoplasmatischer Bestandteile aus Neutrophilen. Extrazellulär werden nach Freisetzung dieser Bestandteile netzartige Strukturen gebildet (NET Formation).<sup>11</sup> Die extrazellulären Netzwerkstrukturen bestehen aus bis zu 30 verschiedenen Biomolekülen aus dem Zellkern, dem Plasma und der Zellmembran. Diese umfassen neben DNA und Chromatin u.a. Histone, High mobility group box 1 (HMGB1), Nuclear Lamin B, Elastase, Myeloperoxidase (MPO), Cathepsin G, Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9), Komplementbestandteile und Gewebefaktor (tissue factor, TF).<sup>12</sup>

Über die genaue Regulation der molekularen Mechanismen, die zur nukleären Chromatin-Dekondensierung, zu Veränderungen an zellulären Membranen und zur nachfolgenden NET-Bildung beitragen, ist bislang relativ wenig bekannt. Experimentell kann eine spezifische Form des Zelltodes von Neutrophilen ausgelöst werden, die mit der NET-Formation assoziiert ist. Auf zellulärer Ebene kommt es in Neutrophilen zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, die unter Einbindung von Myeloperoxidase zur Translokation von Elastase aus dem Zytoplasma in den Zellkern führt, wo Elastase über den Abbau von Histonen an der Chromatin-Dekondensierung beteiligt ist. Daneben wurden jedoch auch Zelltod-unabhängige Mechanismen der NET-Bildung beobachtet, die unter Beibehaltung der zellulären Integrität der Neutrophilen ablaufen.<sup>12,13</sup>

Eine der wesentlichen physiologischen Funktionen von NETs ist die bakterielle Infektabwehr.<sup>11</sup> Diese Infektabwehr durch NETs ist ein evolutionär konservierter, protektiver Prozess. NETs sind zudem in eine Vielzahl weiterer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse involviert, u.a. im Rahmen von Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder kardiovaskulären Erkrankungen. NETs können dabei pathologisch wirken, z.B. wenn sie zu einer überschiessenden Immunantwort bzw. zur Triggerung von autoimmunen Prozessen führen. Dabei ist aus immunologischer Perspektive die NET-Formation als Teil des unspezifischen Immunsystems anzusehen, die mit dem adaptiven Immunsystem interagiert. Ein weiterer, relevanter Prozess mit Beteiligung von NETs ist Thrombusbildung; hierbei können NETs zur überschiessenden Thrombusbildung beitragen.<sup>13-15</sup> Erste experimentelle Hinweise auf eine Beeinflussbarkeit der NET-Bildung und NET-vermittelter Signaltransduktion, die auch therapeutische Ansätze darstellen können, ergaben sich u.a. für Adenosin-Rezeptor-vermittelte NET-Aktivierung oder NET-vermittelte Check-Point-Regulation.<sup>16,17</sup>

### **NETs bei neurovaskulären Erkrankungen**

Eine zerebrale Ischämie triggert verschiedene zelluläre und immunologische Prozesse, die u.a. eine Einwanderung von Leukozyten, insbesondere Neutrophilen, und Thrombozyten in das Infarktareal bewirken. Die zerebrale Ischämie geht einher mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, so dass eine Transmigration von immunologisch aktiven Zellen einschliesslich Neutrophilen in das Hirngewebe und den Liquorraum in das immun-privilegierte Gewebe erfolgen kann. Eingewanderte Neutrophile wie auch aktivierte Thrombozyten können reaktiv-entzündliche Prozesse verstärken durch Freisetzung proinflammatorischer und prothrombotischer Mediatoren (Thromboinflammation).<sup>18,19</sup>

Plättchen adhären an geschädigtem Endothel im ischämischen Gewebe v.a. mittels PGP1a über Bindung an endothelial exprimierten von Willebrandt-Faktor (vWF). Aktivierte Plättchen führen u.a.

durch Expression von P-Selectin und PGP1a zur endothelialen Neutrophilen-Rekrutierung. In der ischämischen Akutphase werden zudem endothelial verstärkt Rezeptoren exprimiert, die zur Neutrophilen-Adhäsionen führen (PSGL-1, LFA-1, MAC-1).<sup>20</sup> Eine Subpopulation, pro-koagulatorische Plättchen, exprimiert verstärkt Phosphatidylserin (PS) und interagiert spezifisch mit Neutrophilen. Über die Interaktion mit Neutrophilen sind sie immunologisch aktiv und tragen zu thromboinflammatorischen Prozessen und Gewebeschädigung bei.<sup>18,21,22</sup>

Experimentelle Arbeiten zeigten, dass pro-koagulatorische Plättchen die NET-Bildung induzieren, die Gerinnung weiter fördern und zu endotheliale Zelluntergang führen.<sup>23</sup> Die NET-Bildung wird durch Plättchen u.a. via TLR4 induziert.<sup>24</sup> Peptidylarginine deaminase 4 (PAD4), essentiell für die Bildung von NETs, ist erhöht nachweisbar in ischämischem Gewebe.<sup>25</sup> NETs können wiederum pro-koagulatorisch wirken durch Bindung (trapping) von Thrombozyten und Neutrophilen. Prokoagulatorische NET-Marker wie Histone (H3cit<sup>+</sup>) wurden zudem als Bestandteile von humanen zerebralen Thromben nachgewiesen.<sup>26</sup> Ein höherer NET-Anteil in zerebralen Thromben ist mit einer ineffektiveren Thrombolyse assoziiert.<sup>27,28</sup> Diese Daten weisen somit auf eine mögliche Rolle von NETs im Rahmen der Thrombusbildung wie auch der zerebralen Gewebeschädigung nach ischämischem Schlaganfall hin.

Aussagekräftige Daten zur möglichen pathophysiologischen Rolle von NETs bei Patienten mit hämorrhagischem Schlag sind bisher nicht verfügbar. Aufbauend auf bisherigen Erkenntnissen zu Pathomechanismen nach intrazerebraler Blutung ist eine Rolle von NETs sowohl in der akuten Phase, d.h. bei der Hämatombegrenzung, wie auch in der subakuten Phase mit perifokaler Ödembildung und o.g. inflammatorischen Prozessen denkbar. Unterstützt werden diese Annahmen durch zahlreiche Befunde zu molekularen und zellulären Schädigungsmechanismen, die in Analogie zum ischämischen Hirninfarkt erhoben wurden, wo es wie beschrieben erste Hinweise auf eine funktionelle Rolle von NETs gibt.

### **Studienziele:**

Beim ischämischen Schlaganfall gibt es erste Hinweise auf eine Beteiligung von NETs an der Thrombusbildung und an sekundären inflammatorischen Prozessen. Bisher fehlen aussagekräftige prospektive Daten zur Frage, inwieweit NETs mit bildgebenden oder klinischen Parametern nach Hirninfarkt korrelieren. Unklar ist, ob es sich bei der NET-assoziierten Prozessen um für den klinischen Verlauf bei Schlaganfall-Patienten pathomechanistisch relevante und ggf. therapeutisch angehbare Prozesse handelt.

Beim hämorrhagischen Schlaganfall existieren bislang wie beschrieben sehr wenige Daten zur potentiellen Rolle von NETs, insbesondere prospektive erhobenen klinische Daten sind bisher nicht verfügbar.

Hauptziel der explorativen NET-STROKE-Studie ist es, die Rolle von NETs im klinischen Kontext bei Patienten mit ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall zu untersuchen und zu prüfen, ob eine Korrelation mit der bildgebenden Ausdehnung des Infarktes / der Blutung und dem klinisch-funktionellen Behandlungsergebnis besteht.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Sind NET-Marker im Plasma/Serum von Patienten mit ischämischen Schlaganfall nachweisbar?
2. Sind NET-Marker im Plasma/Serum von Patienten mit intrazerebraler Blutung nachweisbar?

3. Besteht eine Assoziation der NET-Marker mit der klinischen Ausprägung des Schlaganfalls (NIHSS Tag 1, NIHSS Tag 2/3, NIHSS Tag 6) bzw. dem Behandlungsergebnis nach 3 Monaten?
4. Besteht eine Assoziation der NET-Marker mit der bildgebenden Ausprägung des Schlaganfalls (A) Infarktvolumen beim ischämischen Schlaganfall an Tag 2/3; B) Blutvolumen und perifokales Ödem an Tag 2/3; Blutvolumen und perifokales Ödem bis Tag 6)?
5. Korrelieren NET-Marker bei Patienten endovaskulärer Therapie mit Prozessparametern (u.a. Zeit vom Symptombeginn bis zur Rekanalisation)?
6. Gibt es unterschiedliche Profile der NET-Marker zwischen Patienten mit ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall?
7. Sind intrathekale NET-Marker bei Patienten mit intraventrikulärem Blutanteil nachweisbar und korrelieren diese mit dem intraventrikulären Blutanteil?

### **Studiendesign:**

Die NET-STROKE-Studie ist eine explorative, monozentrische, prospektive Beobachtungsstudie mit Bioprobenentnahme, die am Universitätsklinikum Augsburg (UKA) durchgeführt wird.

Auf Grund des explorativen Studienansatzes erfolgt nach der Rekrutierung von je 25 Studienteilnehmern mit ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall eine Zwischenanalyse. Bei Nachweis von NET-Markern in Serum/Plasma erfolgt die Rekrutierung von Studienteilnehmern bis zu einer maximalen Gesamtanzahl von 200 Patienten.

### **Selektionskriterien:**

In die NET-STROKE-Studie werden Patienten eingeschlossen, die die folgenden Kriterien erfüllen:

#### Einschlusskriterien:

1. Alter  $\geq 18$  Jahre
2. Klinische Zeichen eines ischämischen oder hämorrhagischen (atraumatischen) Schlaganfalls mit bildgebendem Nachweis (zerebrale CT oder MRT)
3. Zeitdauer vom Symptombeginn bis zur Aufnahme am UKA  $< 24$  h
4. NIHSS-Score bei Aufnahme  $\geq 1$
5. Schriftliche Einwilligung der Patientin / des Patienten oder des gesetzlichen Vertreters zur Studienteilnahme. Bei primär nicht einwilligungsfähigen Patienten muss die Einwilligung des gesetzlichen Vertreters während des stationären Aufenthaltes eingeholt werden (Studieneinschluss unter Vorbehalt).

#### Ausschlusskriterien:

1. Akuterkrankung innerhalb der letzten 4 Wochen: Intrakranielle Blutung, Schlaganfall, Myokardinfarkt, arterieller Verschluss peripherer Arterien, venöse Thrombosen.
2. Aktive maligne Erkrankung
3. Aktive immunvermittelte Erkrankung und / oder immunsuppressive Therapie
4. Einleitung einer palliativen Therapie erfolgt oder geplant

### **Studienpopulation:**

Eingeschlossen werden Patientinnen und Patienten, die auf Grund eines ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfalls am Universitätsklinikum Augsburg behandelt werden und die o.g. Selektionskriterien erfüllen. Geplant ist der Einschluss von maximal 200 Schlaganfall-Patienten über einen Zeitraum von maximal 2 Jahren. Schwerpunkt ist der Einschluss von Patienten mit

- ischämischem Schlaganfall und endovaskulärer Therapie (mind. 50 Studienteilnehmer; Subpopulation NET-EVT)
- hämorrhagischem Schlaganfall (mind. 50 Studienteilnehmer; Subpopulation NET-ICH)

### Studienablauf und Studien-bedingte Maßnahmen:

Die studienbedingten Maßnahmen der NET-STROKE-Studie sind in der tabellarischen Übersicht dargestellt.

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
	0-18 h (nach UKA-Aufnahme; Aufnahmetag = Tag 1)	18h-72h	Tag 6 (+/-1 Tage)	Tag 90 (+/-14 Tage)
Prüfung Ein-/Ausschlusskriterien	X			
Einholung der Einwilligung <sup>1)</sup>	X	X <sup>1)</sup>	X <sup>1)</sup>	
Erhebung Basis-/Behandlungsdaten	X	X	X	
Bildgebung (SoC) <sup>2)</sup>	X (Erstbildgebung UKA)	X <sup>3)</sup>	X <sup>3)</sup>	
NIHSS	X (Aufnahme)	X	X	
mRS	X (Aufnahme)		X	X <sup>4)</sup>
Blutentnahme - Blutbild, Diff.-BB - Plasma/Serum (NET)	X	X	X	
Liquorentnahme EVD <sup>5)</sup>		X	X	

- 1) Bei nicht einwilligungsfähigen Patienten muss die Einwilligung des gesetzlichen Vertreters während des stationären Aufenthaltes eingeholt werden (Studieneinschluss unter Vorbehalt).
- 2) Erhebung der Daten der zerebralen Bildgebungen (u.a. zerebrale CT, zerebrale MRT, zerebrale Angiografie / ggf. interventionelle Therapie, durchgeführt gemäß klinischer Indikationsstellung basierend auf lokaler SOP (Standardbehandlung / Standard of Care [SoC]), d.h. keine Studien-bedingte Bildgebung
- 3) CCT oder cMRT; bei mehreren durchgeführten Bildgebungen: letzte Bildgebung im Visitenzeitfenster
- 4) Strukturierte Erhebung der modifizierten Rankin-Skala (mRS) mittels Telefoninterview
- 5) Patienten mit intrazerebraler Blutung mit ventrikulärem Blut und vorhandener extraventrikulärer Drainage (EVD)

Schlaganfall-Patienten, die am Universitätsklinikum Augsburg auf Grund einer akuten Schlaganfall-Symptomatik aufgenommen werden und die o.g. Selektionskriterien erfüllen, werden nach Einholung der Einwilligung zur Studienteilnahme durch ärztliche Mitglieder des Studienteams in die Studie eingeschlossen.

Bei geeigneten Patienten, die in der Akutphase nicht-einwilligungsfähig sind, kann der Studieneinschluss unter Vorbehalt erfolgen; für diese nicht-einwilligungsfähigen Patienten ist die Einwilligung innerhalb des stationären Aufenthaltes einzuholen, d.h. wenn der Patient die Einwilligungsfähigkeit erlangt hat oder ein gesetzlicher Vertreter etabliert wurde; kann die Einwilligung nicht eingeholt werden, müssen die erhobenen Studien-bezogenen Daten gelöscht und die entnommenen Bioproben verworfen werden; eine Ausnahme sind unter Vorbehalt eingeschlossene, nicht-einwilligungsfähige Patienten, die vor Einholung der Einwilligung während der stationären Behandlung versterben.

Es erfolgen insgesamt vier Studienvisiten (V1 – V4). Die Visiten V1 (0 - 18 h nach Aufnahme am UKA), V2 (>18 - 48 h) und V3 (Tag 6 +/- 1 Tag) werden im Rahmen des stationären Aufenthaltes durchgeführt. Die Visite V4 (Tag 90, +/- 14 Tage) erfolgt als telefonische Visite mit dem Patienten

oder, falls nicht möglich, mit einer betreuenden Person. Die Studiendauer für die Patienten beträgt insgesamt 90 Tage. Zu den Visiten-Zeitpunkten werden Patientencharakteristika, klinische Befunde und Behandlungsdaten einschl. Daten der Bildgebung erhoben wie im Patientendokumentationsbogen aufgeführt.

Bei den Studienteilnehmern werden Plasma-Blutproben (je 10ml) entnommen zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (Visite 1: 0-18 h, Visite 2: >18-72 h, Visite 3: Tag 6 +/-1 Tag). Im Rahmen der Visite 1 soll die Blut-Entnahme so früh wie möglich nach stationärer Aufnahme erfolgen. Im Rahmen der Visite 2 soll die Entnahme möglichst innerhalb von 18-36 Stunden erfolgen und damit zeitnah zur zerebralen Kontrollbildgebung; die Blut-Entnahme ist jedoch bis zu 72 Stunden nach Aufnahme am UKA möglich.

Bei Studienteilnehmern mit intrazerebraler Blutung und intraventrikulärem Blutanteil, bei denen die Anlage einer extraventrikulären Drainage erfolgte, werden zusätzlich Liquorproben entnommen zur Bestimmung von NET-Biomarkern im Liquor. Die Abnahme von Liquorproben (je 3ml) erfolgt zu den Visitenzeitpunkten V2 (18-72h) und V3 (Tag 6 +/- 1 Tag). Der Liquor wird unter sterilen Bedingungen aus dem Liquordrainage-System entnommen.

### **Bioproben-Logistik und -Analyse:**

Die Bioproben (je 15ml Blut [Serum, Plasma, EDTA] an 3 Entnahmezeitpunkten, ggf. je 3 ml EVD-Liquor an 2 Entnahmezeitpunkten) werden wie folgt bearbeitet:

- A) Bestimmung des Differentialblutbildes (5ml EDTA)
  - Direkt nach Entnahme erfolgt die Bestimmung des Differentialblutbildes im Institut für Labormedizin und Mikrobiologie des UKA.
  
- B) Wissenschaftliche Analysen zur Bestimmung von NET-Biomarkern (5ml Plasma/5ml Serum, ggf. 3ml EVD-Liquor)
  - Die Proben für die wissenschaftlichen Analysen werden direkt nach Abnahme (<2h) in der Zentralen Biobank des UKA zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die Proben werden gesammelt per Trockeneis versandt an das Forschungslabor von Frau Prof. Martinod (Universität Leuven, Belgien).
  - Die wissenschaftlichen Analysen umfassen die Bestimmung von NET-Biomarkern einschl. zellfreier DNA, Nucleosomen, Histonen einschl. citrullinierter Histone, DNA-Myeloperoxidase (MPO)-Komplexen, DNA-Neutrophilen-Elastase (NE)-Komplexen und Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4).

### **Statistische Auswertung:**

Die Auswertung umfasst deskriptive Analysen der Patientenpopulation, bildgebender Parameter und der untersuchten Biomarker. Für Gruppenvergleiche werden Daten dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung und als Median mit Interquartil-Bereich. Für vergleichende Analysen werden der Student T-Test (Zwischproben- bzw. Differenzen-T-Test für gepaarte Daten, je nach Datenstruktur) oder der Mann Whitney U-Test eingesetzt unter Berücksichtigung der Datenverteilung. Zum Vergleich von Häufigkeiten erfolgte die Berechnung mittels Pearson's Chi-Quadrat-Test and Fisher's exact-Test (zweiseitig). Für den Vergleich von sequentiell erhobenen Daten (z.B. Biomarker) wird das ANOVA-Verfahren eingesetzt, für Korrelationsanalysen wird der Spearman Rank-Test eingesetzt. Als Signifikanz-Niveau wird  $\alpha = 0,05$  definiert.

### **Registrierung der Studie:**

Die Studie wird vor Beginn der Rekrutierung von Studienteilnehmern im Deutschen Register für Klinische Studien (DRKS) registriert.

### **Publikation der Studienergebnisse:**

Die Studienergebnisse sollen zur Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift mit Peer review-Verfahren eingereicht werden.

### **Literatur:**

1. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol.* 2021;20(10):795-820. doi:10.1016/S1474-4422(21)00252-0
2. Berge E, Whiteley W, Audebert H, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J.* 2021;6(1):I-LXII. doi:10.1177/2396987321989865
3. Turc G, Bhogal P, Fischer U, et al. European Stroke Organisation (ESO) - European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) Guidelines on Mechanical Thrombectomy in Acute Ischaemic Stroke Endorsed by Stroke Alliance for Europe (SAFE). *Eur Stroke J.* 2019;4(1):6-12. doi:10.1177/2396987319832140
4. Gross BA, Jankowitz BT, Friedlander RM. Cerebral Intraparenchymal Hemorrhage: A Review. *JAMA.* 2019;321(13):1295-1303. doi:10.1001/jama.2019.2413
5. Datta A, Sarmah D, Mounica L, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Transl Stroke Res.* 2020;11(6):1185-1202. doi:10.1007/s12975-020-00806-z
6. van der Worp HB, Hofmeijer J, Jüttler E, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on the management of space-occupying brain infarction. *Eur Stroke J.* 2021;6(2):III. doi:10.1177/23969873211027001
7. Reinink H, Jüttler E, Hacke W, et al. Surgical Decompression for Space-Occupying Hemispheric Infarction: A Systematic Review and Individual Patient Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2021;78(2):208-216. doi:10.1001/jamaneurol.2020.3745
8. Mittal MK, LacKamp A. Intracerebral Hemorrhage: Perihemorrhagic Edema and Secondary Hematoma Expansion: From Bench Work to Ongoing Controversies. *Front Neurol.* 2016;7:210. doi:10.3389/fneur.2016.00210
9. Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol.* 2012;11(8):720-731. doi:10.1016/S1474-4422(12)70104-7
10. Fu Y, Hao J, Zhang N, et al. Fingolimod for the treatment of intracerebral hemorrhage: a 2-arm proof-of-concept study. *JAMA Neurol.* 2014;71(9):1092-1101. doi:10.1001/jamaneurol.2014.1065

11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
12. Liu ML, Lyu X, Werth VP. Recent progress in the mechanistic understanding of NET formation in neutrophils. *FEBS J*. 2022;289(14):3954-3966. doi:10.1111/febs.16036
13. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-147. doi:10.1038/nri.2017.105
14. Ferré-Vallverdú M, Latorre AM, Fuset MP, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with STEMI. Association with percutaneous coronary intervention and antithrombotic treatments. *Thromb Res*. 2022;213:78-83. doi:10.1016/j.thromres.2022.03.002
15. Witsch J, Spalart V, Martinod K, et al. Neutrophil Extracellular Traps and Delayed Cerebral Ischemia in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Crit Care Explor*. 2022;4(5):e0692. doi:10.1097/CCE.0000000000000692
16. Ali RA, Gandhi AA, Meng H, et al. Adenosine receptor agonism protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Nat Commun*. 2019;10(1):1916. doi:10.1038/s41467-019-09801-x
17. Zhang Y, Chandra V, Riquelme Sanchez E, et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2020;217(12):e20190354. doi:10.1084/jem.20190354
18. De Meyer SF, Langhauser F, Hauptelshofer S, Kleinschnitz C, Casas AI. Thromboinflammation in Brain Ischemia: Recent Updates and Future Perspectives. *Stroke*. 2022;53(5):1487-1499. doi:10.1161/STROKEAHA.122.038733
19. Ansari J, Gavins FNE. Neutrophils and Platelets: Immune Soldiers Fighting Together in Stroke Pathophysiology. *Biomedicines*. 2021;9(12):1945. doi:10.3390/biomedicines9121945
20. Neelamegham S, Taylor AD, Shankaran H, Smith CW, Simon SI. Shear and time-dependent changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 binding regulate neutrophil homotypic adhesion. *J Immunol*. 2000;164(7):3798-3805. doi:10.4049/jimmunol.164.7.3798
21. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*. 2017;130(20):2171-2179. doi:10.1182/blood-2017-05-787259
22. Yao Z, Wang L, Wu X, et al. Enhanced Procoagulant Activity on Blood Cells after Acute Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2017;8(1):83-91. doi:10.1007/s12975-016-0501-7
23. Zhou P, Li T, Jin J, et al. Interactions between neutrophil extracellular traps and activated platelets enhance procoagulant activity in acute stroke patients with ICA occlusion. *EBioMedicine*. 2020;53:102671. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102671
24. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-469. doi:10.1038/nm1565
25. Kang L, Yu H, Yang X, et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke. *Nat Commun*. 2020;11(1):2488. doi:10.1038/s41467-020-16191-y

26. Laridan E, Denorme F, Desender L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol*. 2017;82(2):223-232. doi:10.1002/ana.24993
27. Novotny J, Oberdieck P, Titova A, et al. Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology*. 2020;94(22):e2346-e2360. doi:10.1212/WNL.0000000000009532
28. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754-757. doi:10.1161/STROKEAHA.117.019896