

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss des direkten Thrombininhibitors Argatroban
auf die Reduktion des Thrombin-induzierten sekundären Schadens
nach intrazerebraler Blutung bei der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Louise Taylor aus Reims

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

Tag der Promotion: 22. April 2024

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1. Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1 Intrazerebrale Blutung.....	3
2.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose	3
2.1.2 Symptome, Diagnostik und Therapie	4
2.1.3. Pathophysiologie	7
2.2 Thrombin.....	9
2.2.1 Struktur und Synthese	9
2.2.2 Thrombinrezeptoren	10
2.2.3 Funktionen von Thrombin	13
2.2.4 Rolle von Thrombin im ZNS.....	15
2.3 Argatroban	19
2.4 DTI und Neuroprotektion.....	20
3. Material.....	22
3.1 Mäuse	22
3.2 Chemikalien und Reagenzien	22
3.3 Verbrauchsmaterial.....	23
3.4 Geräte	24
3.5 Antikörper	24
3.6 Medikamente.....	25
3.7 Software	25
4. Methoden	27
4.1 Einteilung der Versuchsgruppen	27
4.2 Verhaltenstests	27
4.2.1 Neurological Severity Score	27
4.2.2 Rotarod.....	28
4.3 Narkose und Operation	29
4.4 Intraoperatives Monitoring.....	31
4.5 Behandlung mit Argatroban und Nachbeobachtung.....	31
4.6 Ausschlusskriterien.....	31
4.7 Hirnentnahme und Probenaufbewahrung.....	31
4.8 Schneiden und Färben	32

4.8.1 HE-Färbung.....	32
4.8.2 Immunhistologische Färbung	33
4.8.3 Digitalisierung der Schnitte	35
4.9 Auswertung der Färbungen	35
4.9.1 HE Färbungen.....	35
4.9.2 Immunhistologische Färbungen	37
4.10 Grafiken und Statistik.....	42
5. Ergebnisse	44
5.1 Intraoperatives Monitoring.....	44
5.2 Überlebenszeit.....	45
5.3 Verhaltenstests	45
5.3.1 Neuroscore	45
5.3.2 Rotarod.....	46
5.3.3 Gewicht	47
5.4 Färbungen.....	47
5.4.1 Lokalisation und Ausdehnung des Hämatoms	47
5.4.2 Negativkontrollen immunhistologische Färbungen	50
5.4.3 Neuronaler Schaden	51
5.4.4 Thrombinaufkommen periläsional.....	53
5.4.5 Korrelation Neuronaler Schaden und Thrombin.....	55
5.4.6 Astrozyten periläsional	56
5.4.7 Korrelation Astrozyten periläsional und Thrombin	58
6. Diskussion	60
6.1 Methodendiskussion	60
6.1.1 ICB im Mausmodell.....	60
6.1.2 Verhaltenstests	61
6.1.3 Färbungen und Auswertung.....	62
6.2 Ergebnisdiskussion.....	64
6.2.1 Nach ICB kommt es periläsional zu einem Anstieg an Thrombin	64
6.2.2 Ein höheres Thrombinaufkommen korreliert mit dem Ausmaß des neuronalen Schadens.....	65
6.2.3 Argatroban verringert den periläsionalen neuronalen Schaden nach ICB....	66
6.2.4 Durch Argatroban kommt es nach ICB initial zu vermehrter Inflammation, langfristig senkt es die Stärke der Gliose	67
6.2.5 Das Hämatomvolumen der ICB ist durch die Therapie mit Argatroban vergrößert.....	69
6.2.6 Argatroban erhöht das Risiko für zusätzliche Blutungszeichen nach ICB ...	70

6.2.7 Das langfristige neurologische Outcome wird durch Argatroban nicht verschlechtert.....	71
6.3 Ausblick	73
7. Zusammenfassung	75
8. Literaturverzeichnis.....	77
9. Danksagung.....	88
10. Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

APC	aktiviertes Protein C
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosin-Triphosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke (blood-brain-barrier)
BP	Blutdruck
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie (cerebral amyloid angiopathy)
CBF	Zerebraler Blutfluss (cerebral blood flow)
CBV	Zerebrales Blutvolumen
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DALY	disability adjusted life years
DOAK	direkte orale Antikoagulantien
DSA	Digitale Subtraktionsangiografie
DTI	Direkter Thrombininhibitor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPCR	Endothelial-protein-C-Receptor
FFP	fresh frozen plasma
GCS	Glasgow-Coma-Scale
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HE	Hämatoxylin Eosin
HF	Herzfrequenz
HIF-1	Hypoxie-induzierender Faktor-1
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HSP	Hitzeschockprotein
ICB	Intrazerebrale Blutung
ICH	intracerebral hemorrhage
ICP	Intrakranieller Druck (intracranial pressure)
IL	Interleukin
INR	international normalized ratio
kDa	Kilodalton
MAPK	mitogen activated protein kinase
MOM	mouse-on-mouse
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSS	neurological severity score

PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PAS	percent area stained
PBS	phosphate-buffered saline
PN-1	Protease Nexin-1
rTPA	recombinant tissue-type plasminogen activator
ROI	region of interest
RR	Relatives Risiko
SAH	Subarachnoidales Hämatom
SEM	standard error of the mean; Standardfehler
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue type plasminogen activator
ZNS	Zentrales Nervensystem
VIM	Vimentin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung von Prothrombin (Adams and Huntington 2016)	10
Abbildung 2: Struktur des Proteinase Activated Receptor-1 PAR-1 (Grand, Turnell et al. 1996)	11
Abbildung 3: Aktivierung des Proteinase Activated Receptor-1 (PAR-1) (Coughlin 2000)	12
Abbildung 4: Signalkaskade des Proteinase Activated Receptor-1 PAR-1 (Coughlin 2000) .	13
Abbildung 5: Chemische Struktur von Argatroban (Hursting, Alford et al. 1997)	20
Abbildung 6: Einteilung der Versuchsgruppen (eigene Darstellung)	27
Abbildung 7: a) Neuroscore Aufbau b) Rotarod	29
Abbildung 8: Operationsaufbau	30
Abbildung 9: Quantifizierung des Hämatomvolumens (Paxinos and Franklin 2003)	36
Abbildung 10: HE Färbung.....	37
Abbildung 11: Auswertung Immunhistofärbung NeuN	39
Abbildung 12: Auswertung Immunhistofärbung Thrombin	40
Abbildung 13: Auswertung Immunhistofärbung GFAP	41
Abbildung 14: intraoperativer CBF.....	44
Abbildung 15: intraoperativer ICP	44
Abbildung 16: Neuroscore 3T und 7T Gruppe	46
Abbildung 17: Rotarod 3T und 7T Gruppe	46
Abbildung 18: Relatives Gewicht 3T und 7T Gruppe	47
Abbildung 19: Hämatomausdehnung 3T	49
Abbildung 20: Hämatomausdehnung 7T	49
Abbildung 21: Hämatomvolumen 3T und 7T	49
Abbildung 22: zusätzliche Blutungszeichen 3T	50
Abbildung 23: zusätzliche Blutungszeichen 7T	50
Abbildung 24: Negativkontrollen immunhistologische Färbungen	51
Abbildung 25: NeuN 3T-Gruppe	52
Abbildung 26: NeuN 7T-Gruppe	53
Abbildung 27: Thrombin 3T-Gruppe	54
Abbildung 28: Thrombin 7T-Gruppe	55
Abbildung 29: Korrelation zwischen Thrombinaufkommen und Neuronenzellzahl periläsional	56
Abbildung 30: GFAP 3T-Gruppe.....	57
Abbildung 31: GFAP 7T-Gruppe.....	58
Abbildung 32: Korrelation Astrozyten und Thrombin.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	23
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Geräte.....	24
Tabelle 4: Antikörper	25
Tabelle 5: Medikamente.....	25
Tabelle 6: Software	26
Tabelle 7: Antikörper Immunhistochemie manuell	34
Tabelle 8: Antikörper Immunhistochemie automatisiert	35
Tabelle 9: ICB Daten 3T.....	48
Tabelle 10: ICB Daten 7T.....	48

1. Ziel der Dissertation

Intrazerebrale Blutungen (ICB) zählen zu den Schlaganfällen und machen weltweit ca. 10-15% von ihnen aus (Qureshi, Mendelow et al. 2009, Tsao, Aday et al. 2022). Aufgrund ihrer schlechteren Prognose und der mit den ischämischen Schlaganfällen verglichen höheren Morbidität und Mortalität, stellen sie eine große Herausforderung für die Betroffenen und die Gesellschaft dar (Elijovich, Patel et al. 2008). Die Zahl der Krankenhausaufnahmen von Patienten mit einer ICB steigt jährlich, unter anderem aufgrund der alternden Bevölkerung und des zunehmenden Gebrauchs an Antikoagulantien (Qureshi, Mendelow et al. 2009, Adeoye and Broderick 2010, Béjot, Cordonnier et al. 2013). Bei der Einblutung kommt es in den ersten 48 Stunden zu irreversiblen Hirnschäden, die als Primärschaden bezeichnet werden. Durch die Einblutung kommt es zum Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) und zum Einbruch der Blut-Hirn-Schranke (BBB). Daraus resultiert die Bildung eines periläsionalen Ödems und es fallen zytotoxische Substanzen im Bereich um die Läsion an, die zu Nervenzelluntergang führen. Als Folge kommt es zur neurologischen Verschlechterung der Betroffenen bis hin zum Verlust der Selbstständigkeit. Dieser sogenannte Sekundärschaden bildet sich über Tage hinweg nach Eintritt der Einblutung und ist potentiell therapeutisch beeinflussbar (Mittal and Lackamp 2016).

Aktuell gibt es keine einheitliche Standardtherapie zur Behandlung der ICB. Eine dekompressive Hemikraniektomie kann durch eine rasche Druckentlastung die Gesamtmortalität nach großen ICBs senken (Luney, English et al. 2016, Yao, Ma et al. 2018). Hämatomaspiration oder- evakuation sind weitere Therapieoptionen, zeigen jedoch gegenüber der konservativen Behandlung der ICB keine relevante Überlegenheit (Mendelow, Gregson et al. 2005, Mendelow, Gregson et al. 2013). Aus diesen Gründen besteht weiterhin Forschungsbedarf bezüglich neuer Angriffspunkte für die Behandlung der ICB.

Der Gerinnungsfaktor Thrombin spielt nach aktuellen Untersuchungen eine große Rolle an der Entstehung des Sekundärschadens nach ICB. Thrombin wirkt in niedrigen Konzentrationen im Hirngewebe neuroprotektiv, in hohen Konzentrationen führt es lokal zum direkten Zelluntergang (Kitaoka, Hua et al. 2003, Krenzlin, Lorenz et al. 2016, Krenzlin, Gresser et al. 2020). Untersuchungen konnten außerdem das Vorhandensein eines extrahepatischen, intrazerebralen Thrombinsystems im Mausmodell und eine Korrelation zur Schadensgröße nachweisen (Krenzlin, Gresser et al. 2020). Unter anderen Gesichtspunkten konnte *in vivo* bereits gezeigt werden, dass perifokale Ödeme, als Folge einer Ansammlung von Thrombin, nach Gabe des direkten Thrombininhibitors Argatroban abnahmen (Kitaoka, Hua et al. 2003). Ziel dieser Dissertation ist es, weitere Erkenntnisse zu der Rolle von Thrombin bei der Schadensentstehung einer ICB zu erlangen und den Effekt von Thrombininhibition durch Argatroban zu untersuchen. Dazu wurde in einem bereits etablierten ICB-Mausmodell geprüft,

ob die Aktivierung des zerebralen Thrombinsystems durch intraperitoneale Gabe von Argatroban beeinflusst werden kann, ob eine Reduktion des Thrombin-induzierten periläsionalen Zelluntergangs durch diese Behandlung erreichbar ist und ob durch die Behandlung ein verbessertes neurologisches Outcome bei den Tieren ermöglicht werden kann. Als Vergleichsgruppe wurde einem Teil der Versuchstiere intraperitoneal die gleiche Menge Natrium-Chlorid injiziert, um Rückschlüsse auf den Effekt des direkten Thrombininhibitors Argatroban ziehen zu können. Perioperativ wurden die Parameter ICP und zerebraler Blutfluss (CBF), sowie Blutdruck (BP) und Herzfrequenz (HF) gemessen. Das neurologische Outcome der Mäuse wurde anhand von zwei Verhaltenstests gemessen, dem Neurological Severity Score (NSS) und dem Rotarod-Test. Es wurden zum Zeitpunkt 3 Tage (T) und 7T nach ICB Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen an kryokonservierten Hirnschnitten angefertigt und so die Größe, Lokalisation und das Ausmaß der Blutung festgestellt und die Versuchsgruppen miteinander verglichen. Mit immunhistologischen Färbungen wurden periläsionale Zellzahlen von Neuronen, Gliazellen sowie Thrombin-enthaltenden Zellen ausgezählt und ausgewertet. Dieses Vorgehen ermöglicht zum Einen einen Erkenntnisgewinn bezüglich der pathophysiologischen Grundlagen der ICB, zum Anderen liefert es Informationen hinsichtlich neuer Therapieansätze und deren zeitlicher Wirksamkeit.

2. Literaturdiskussion

2.1 Intrazerebrale Blutung

2.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose

Weltweit kommt es jährlich unter den circa 12 Millionen Schlaganfällen zu 2 Millionen intrazerebralen Blutungen (circa 19%), mit einer steigenden Inzidenz in den letzten Jahrzehnten (Krishnamurthi, Ikeda et al. 2020). Das liegt unter anderem an dem demografischen Wandel mit einer zunehmend alternden Bevölkerung sowie dem erhöhten Einsatz von antithrombotischen Medikamenten zur Verhinderung von Gefäßverschlüssen (Hostettler, Seiffge et al. 2019). Bis zum Jahr 2050 wird ein weiterer deutlicher Anstieg der Inzidenz erwartet und der Anteil an ICB-Patienten über 80 wird voraussichtlich um das 2,5-fache steigen (Stein, Misselwitz et al. 2012).

Laut Todesursachenstatistik verstarben in Deutschland im Jahr 2020 von 36.270 Personen mit Schlaganfällen 8.614 Patienten an einer ICB, was etwa 24% entspricht (Statistisches Bundesamt 2021). Weltweit sterben jährlich circa 2,8 Millionen Patienten an einer ICB oder an deren Folgen (Benjamin, Muntner et al. 2019). Die Mortalität beträgt nach einem Jahr über 50% und nur 12-39% der Patienten erreichen letztendlich funktionelle Selbstständigkeit (Montaño, Hanley et al. 2021).

Zu den Risikofaktoren für eine ICB zählen vor allem langjähriger Bluthochdruck, aber auch Alter, Geschlecht, hoher Alkoholkonsum (ab 36g Alkohol/Tag) und ethnische Herkunft (Ariesen, Claus et al. 2003, Elijovich, Patel et al. 2008). Es besteht unter Schwarzen, Hispanics und Asiaten eine höhere Inzidenz an ICB, was zum Teil durch den schlechteren Zugang zu medizinischer Versorgung und schlechter kontrollierten Blutdruckwerten zu erklären ist. Das höhere Vorkommen von ICB unter der nicht-weißen Population kann jedoch nicht gänzlich durch sozioökonomische Faktoren allein erklärt werden; als weitere mögliche Ursache kommen höhere Raten an zerebrovaskulären Malformationen in dieser Population in Betracht (Gunel, Awad et al. 1996, Sturgeon, Folsom et al. 2007). Die Einnahme von Antikoagulation zur Verhinderung von Gefäßverschlüssen zählt zunehmend als Risikofaktor für eine ICB. In den USA ist dies in fast 20% der Fälle für die ICB verantwortlich (Flaherty 2010).

Die ICB hat unter den Schlaganfällen die höchste Mortalität. Assoziiert mit einer höheren Sterberate sind die Faktoren hohes Alter, niedriger Glasgow-Coma-Scale (GCS), steigendes ICB-Volumen, intraventrikuläre Blutung und infratentorielle Lokalisation der Blutung. Von denjenigen, die eine ICB überleben, erfahren viele schwerwiegende Langzeitfolgen, wie körperliche oder geistige Behinderung (Wang 2010). Nur circa ein Drittel der Patienten mit einer ICB können im Verlauf ihre Selbstständigkeit wiedererlangen (Flaherty 2010). Das Risiko

einer erneuten ICB beträgt zwischen 1,3 und 7,4 % pro Jahr (Poon, Fonville et al. 2014). Die Prävalenz von Demenz nach ICB beträgt zwischen 5 und 44% und führt zu erheblicher Beeinträchtigung der Patienten (Xiong, Reijmer et al. 2016).

Die gesundheitlichen Kosten aufgrund von ICBs und deren Folgen sind erheblich und die Belastung für die Gesellschaft im Sinne von Todeszahlen und disability-adjusted life years (DALYs) nimmt stetig zu. Die Inzidenz an Schlaganfällen hat in den letzten Jahrzehnten abgenommen, der Anteil an ICB jedoch zugenommen. Das Risiko steigt mit zunehmendem Alter, was die Bedeutung der Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Pathophysiologie und Therapie der ICB aufzeigt (van Asch, Luitse et al. 2010, Statistisches Bundesamt 2021, Feigin, Brainin et al. 2022).

2.1.2 Symptome, Diagnostik und Therapie

Die ICB ist ein lebensbedrohlicher medizinischer Notfall, der eine schnelle Diagnostik und Einleitung von therapeutischen Maßnahmen erfordert. Klinisch zeigt sich die ICB, ähnlich den ischämischen Schlaganfällen, durch akut einsetzende fokale neurologische Funktionsausfälle, Vigilanzminderung oder Hirnstammsymptomatik – je nach Lokalisation der Blutung. Häufig ist die ICB von starken Kopfschmerzen begleitet und bei den Betroffenen verschlechtert sich der neurologische Zustand bereits vor oder während der Krankenhauseinweisung, was auf die Hämatomexpansion und die Zunahme des ICP zurückzuführen ist. Durch den erhöhten ICP zeigen die Patienten Übelkeit und Erbrechen auf. Bei Patienten mit großen kortikalen Läsionen oder ausgeprägtem Ventrikeleinbruch, der die Liquorresorption verhindert, steigt der ICP zusätzlich und kann bis hin zu Herniation und Koma führen. Außerdem können sich Pupillenverengung oder -seitendifferenz zeigen, was auf eine pontine Läsion hinweisen kann (Elijovich, Patel et al. 2008, Qureshi, Mendelow et al. 2009).

Eine ICB wird leitliniengemäß mittels einer Computertomographie (CT) diagnostiziert. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit Gradientenechosequenz hat eine vergleichbare Sensitivität und kann sowohl hyperakute Blutungen und Mikrohämmorrhagien, als auch chronische Blutungen besser detektieren (Kidwell, Chalela et al. 2004). Durch die Gabe von Kontrastmittel oder Beurteilung der Wichtungen können somit Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Blutung gezogen. Die Diffusionswichtung ist hilfreich, um primäre von ischämisch bedingten ICBs zu unterscheiden (Montaño, Hanley et al. 2021). Um sekundäre Ursachen einer ICB zu diagnostizieren, ist eine CT-Angiographie notwendig (Qureshi, Mendelow et al. 2009). Bei Hinweisen auf eine makrovaskuläre Ursache der Blutung, wie beispielsweise bei aktiver Blutung im CT oder sichtbarer Mikroangiopathie ohne Bluthochdruck in der Vorgeschichte, kann eine intraarterielle Digitale Subtraktionsangiographie (DSA) hilfreich sein (Hostettler, Seiffge et al. 2019). Die Patienten mit ICB sollten routinemäßig mittels einem standardisierten Schweregrad Score evaluiert werden. Das am häufigste verwendete

Evaluationssystem ist der ICH (Intracerebral Hemorrhage) Score, der Punkte für die Kriterien GCS, Alter über 80, infratentorielle Lokalisation der Blutung, ICB Volumen und das Vorhandensein von intraventrikulärer Einblutung vergibt und eine Einschätzung zur 30-Tage-Mortalität ermöglicht (Hemphill, Bonovich et al. 2001).

Die Therapie der ICB ist sehr individuell und unterscheidet sich je nach Einzelfall und Handlungsrichtlinie der Klinik. Trotz vieler Studien zur Verbesserung der Therapie gibt es bisher keine erfolgreiche Standardtherapie zur Behandlung der ICB. Bei Aufnahme der Patienten meist über eine Notaufnahme sind Atemwegsmanagement, Kontrolle des Blutdrucks und des ICP sowie gegebenenfalls Antagonisierung von Antikoagulation erste therapeutische Maßnahmen. Die Patienten werden initial auf einer Intensivstation oder einer Schlaganfalleinheit betreut und überwacht.

Ein hoher Blutdruck nach ICB ist häufig mit Hämatomexpansion und einem schlechteren Outcome assoziiert (Qureshi, Mendelow et al. 2009). Laut American Society of Anesthesiologists (ASA) Guideline von 2022 wird die Senkung des Blutdrucks bei Patienten mit einem systolischen BP von 150-220mmHG auf einen Wert von 140mmHg empfohlen. Ein Therapiebeginn innerhalb der ersten zwei Stunden nach Auftreten der ICB und ein Erreichen des Zielwertes nach einer Stunde reduziert das Risiko einer Hämatomexpansion und verbessert das neurologische Outcome (Greenberg, Ziai et al. 2022). Eine große klinische Studie namens INTERACT 2, die den Effekt einer schnellen Blutdrucksenkung nach ICB untersucht hat, konnte zeigen, dass diese sicher ist und mit einer Verbesserung des funktionellen Outcomes einhergeht (Anderson, Heeley et al. 2013).

Ein Anstieg des ICP durch den Masseneffekt geht mit vermehrten Komplikationen einher und sollte laut European Stroke Initiative (EUSI) guideline bei beatmeten Patienten routinemäßig gemessen und bei Bedarf gesenkt werden. Bei Patienten mit Bewusstseinsbeeinträchtigung aufgrund eines erhöhten ICP oder bei zunehmendem Ödem in der Bildgebung kann ebenfalls eine Senkung des ICP mithilfe von Mannitol, hypertoner Kochsalzlösung oder vorübergehender Hyperventilation veranlasst werden (Steiner, Kaste et al. 2006, Greenberg, Ziai et al. 2022).

Durch Einlegen einer externen Ventrikeldrainage bei Patienten mit einer Ventrikelblutung kann der ICP ebenfalls gesenkt werden. Dabei müssen für die Drainage thrombolytische Substanzen verwendet werden, um die Durchlässigkeit des Katheters zu gewährleisten (Hanley, Lane et al. 2017, Cusack, Carhuapoma et al. 2018).

Die Blutgerinnung und Hämostase muss individuell therapiert und angepasst werden. Hat der/die Betroffene eine bekannte Gerinnungsstörung, kann der entsprechende Faktor substituiert werden. Ist der/die Betroffene unter Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten, muss der international normalized ratio (INR) durch Gabe von fresh frozen plasma (FFP), Vitamin K oder Faktorenkonzentrat normalisiert werden. Ist die ICB unter einer laufenden

Heparintherapie eingetreten, kann mit Protaminsulfat antagonisiert werden (Greenberg, Ziai et al. 2022). In der aktuellsten Leitlinie von ASA/AHA zur ICB von 2022 wird bezüglich einer ICB unter der Therapie mit direkten oralen Antikoagulantien eine Antagonisierung derselben empfohlen. So wird bei Patienten unter Therapie mit Faktor Xa-Inhibitoren die Gabe von Andexanet alpha und bei Patienten unter Therapie mit Dabigatran die Gabe von Idarucizumab zur Antagonisierung vorgeschlagen (Greenberg, Ziai et al. 2022).

Eine Möglichkeit der operativen Therapie ist die Hämatomevakuuation, entweder über eine offene Hemikraniektomie oder mittels minimalinvasiver stereotaktisch platzierter, endoskopischer Aspiration, mithilfe von thrombolytisch wirksamen Medikamenten.

Es gibt viele Studien, die die operative mit der konservativen Therapie der ICB vergleichen. Die internationale klinische Studie „Surgical Treatment of Intracerebral Hemorrhage“ (STICH I) verglich frühe Hämatomevakuuation mit einer konservativen Therapie, dabei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen nach 6 Monaten, gemessen an einer erweiterten GCS (Mendelow, Gregson et al. 2005). Patienten mit einer kortikalen Läsion profitierten in dieser Studie mehr von der chirurgischen Therapie als Patienten mit einer tief liegenden Läsion (Steiner, Kaste et al. 2006). Die STICH II untersuchte diejenigen Patienten, die ein besseres Outcome in der STICH I aufwiesen: Patienten mit oberflächlichen Hämatomen ohne intraventrikuläre Blutung und mit einer GCS von 8 oder höher. Die Patienten erhielten entweder innerhalb von 12 Stunden nach ICB eine Kraniotomie oder eine initiale konservative Therapie. Nach 6 Monaten zeigten 59% der operierten und 62% der konservativ behandelten Patienten ein ungünstiges Outcome – jedoch wiesen die operierten Patienten keine statistisch signifikante klinische Verbesserung auf (Mendelow, Gregson et al. 2013). Die minimalinvasiv durchgeführte Hämatomaspiration zeigte in einer Metaanalyse verglichen mit der offenen Hemikraniektomie eine reduzierte Wahrscheinlichkeit für Mortalität und Morbidität, unter anderem aufgrund des niedrigeren Risikos für Nachblutung bei der minimalinvasiven Methode (Wang, Li et al. 2014). Die AHA/ASA Guidelines empfehlen aktuell eine zügige operative Therapie bei Patienten mit Kleinhirnblutung, die zu unterer Einklemmung oder Hydrozephalus führt und mit rapider neurologischer Verschlechterung einhergeht, sofern eine aggressive Therapie angestrebt werden soll. Bei sich verschlechternden Patienten mit supratentorieller ICB kann eine Evakuuation oder dekompressive Hemikraniektomie lebensrettend sein, bei stabilen Patienten hat dies jedoch keinen klaren Vorteil gegenüber der konservativen Therapie gezeigt (Greenberg, Ziai et al. 2022). Für mittelgroße bis große, supratentorielle ICBs (30ml oder mehr) zeigte eine große multizentrischen Studie (MISTIE III), dass die minimalinvasive Hämatomausräumung mit anschließender Lyse kein Vorteil gegenüber der konservativen Therapie hat (Hanley, Thompson et al. 2019).

2.1.3. Pathophysiologie

Nicht-traumatische, primäre ICBs entstehen durch Ruptur eines kleinen Blutgefäßes im Hirnparenchym und führen zu einer Einblutung in typische Hirnlokalisationen, wie die Großhirnhemisphären, die Basalganglien, den Thalamus, den Hirnstamm oder das Kleinhirn. ICBs sind in 60-70% der Fälle Folge von langjährigem Bluthochdruck und daraus resultierenden lokalen Gefäßschäden (Elijovich, Patel et al. 2008). Diese Mikroangiopathien entstehen zum einen durch Arteriosklerose und zum anderen durch Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA), letzteres bevorzugt bei älteren Patienten. CAA wird durch Ablagerungen von β -Amyloid in kortikalen und leptomeningealen Blutgefäßen verursacht und führt häufiger zu ICB in den Großhirnhemisphären, während Arteriosklerose-bedingte ICBs eher im Hirnstamm und in den Basalganglien lokalisiert sind. CAA trägt ebenfalls erheblich zur Entstehung von Demenzen bei und ist mit Morbus Alzheimer assoziiert (Hostettler, Seiffge et al. 2019). Als Komplikation der Einnahme von Blutverdünnern kann es zu ICBs kommen, was aufgrund der alternden Bevölkerung zunehmend zu sehen ist. Verglichen mit Vitamin-K-Antagonisten zeigen direkte orale Antikoagulantien (DOAK) zwar ein reduziertes Risiko für die Entwicklung von ICB als Komplikation, doch unter DOAK-assoziierten ICB kommt es häufiger zu Hämatomexpansion und schlechterem klinischen Outcome (Qureshi, Mendelow et al. 2009, Tsivgoulis, Lioutas et al. 2017).

Sekundäre ICBs entstehen unter anderem durch vaskuläre Malformationen, wie z.B. Aneurysmen, arteriovenöse Malformationen oder Cavernosus-Malformationen. Weitere Ursachen für sekundäre ICBs sind zerebrale venöse Thrombosen, Tumore und zerebrale Vaskulitiden. ICBs können außerdem als Folge von Transformation eines ischämischen Schlaganfalls entstehen (Elijovich, Patel et al. 2008, Montaña, Hanley et al. 2021).

Man unterscheidet pathophysiologisch den durch die Läsion direkt betroffenen primären Schaden vom sekundären Schaden, der sich im Verlauf entwickelt (Schadenswachstum) und potentiell beeinflussbar ist. Im Gebiet des primären Schadens kommt es innerhalb der ersten 48 Stunden nach ICB zu einem irreversiblen Zelluntergang, ausgelöst durch die Raumforderung selbst. Der direkte Untergang von Neuronen und Gliazellen im primären Schadensgebiet führt zu mechanischer Deformation und damit zur Oligämie, Ausschüttung von Neurotransmittern, mitochondrialer Schädigung und Membrandepolarisation. Je nach Ausmaß der mitochondrialen Schädigung können vorübergehende metabolische Suppression bis hin zu Zellschwellung und Nekrose die Folge sein (Qureshi, Mendelow et al. 2009).

Der sekundäre Schaden kommt zustande durch periläsionales Ödem, Hämatomexpansion, durch auftretende Vasospasmen und den anfallenden zytotoxischen Substanzen um die Läsion (Mittal and Lackamp 2016). Innerhalb der ersten 12 Stunden nach ICB kann es zu Hämatomexpansion kommen; 35% der Patienten haben eine klinisch relevante Hämatomexpansion bereits innerhalb der ersten 3h nach ICB (Qureshi, Mendelow et al. 2009).

Intraventrikuläre Expansion des Hämatoms findet sich in nahezu der Hälfte der Patienten mit ICB, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Cusack, Carhuapoma et al. 2018).

Das periläsionale Ödem entsteht circa 3 Stunden nach ICB, nimmt innerhalb der ersten 24 Stunden um 75% zu und kann bis zu 14 Tage anhalten. Die Größe des Ödems ist assoziiert mit dem Läsionsvolumen der ICB, sowie mit niedrigem arteriellen Blutdruck und hohem Hämatokrit bei Aufnahme (Arima, Wang et al. 2009, Qureshi, Mendelow et al. 2009). In den ersten 3T nach ICB entsteht das periläsionale Ödem durch Austritt von Serum bei Aktivierung der Gerinnungskaskade und dadurch eintretenden erhöhtem hydrostatischen Druck. Ein verzögert auftretendes Ödem entsteht als Folge von oxidativem Stress, verursacht durch Komplementaktivierung, Zellyse, Produktion von Thrombin und Neuroinflammation, was wiederum zur Schädigung der BBB führt (Wang 2010, Mittal and LacKamp 2016). Der Einbruch der BBB kann potentiell auch durch den Ischämie-induzierten erhöhten ICP und damit verringerten CBF verursacht werden, dies wird jedoch kontrovers diskutiert, da in Tiermodellen und einigen Studien am Menschen der periläsionale CBF nicht so weit reduziert wird, dass eine Ischämie verursacht werden kann. Dies lässt annehmen, dass Blutbestandteile entweder direkt oder indirekt die Permeabilität der BBB nach ICB erhöhen können und sich die Mechanismen des Einbruchs der BBB von denen bei ischämischen Schlaganfällen unterscheiden. Der Volumeneffekt der Einblutung und eine konsekutive Obstruktion kann zur weiteren Erhöhung des ICP führen (Keep, Zhou et al. 2014, Mittal and LacKamp 2016).

Einerseits direkt durch die ICB als auch indirekt durch Einbruch der BBB kommt es zum Anfluten von Blutbestandteilen ins Hirnparenchym, welche im Normalzustand durch die geringe Permeabilität der BBB verhindert werden. Es akkumulieren Erythrozyten, Leukozyten, Makrophagen, Plasma Proteine, im und um das Schadensgebiet und induzieren inflammatorische Prozesse. So werden Proteasen, Mikroglia und Astrozyten aktiviert und der Gewebeschaden repariert. Dabei werden lokal Zytokine, Chemokine, Prostaglandine, Eisen und andere immunoaktive Moleküle ausgeschüttet, die maßgeblich zum sekundären Schaden beitragen (Wang 2010).

Mikroglia sind die Effektorzellen der Immunreaktion im ZNS und können, als Quelle von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Effekte haben, je nach Ausmaß und Schwere der Hirnschädigung (Trepel 2004, van Rossum and Hanisch 2004).

Astrozyten sind sternförmige Gliazellen, die für Hirnfunktionen lebensnotwendig sind und eine wichtige Rolle bei verschiedenen Schaltkreisen einnehmen. Sie haben eine generelle strukturgebende Stützfunktion im ZNS, sind am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt und wirken mit ihren perivaskulären Fortsätzen entscheidend an der Ausbildung der BBB mit (Trepel 2004). Nach ihrer Aktivierung schütten sie verschiedene Neurotransmitter, wie Glutamat, Adenosintriphosphat (ATP), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und D-Serin aus, welche die

neuronalen Erregbarkeit und die synaptische Aktivität und Plastizität modulieren. Ebenso wie die Mikroglia werden Astrozyten nach einer ICB aktiviert und es kommt zu einer sogenannten reaktiven Gliose durch Proliferation und Erhöhung der Produktion der Intermediärfilamente glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Vimentin. Sie ersetzen damit das zugrunde gegangene Hirngewebe und es kommt zur „Glianarbe“, getriggert durch die Aktivierung des Thrombinrezeptors PAR-1 (Trepel 2004, Nicole, Goldshmidt et al. 2005, Wang 2010).

So kommt es einerseits zur Wundheilung, Regeneration der BBB und Begrenzung der zytotoxischen Inflammation, andererseits verhindert eine verstärkte Astroglie die Regeneration der Neuronen (Radulovic, Yoon et al. 2016).

2.2 Thrombin

2.2.1 Struktur und Synthese

Der Gerinnungsfaktor Thrombin (Faktor IIa) ist eine Serinprotease und wird in zirkulierendem Blutplasma aus der Vorstufe Prothrombin (Faktor II) freigesetzt.

Prothrombin besteht aus einer N-terminalen „Gla-Region“ (aus 10 γ -Carboxyglutamatresten) und zwei homologen „Kringel Domänen“ (aus je 8 Aminosäuren), die an das Thrombinmolekül gebunden sind. Thrombin besteht aus einer leichten A-Kette mit 49 Aminosäuren und einer schweren B-Kette mit 259 Aminosäuren, die über Disulfidbrücken von zwei Cystinresten verbunden sind. Es ist mit 39 Kilodalton (kDa) circa halb so groß wie das Prothrombinmolekül, das eine Masse von 71,6 kDa hat. Die aktive Region befindet sich in einer tiefen Rille, die sich durch das Protein zieht und aus den drei Aminosäuren Histamin, Aspartat und Serin besteht. Alle Funktionen von Thrombin (siehe 2.2.3) hängen von der proteolytischen Aktivität als Serinprotease ab – das Protein wird biologisch inaktiv, wenn dieser Bereich modifiziert wird. Thrombin besitzt eine hohe Substratspezifität verglichen mit anderen Serinproteasen, was an der strukturellen Enge und Tiefe der aktiven Region liegt, welche dadurch für Substrate schlechter erreichbar ist (Fenton 1986, Grand, Turnell et al. 1996)

Aus dem im Blut zirkulierenden Prothrombin wird der Prothrombinasekomplex gebildet, der weiterhin aus den aktivierten Faktoren X und V, sowie Kalzium und Membranphospholipiden besteht. Nach Bildung dieses Komplexes wird Prothrombin an zwei Stellen proteolytisch gespalten und Thrombin freigesetzt. Die Aktivierung von Prothrombin kann auf zwei potentielle Signalwege vonstatten gehen, je nachdem, welche der beiden proteolytischen Spaltungen als erstes geschieht. Bei alleinigem Vorhandensein von Faktor Xa erfolgt die Spaltung an Arg271 zuerst und die Spaltung an Arg 320 schreitet langsamer fort (siehe Abb. 1, linke Seite). Dabei entsteht das Fragment 1.2 und Prethrombin 2. Nach einer zweiten Spaltung an Arg 320 innerhalb von Prethrombin 2 entstehen die über Disulfidbrücken gebundene A- und B-Kette des Thrombinmoleküls. Sind jedoch neben dem Faktor Xa auch Faktor Va, Kalzium und Phospholipide vorhanden, spaltet die Prothrombinase zuerst an Arg320 und danach an

Arg271 (siehe Abb. 1, rechte Seite). Dabei entsteht als Intermediat das Meizothrombin, das bereits katalytische Aktivität zeigt. Dieser zweite Weg wird als der physiologische Weg betrachtet (Adams and Huntington 2016, Spiegel 2022). Verglichen mit Thrombin spaltet Meizothrombin PAR-1 und Fibrinogen langsamer, während der gerinnungsbegrenzende Signalweg über Protein C (APC) und Thrombomodulin durch Meizothrombin effizienter abläuft als durch Thrombin (Stojanovski, Pelc et al. 2018).

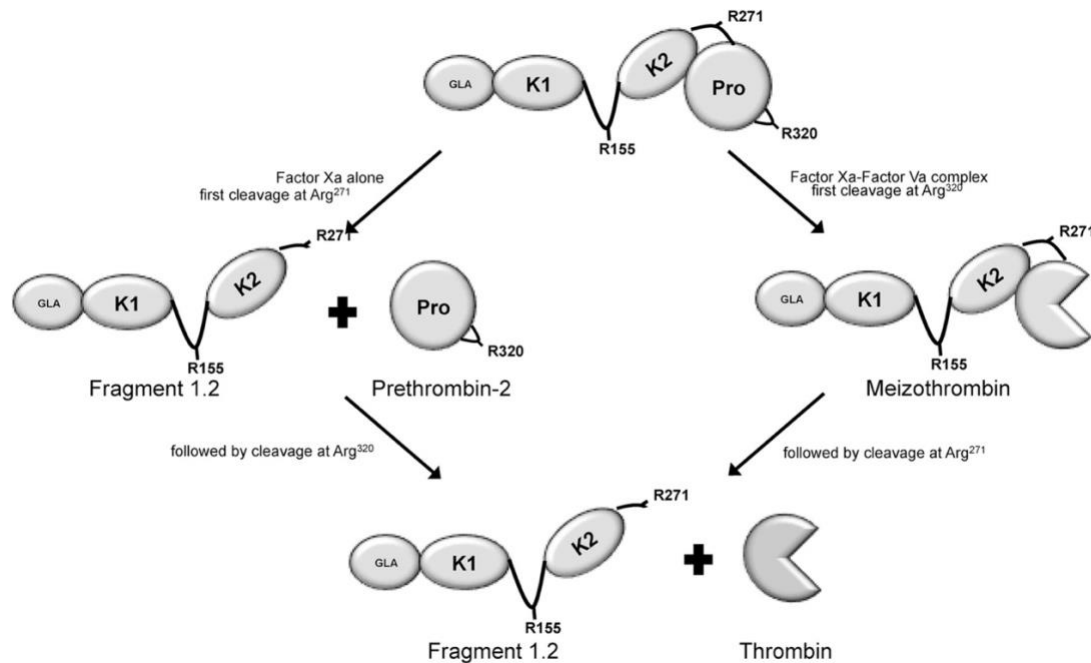


Abbildung 1: Aktivierung von Prothrombin (Adams and Huntington 2016)

Die proteolytische Spaltung von Prothrombin zu Thrombin erfolgt durch Spaltung an Arg 271 und an Arg 320. Links erfolgt bei alleinigem Vorhandensein von Faktor Xa zunächst die Spaltung an Arg271 und danach an Arg320, wodurch das aktive Thrombin freigesetzt wird. Rechts erfolgt bei Vorhandensein von Faktor Xa, Va, Kalzium und Phospholipiden die Spaltung zuerst an Arg320, wodurch das aktive Intermediat Meizothrombin frei wird, das nach der zweiten Spaltung an Arg271 Thrombin vom Fragment 1.2 freigesetzt. Die Kringeldomänen K1 und K2, sowie die Gla Domäne sind als Ovale dargestellt.

Gebildet wird Prothrombin wie die anderen Gerinnungsfaktoren in der Leber, wird im Anschluss ins Plasma abgegeben und zirkuliert mit einer Halbwertszeit von circa drei Tagen. Nach der Aktivierung zirkuliert Thrombin nur kurzzeitig im Plasma, da es von seinen Inhibitoren wie beispielsweise Antithrombin III, α 2-Makroglobulin oder α 1-Antiprotease gebunden und inaktiviert wird (Handin 2003).

2.2.2 Thrombinrezeptoren

Thrombinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, bestehen aus 425 Aminosäuren und enthalten 7 Transmembrandomänen. Das C-terminale Ende befindet sich intrazellulär, das N-terminale extrazellulär und dazwischen befinden sich je 3 intra- und extrazelluläre Schleifen (siehe Abb. 2). Zwischen LDPR und SFLL, den Aminosäuren 41 und 42, befindet

sich die Spaltstelle im humanen Protein PAR-1, die vergleichbar mit derjenigen von Protein C ist. Thrombin interagiert mit dem Rezeptor an zwei Stellen: direkt N-terminal zu Arg 41 und weiter C-terminal zwischen Aminosäure 53 und 64. An der ersten Bindungsstelle im Rezeptor wird die Spaltstelle erkannt, während die zweite dem C-terminalen Ende des Antikoagulans Hirudin ähnelt (in PAR-1 und PAR-3) und bei niedrigen Thrombinkonzentrationen wichtig ist. Ein Thrombinmolekül kann als Enzym mehrere PAR-1 aktivieren. (Grand, Turnell et al. 1996, Coughlin 2000, Wang and Reiser 2003).

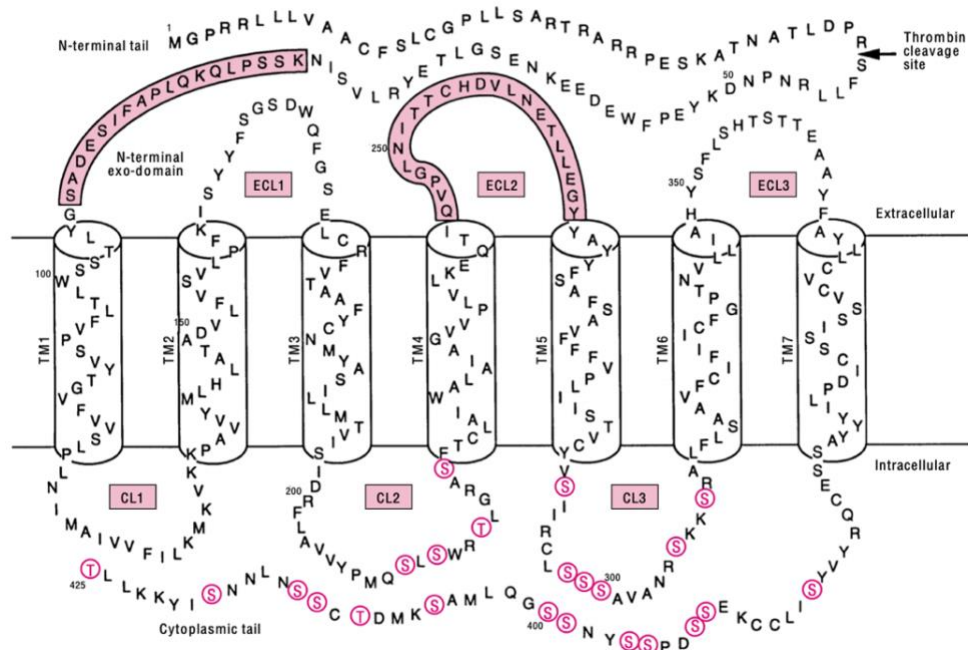


Abbildung 2: Struktur des Proteinase Activated Receptor-1 PAR-1 (Grand, Turnell et al. 1996)

Der Thrombinrezeptor PAR-1 mit den 7 Transmembrandomänen. Die mit Pfeil gekennzeichnete Spaltstelle von Thrombin, die 3 extrazellulären Schleifen (ECL) und die 3 intrazellulären Schleifen (CL) sind dargestellt. Potenziell intrazelluläre Phosphorylierungsstellen (eingekreiste Buchstaben in rosa) und Nummern der Aminosäurereste sind markiert. Die extrazelluläre Domäne, die mit dem N-terminalen Ende des Peptids interagiert, sind durch rosa Kästen um die Aminosäuren gekennzeichnet.

Es sind bisher beim Menschen und bei der Maus 4 unterschiedliche Rezeptoren bekannt. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 werden von Thrombin direkt aktiviert, während PAR-2 von Trypsin, Tryptase und den Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa aktiviert werden kann. PAR-1 wurde als erster Thrombinrezeptor identifiziert und stellt den Prototypen der PAR-Familie dar. Indirekt kann PAR-2 durch Thrombin-gespaltene PAR-1 aktiviert werden. Für die Aktivierung von PAR-4 durch Thrombin ist aufgrund des Fehlens der Hirudin-ähnlichen zweiten Bindungsstelle im Rezeptor eine deutlich höhere Thrombinkonzentration notwendig. In der ersten Phase der Gerinnung kann PAR-4 jedoch auch durch geringe Mengen an Thrombin aktiviert werden (Molino, Barnathan et al. 1997, Coughlin 2000, Wang and Reiser 2003, Martorell, Martínez-González et al. 2008, Sokolova and Reiser 2008).

PARs werden auf verschiedenen Zellen exprimiert, darunter fallen Endothelzellen, Epithelzellen, Myozyten, Thrombozyten, T-Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Vu, Hung et al. 1991, Ossovskaya and Bunnnett 2004, Martorell, Martínez-González et al. 2008). Humane Thrombozyten exprimieren PAR-1 und PAR-4, murine Thrombozyten PAR-3 und PAR-4, wobei PAR-3 als Cofaktor zur Spaltung und Aktivierung von PAR-4 bei niedrigen Thrombinkonzentrationen dient (Xu, Andersen et al. 1998, Kahn, Nakanishi-Matsui et al. 1999). Im ZNS wurde die Expression von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 in Neuronen identifiziert, sowie in Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen (Striggow, Riek-Burchardt et al. 2001, Matsuoka and Hamada 2002, Wang and Reiser 2003, Posma, Posthuma et al. 2016). Die Rezeptoren werden durch proteolytische Abspaltung des extrazellulären N-Terminus aktiviert. Dabei wird ein neuer N-Terminus frei, der selbst als Ligand fungiert und sich intramolekular mit der zweiten Schlinge des Rezeptors verbindet (siehe Abb. 3).

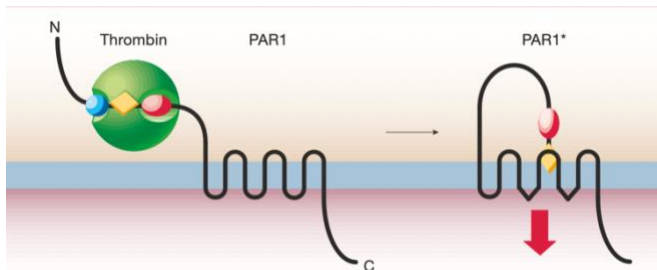


Abbildung 3: Aktivierung des Proteinase Activated Receptor-1 (PAR-1) (Coughlin 2000)

Mechanismus der PAR-1 Aktivierung. Thrombin (grüne Kugel) erkennt das N-terminale Ende des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-1. Diese Interaktion bedarf Kontakt mit Stellen sowohl am N-terminalen (blaue Kugel) sowie am C-terminalen (rotes Oval) Ende der Thrombin-Spaltstelle. Thrombin spaltet die Peptidbindung zwischen Arg 41 und Ser 42. So wird ein neuer N-Terminus frei, beginnend mit der Sequenz SFLLRN (gelber Rhombus), der als Ligand fungiert, intramolekular an die 2. Schleife bindet und die Signalkaskade initiiert.

Die Aktivierung ist irreversibel und initiiert durch Anlagerung an G-Proteine der Familien $G_{12/13}$, G_q und G_i verschiedene Signalwege. Durch den Signalweg über $G_{12/13}$ kommt es zu Rho-abhängigen Veränderungen des Zytoskeletts von Thrombozyten, zu Änderungen der Permeabilität und Migration von Endothelzellen. Die α -Untereinheit des G_q -Proteins führt über mehrere Schritte zu Kalziumausschüttung und Aktivierung der Proteinkinase C, wodurch es unter anderem zu Thrombozytenaggregation, Ausschüttung von Granula, Integrinaktivierung und Änderung der Transkription in Endothelzellen kommt. Die α -Untereinheit des G_i -Proteins hemmt die Adenylatzyklase, was wiederum über Rac1 zu Thrombozytenantworten und Barrierschutzfunktionen führt. Durch die $\beta\gamma$ -Einheiten der G-Proteine werden Phosphoinositol 3, sowie andere Proteinkinasen, Enzyme und Ionenkanäle aktiviert und so die Plasmamembran modifiziert (siehe Abb. 4). Durch PAR-1 wird der Epidermal growth factor receptor (EGFR) transaktiviert, wodurch es zu Zellwachstum kommt. Die Vielfältigkeit der

Signalwege, die durch die Aktivierung von PARs induziert werden, zeigt, wie umfassend die Wirkung von Thrombin auf Zellen ist (Coughlin 2000, Wang and Reiser 2003, Martorell, Martínez-González et al. 2008)

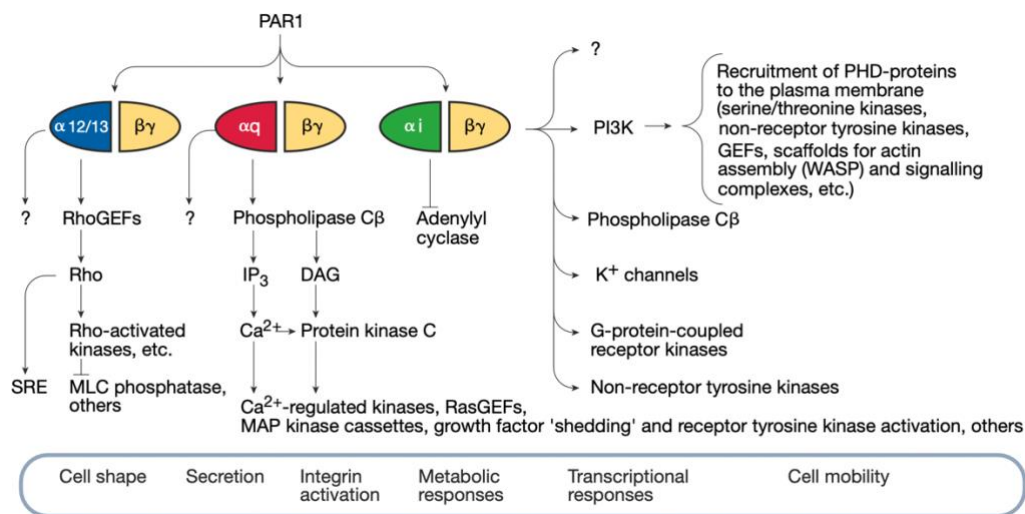


Abbildung 4: Signalkaskade des Proteinase Activated Receptor-1 PAR-1 (Coughlin 2000)

Über PAR-1 wird eine Vielzahl an verschiedenen intrazellulären Signalwegen aktiviert. Hierfür bindet der durch Thrombin aktivierte PAR-1 Rezeptor zunächst als Heterodimer an Mitglieder der G12/13-, Gq- und Gi-Familie

Im Anschluss an die Aktivierung wird der Rezeptor durch Phosphorylierung durch eine Rezeptortyrosinkinase inaktiviert. Der Rezeptor wird internalisiert, ein Großteil der inaktivierten Rezeptoren werden in Lysosomen abgebaut, während ein kleiner Teil wiederverwendet und zur Zelloberfläche transportiert werden kann. Recycelte Rezeptoren können von Thrombin kein zweites Mal aktiviert werden, jedoch von exogenen Peptiden, die durch proteolytische Spaltung der N-terminalen Region durch den Liganden Thrombin aktiviert werden. Neue Rezeptoren werden im Golgi-Apparat synthetisiert und an die Zelloberfläche transportiert. Einige Rezeptoren werden für die schnelle Aktivierung intrazellulär gespeichert (Hoxie, Ahuja et al. 1993, Grand, Turnell et al. 1996).

2.2.3 Funktionen von Thrombin

Thrombin ist ein multifunktionelles Protein, welches sowohl zentrale Funktionen im Gerinnungssystem übernimmt, als auch an zahlreichen nicht-hämostaseologischen Prozessen beteiligt ist.

In der primären Hämostase, in der es nach einer Verletzung zu einer thrombozytären Blutstillung kommt, ist Thrombin bei der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt. Dies wird über PAR-1 und PAR-4 vermittelt und Thrombozyten werden dadurch zur Aggregation und Sekretion von Signalmolekülen gebracht. In der sekundären Hämostase stellt Thrombin das Schlüsselenzym dar. Die intrinsische und extrinsische Gerinnungskaskade münden beide in

der Aktivierung von Thrombin, welches wiederum Fibrinogen in Fibrinmonomere spaltet. Durch die Aktivierung von Faktor XIII stimuliert Thrombin die Verlinkung der Fibrinmonomere, wodurch der rote, unlösliche Gerinnungsthrombus entsteht. Außerdem aktiviert Thrombin seinerseits die Faktoren V, VIII, XI und führt damit zu einem positiven Feedback der Gerinnungskaskade. Thrombin limitiert selbst die Gerinnungskaskade durch die Bildung eines Komplexes mit Thrombomodulin. Dadurch wird die Plasmakonzentration von freiem Thrombin reduziert, sowie Protein C aktiviert, das wiederum der zentrale Inhibitor von den Faktoren V und VIII ist.

Neben dieser zentralen Funktion in der Gerinnungskaskade werden zunehmend Funktionen von Thrombin im Bereich Inflammation, Zellprotektion und Apoptose bekannt. So können durch Thrombin zelluläre Reaktionen von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen hervorgerufen werden. Thrombin führt zu Formänderung von Endothelzellen und Erhöhung der Permeabilität von Endothelzellschichten (Grand, Turnell et al. 1996, Coughlin 2000, Steinhoff, Buddenkotte et al. 2005).

Thrombin kann sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Prozesse initiieren (Ossovskaya and Bunnett 2004). Zu den proinflammatorischen Prozessen zählen unter anderem die PAR-1-vermittelte Stimulierung von Endothelzellen und Fibroblasten zur Produktion von Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Foley and Conway 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Thrombin als C5-Konvertase fungieren und somit das Komplementsystem, ein Teil des unspezifischen Immunsystems, aktivieren kann (Rittirsch, Flierl et al. 2008). Pro-interleukin-1 α kann durch Thrombin direkt gespalten und in das aktive Interleukin-1 α überführt werden, wodurch ein Mitwirken von Thrombin an inflammatorischen Prozessen und an der physiologischen Wundheilung weiter sichtbar wird (Burzynski, Humphry et al. 2019). Ferner führt Thrombin zu Chemotaxis von Monozyten, reguliert die Zytokinproduktion in Fibroblasten und regt die Zellteilung von Lymphozyten und mesenchymalen Zellen an (Coughlin 2000, Danckwardt, Hentze et al. 2013). Dies verdeutlicht die direkte Verbindung zwischen dem Immunsystem und dem Gerinnungssystem.

Antiinflammatorische und gerinnungsbegrenzende Prozesse durch Thrombin werden zum Beispiel durch APC erreicht, eine Serinprotease, die übermäßige Aktivierung von Gerinnung und Inflammation verhindert. APC blockiert in Anwesenheit von PAR-1 und Endothelial-protein-C-Receptor (EPCR) die p53-vermittelte Apoptose. Weiterhin reduziert APC die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine und hemmt die Aktivierung und Chemotaxis von Neutrophilen. Thrombomodulin fungiert dabei als biologischer Schalter und entscheidet, ob Thrombin prokoagulatorisch und proinflammatorisch oder antikoagulatorisch und antiinflammatorisch wirkt (Foley and Conway 2016).

Auch der Tonus von Gefäßen durch Proliferation von glatten Muskelzellen wird von Thrombin beeinflusst. Durch direkte Aktivierung des PAR-1 auf glatten Gefäßmuskelzellen kommt es zu

Vasokonstriktion in Venen, während die Aktivierung von PAR-1 auf Endothelzellen eine Vasodilatation in Arterien zur Folge hat (McNamara, Sarembock et al. 1993, Alberelli and De Candia 2014).

Die Wirkung von Thrombin auf PAR-vermittelte Signalwege ist abhängig von der Konzentration von Thrombin sowie von der Expositionsdauer. Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen von Thrombin, sowie eine kurze Expositionsdauer zellprotektive Effekte haben.

Bei hohen Konzentrationen wird, über die $G_{12/13}$ und Gq - Signalwege vermittelt, die Barrierefunktion der Endothelzellen gestört, es kommt zu erhöhter Permeabilität und Transsudation von Plasmaproteinen sowie zur Ausbildung eines Ödems (Coughlin 2000, Feistritzer and Riewald 2005). Die hohe Thrombinmenge führt zu schnellerer Aktivierung des PAR-1 und damit zu schnellerer Erhöhung der RhoA Aktivität in der Zelle, wodurch eine stärkere Signalantwort erreicht wird. So kommt es zur Apoptoseinduktion, während bei niedrigen Konzentrationen eine langsame und konstante Erhöhung protektive Effekte auf die Zelle hat, vermittelt über den G_i -Signalweg durch Hemmung der Adenylatzyklase und Rac1. Dadurch kommt es zur Stabilisierung der Endothelzellen (Shlobin, Har-Even et al. 2021).

Auch die Expositionsdauer von Thrombin spielt eine Rolle, kurze Exposition führt zu Initiation zellprotektiver Signalwege, während für die Apoptoseinduktion hohe Expositionsdauer und hohe Thrombinkonzentrationen notwendig sind (O'Brien, Molino et al. 2001, Posma, Posthuma et al. 2016). Die Signalwege der Thrombin-induzierten Apoptose sind divers und hängen vom Zelltyp ab. Alle bisher untersuchten Signalwege münden jedoch auf unterschiedlichen Wegen in der Aktivierung von Caspase 3, einem zentralen Protein in der Endphase der Apoptose (Wu, Zhang et al. 2011).

2.2.4 Rolle von Thrombin im ZNS

Physiologischerweise kann Thrombin aufgrund seiner Größe die BBB nicht passieren. Zu einem Anstieg an Thrombin im Parenchym des ZNS kommt es einerseits durch eine gestörte BBB nach Pathologien wie zum Beispiel Schädel-Hirn-Traumata (SHT), Epilepsien oder ICBs (Ben Shimon, Zeimer et al. 2017). Im Ischämiemodell konnte durch Doppelfärbungen von Thrombin mit Neuronen, Astrozyten und Mikroglia eine Kollokalisierung von 65% von Thrombin mit Neuronen, 10% mit Gliazellen und 15% mit Mikrogefäßen gezeigt werden (Chen, Friedman et al. 2012). Dabei wurde in Bereichen mit Gefäßschädigungen das meiste Thrombin nachgewiesen, was einen vaskulären Ursprung des Thrombins nahelegt. Andererseits deutet das Vorhandensein von Prothrombin-mRNA, Prothrombin und Thrombin in Neuronen und Gliazellen im gesunden menschlichen Gehirn auf eine lokale Bildung hin (Dihanich, Kaser et al. 1991, Arai, Miklossy et al. 2006).

Auch bei bestimmten Pathologien mit intakter BBB lässt sich ein Thrombinanstieg nachweisen, was die lokale Produktion nahelegt (Ishida, Nagai et al. 2006, Sokolova and Reiser 2008). Nicht nur Prothrombin, sondern auch die Thrombinrezeptoren werden im ZNS von Nagetieren und Menschen in sowohl Neuronen als auch Gliazellen exprimiert. PAR-1 wurde in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia identifiziert. Thrombin-regulierende Proteine, wie der Prothrombinaktivator Faktor X und die Thrombininhibitoren Protease Nexin-1 (PN-1), Antithrombin III und Thrombomodulin werden ebenfalls lokal im ZNS produziert. PN-1 ist im menschlichen Gehirn um die Blutgefäße herum lokalisiert, um Thrombin nach seiner Extravasation bei Zusammenbruch der BBB zu inhibieren (Deschepper, Bigornia et al. 1991, Niclou, Suidan et al. 1998, Striggow, Riek-Burchardt et al. 2001, Sokolova and Reiser 2008). Das Vorhandensein von Thrombin, seinen Rezeptoren und Regulatoren im ZNS und deren Veränderungen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zeigt die bedeutende Rolle von Thrombin im ZNS.

Unter physiologischen Bedingungen ist Thrombin in der synaptischen Plastizität und Transmission im ZNS wichtig (Ben Shimon, Lenz et al. 2015). Die Aktivierung von PAR-1 zeigt Effekte in der Funktion *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, die für das Lernen und das Gedächtnis wichtig sind (Almonte, Hamill et al. 2007). Dazu passend konnte nachgewiesen werden, dass eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen mit Veränderungen der PAR-Expression und Thrombinmenge intrazerebral assoziiert sind. So zeigen Patienten mit Parkinson oder Alzheimer erhöhte Mengen an aktiviertem Thrombin und PAR-1 (Sokolova and Reiser 2008). Die Thrombin-induzierte Aktivierung von Mikroglia führt durch Ausschüttung von diversen proinflammatorischen Mediatoren und Sauerstoffradikalen zu neuronalem Zelltod. Oxidativer Stress und inflammatorische Reaktionen sind mit Apoptose der dopaminergen Neurone assoziiert. Thrombin wurde in erhöhten Mengen in Hirngewebe von Patienten mit Demenz vom Alzheimer-Typ in senilen Plaques, Amyloidablagerungen und *neurofibrillary tangles* nachgewiesen (Akiyama, Ikeda et al. 1992, Arai, Miklossy et al. 2006). In Parkinson-erkrankten Hirnschnitten und -kulturen konnte ein Anstieg der PAR-1- und Prothrombin-Expression in Astrozyten und eine erhöhte Menge an thrombinpositiven Gefäßwänden ohne direkten Nachweis eines BBB-Zusammenbruchs gemessen werden (Ishida, Nagai et al. 2006). Dies unterstützt weiter die These, dass erhöhtes Thrombinaufkommen auch bei intakter BBB zustande kommen kann.

Bei traumatischen Hirnschädigungen, Ischämien und hämorrhagischen Schlaganfällen ist Thrombin bei der Schadensvermittlung involviert (Shlobin, Har-Even et al. 2021). Nach zerebralen Blutungen wird Thrombin im Plasma aktiviert und die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt, um die Hämatomexpansion zu limitieren. Jedoch konnte *in vivo* gezeigt werden, dass bei Induktion einer ICB allein durch den Volumeneffekt auch in Abwesenheit von Blutprodukten

Thrombin freigesetzt wird und ein vergleichbarer Zellschaden entsteht. Bei der Hochregulierung der intrazerebralen Thrombinsynthese spielten insbesondere Neuronen eine Rolle. (Krenzlin, Gresser et al. 2020). Dass es nach zerebralem Schaden zum Anstieg der Thrombinmenge kommt und diese mit neuronalem Schaden und dem neurologischem Outcome korreliert, konnte in unterschiedlichen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Nach SHT beispielsweise steigt die Thrombin- und PAR-1-Menge messbar an und posttraumatische Amnesien zeigen sich rückläufig, wenn die Thrombinaktivität im Hippocampus sich normalisiert hat (Itsekson-Hayosh, Shavit-Stein et al. 2016, Ben Shimon, Zeimer et al. 2017). Auch nach zerebralen Ischämien kann ein Anstieg von Thrombin durch Hochregulation der Prothrombinexpression beobachtet werden und die Aktivität von Thrombin ist vor allem im Zentrum der Ischämie messbar erhöht (Riek-Burchardt, Striggow et al. 2002, Xi, Reiser et al. 2003). Bei den Untersuchungen Bushi et al. korrelierte die erhöhte Thrombinaktivität direkt mit dem Infarkt volumen (Bushi, Chapman et al. 2013). Dabei ließ sich ebenfalls in kontralateralen Hemisphären des geschädigten Gehirns eine erhöhte Thrombinmenge nachweisen, was durch Diffusion von Thrombin aus dem Ischämiezentrum über das Blut oder durch das Hirngewebe erklärbar ist.

Das Ausmaß des sekundären Schadens nach ICB oder fokalen Ischämien wird unter anderem durch das periläsionale Hirnödem definiert. Dies ist direkt mit erhöhter Thrombinmenge assoziiert und konnte durch verschiedene Thrombininhibitoren, wie Argatroban, Hirudin oder α -NAPAP, reduziert werden (Lee, Betz et al. 1996, Hua, Wu et al. 2003, Kitaoka, Hua et al. 2003, Bodmer, Vaughan et al. 2012). Thrombin induziert die Ausschüttung von VEGF aus Neuronen, und führt damit zur erhöhten Permeabilität von Endothelzellen an der BBB wodurch es zu anhaltender und gesteigerter periläsionaler Ödembildung kommt (Sarker, Yamahata et al. 1999, Wang and Reiser 2003). Durch intrazerebrale Injektion von Thrombin im Tiermodell konnte ein Zusammenbruch der BBB und dadurch ein weiterer Thrombinanstieg erzeugt werden (Liu, Ander et al. 2010). Der Zusammenbruch der BBB wird dabei durch Aktivierung der Src Kinasen und dadurch Phosphorylierung von Matrixmetalloproteinen und Tight junctions, Bestandteile der Extrazellulären Matrix der BBB, sowie verstärkter Induktion von VEGF vermittelt (Xue, Hollenberg et al. 2009, Liu, Ander et al. 2010).

Experimente zeigen, dass Thrombin abhängig von seiner Konzentration im Gehirn sowohl neuroprotektive, als auch neurotoxische Effekte haben kann.

Geringe Thrombinkonzentrationen haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* schützende Wirkungen auf die Zelle und das Gewebe. So schützten geringe Thrombinmengen in Zellkulturen Astrozyten und Neuronen vor Schädigung durch Hypoglykämie und oxidativem Stress (Vaughan, Pike et al. 1995). Diese Wirkungen wurden über den PAR-1 vermittelt und konnten durch den Einsatz des Thrombininhibitors PN-1 limitiert werden. Hohe

Thrombinmengen führten jedoch zu Zelltod der Neuronen und Astrozyten unter physiologischen Bedingungen. Bei Ischämieexposition hippocampaler Neuronen in Hirnschnitten der Ratte führte eine geringe Thrombinmenge zu Neuroprotektion, hohe reduzierten das neuronale Überleben und sehr hohe Konzentrationen induzierten direkten Zelltod (Striggow, Riek et al. 2000). Durch niedrigdosierte Thrombinbehandlung vor einer Schädigung durch hohe Thrombindosen konnte *in vitro* eine Reduktion des neuronalen Zelltods erreicht werden. Das sogenannte *thrombin preconditioning* wird über Aktivierung des p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwegs vermittelt, wodurch unter anderem die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1) hochreguliert wird. Dies induziert wiederum die Hochregulation des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) und der Hämoxygenase-1. PAI-1 ist ein weiterer physiologischer Thrombininhibitor, der nach ICB hochreguliert wird und seinerseits den tissue type plasminogen activator (tPA) hemmt, wodurch neuroprotektive Wirkungen erreicht werden. Hämoxygenase-1 ist ein Hitzeschockprotein (HSP), das für den Abbau des toxischen Hämoglobins wichtig ist (Hua, Xi et al. 2002, Jiang, Wu et al. 2002, Xi, Reiser et al. 2003, Hua, Keep et al. 2009). Weitere Hitzeschockproteine, die durch Thrombin hochreguliert werden sind beispielsweise HSP 27, das der Stabilisierung des Zytoskeletts dient und HSP47, das möglicherweise durch Einwirken auf die Extrazellulärmatrix neuroprotektive Effekte hat (Xi, Reiser et al. 2003). Im Tiermodell zeigten sich ebenfalls protektive Eigenschaften durch *thrombin preconditioning* vor Induktion einer ICB und resultierte in reduziertem Hirnödem (Jiang, Wu et al. 2002).

Thrombin hat hauptsächlich über PAR-1 einen regulatorischen Einfluss auf die Morphologie von Neuronen und Astrozyten. Es führt in geringen Konzentrationen zu Proliferation von Mikroglia und Astrozyten, Retraktion von Axonen, Dendriten und Gliazellfortsätzen und hat damit einen neuroprotektiven Effekt. Dies wird, wie bei den Thrombozyten, über den GTP-bindenden Rho-A Signalweg vermittelt und führt zur Reorganisation des Zytoskeletts. Verstärkte Aktivierung der Astrozyten durch erhöhte Thrombinmenge führt jedoch zur vermehrten Narbenbildung und somit zu verringerter axonaler Regeneration nach zerebralem Schaden. Weiterhin stimuliert Thrombin in niedrigen Konzentrationen die Synthese und Sekretion von β -NGF (nerve growth factor) und Endothelin-1 aus Gliazellen und trägt somit zu Reparatur- und Anpassungsvorgängen bei (Rudge and Silver 1990, Pai, Mahajan et al. 2001, Xi, Reiser et al. 2003, Hua, Keep et al. 2009).

Hohe Thrombinkonzentrationen, wie sei bei der ICB auftreten, zeigen neurotoxische Effekte durch Elimination von polyneuronalen Synapsen und Apoptoseinduktion. Die Thrombin-induzierte Aktivierung des GTP-bindenden Proteins RhoA-Signalweges führt zu DNA-Spaltung, Zellkernfragmentierung und Hemmung der Proteinsynthese. (Donovan, Pike et al. 1997). Durch Applikation von hohen Thrombinkonzentrationen in Striatum-Zellkulturen im Hirnschnittmodell konnte eine Verkleinerung des Gewebes gemessen werden, wobei der neuronale Zelltod verzögert, nach 3T aufgetreten ist (Fujimoto, Katsuki et al. 2006). Neben der

PAR-1-vermittelten Zytotoxizität bei hoher Thrombinkonzentration scheinen auch PAR-1-unabhängige Signalwege eine Rolle zu spielen. So konnte die Aktivierung verschiedener MAPK-Signalwege, die beispielsweise die Kinasen der Januskinase- oder Src-Familie oder Proteinkinase C involvieren, bei der Induktion von neuronalem Zelltod nachgewiesen werden (Fujimoto, Katsuki et al. 2006).

Auch bei neuroinflammatorischen Prozessen, die nach ICB auftreten, kann eine Beteiligung von Thrombin gesehen werden. Über die Aktivierung von Mikroglia vermittelt Thrombin die Expression einer Reihe an proinflammatorische Faktoren, so wie NO, IL-6, IL-1 α , IL-1 β und TNF α . Die Ausschüttung von TNF- α wird durch IL-10 inhibiert, dessen Expression wiederum durch Thrombin induziert wird. So wird deutlich, dass Thrombin sowohl bei proinflammatorischen als auch bei immunsupprimierenden Vorgängen im Sinne eines negativen Feedbacks im ZNS eine Rolle spielt (Kim, Kim et al. 2002, Sokolova and Reiser 2008). Über PAR-4 führt Thrombin in Mikroglia neben der Ausschüttung von TNF- α auch zur Aktivierung des NF κ -B Signalwegs und damit zu inflammatorischen Prozessen in diesen Zellen (Ossovskaya and Bunnett 2004). Durch Injektion von Thrombin kommt es zur Hochregulierung von TNF- α und somit zu einer fortschreitenden Neurodegeneration und –inflammation (Hua, Wu et al. 2006).

Diese vielseitigen schädlichen Effekte von hohen Thrombinkonzentrationen im ZNS legen nahe, dass durch medikamentöse Inhibition von Thrombin bei ICB ein neuroprotektiver Einfluss auf den sekundären Schaden erreicht werden könnte.

2.3 Argatroban

Das Medikament Argatroban ist ein direkter Thrombininhibitor (DTI), das zur Behandlung von peripher vaskulären Erkrankungen erstmals 1990 in Japan eingeführt wurde. In den USA ist das Antikoagulans seit 2000 zur Prophylaxe und Therapie von Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) II, sowie seit 2002 zur Antikoagulation während einer perkutanen koronaren Intervention bei Patienten mit einer HIT oder mit erhöhtem Risiko für eine HIT zugelassen (Kikelj 2003). In Deutschland ist das Medikament seit 2005 für die HIT II zugelassen. (Kemkes-Matthes 2006). Die HIT II entsteht durch eine Heparin-induzierte Bildung von Antikörpern, die sich gegen Komplexe aus Heparin und Plättchenfaktor IV richten und zu thromboembolischen Ereignissen und Verbrauch von Thrombozyten führt.

Argatroban ist ein Abkömmling von L-Arginin und mit einer Molekülmasse von 509 g/mol das kleinste unter den direkten Thrombininhibitoren (siehe Abb. 5). Es bindet direkt an das katalytische Zentrum von Thrombin, wobei diese Bindung schnell erfolgt sowie selektiv und reversibel ist. Die Hemmung erfolgt in vergleichbarem Ausmaß an löslichem, wie an Fibrin-gebundenem Thrombin, anders als bei dem DTI Hirudin, bei dem die Bindung an thrombusgebundenem in Vergleich zu löslichem Thrombin deutlich geringer ist (Hursting, Alford et al. 1997).

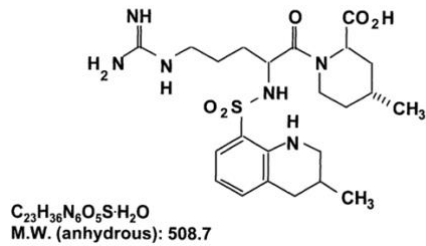


Abbildung 5: Chemische Struktur von Argatroban (Hursting, Alford et al. 1997)

Aufgrund der hoch alkalischen funktionellen Gruppe kann Argatroban nicht über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen, sondern ausschließlich parenteral verabreicht werden (Kikelj 2003). Argatroban wird in der Leber über Cytochrom-P450-Enzyme metabolisiert und biliär ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 52 ± 16 min nach intravenöser Gabe und nach 1-3 Stunden wird eine Steady State erreicht (Hursting, Alford et al. 1997, Kemkes-Matthes 2006).

2.4 DTI und Neuroprotektion

Verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* konnten neuroprotektive Effekte durch die Hemmung von Thrombin oder seines Rezeptors PAR-1 zeigen. In Kulturen von Striatumzellen der Ratte konnte durch Argatroban die Thrombin-induzierte Schrumpfung des Gewebes blockiert werden. Gleiches zeigte sich durch die Applikation von PAR-1-Antagonisten, was einen PAR-1-abhängigen Signalweg der Zytotoxizität nahelegt. In kortikalen Neuronen jedoch konnte Argatroban nur teilweise den Thrombin-induzierten Zelltod reduzieren und PAR-1-Antagonisten zeigten keinen Effekt, sodass deutlich wird, dass Thrombin gleichzeitig über PAR-unabhängige Signalwege zellschädigende Wirkungen aufweist und in unterschiedlichen Hirnarealen andere Signalwege involviert sind (Fujimoto, Katsuki et al. 2006). Die PAR-1 Expression wird durch hohe Konzentrationen von Thrombin stimuliert. Nach ICBs oder intrazerebralen Injektionen von Thrombin kommt es zur Hochregulierung der PAR-1-Expression, während durch systemische Gabe von Argatroban die PAR-1-Expression gesenkt werden kann (Zhou, Qu et al. 2011).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Reduktion des periläsionalen Ödems nach zerebralem Schaden durch Thrombininhibition erreicht werden kann. Das Zeitfenster der Applikation des DTI ist dabei von großer Bedeutung, da eine verzögerte Behandlung nach 24h keinen Effekt zeigte (Kitaoka, Hua et al. 2003, Nagatsuna, Nomura et al. 2005, Li, Fan et al. 2014). Argatroban hat dabei einen positiven Einfluss auf den Zusammenhalt der BBB durch Erhalt der Expression von tight-junction-Proteinen wie zona occludens-1 (Sugawara, Jadhav et al. 2009). Das Hämatomvolumen wurde dabei durch die Behandlung mit DTI nicht verändert. Lokale inflammatorische Prozesse, die durch ICB hervorgerufen werden, wie periläsionale Leukozyteninvasion, konnten ebenso durch Argatroban reduziert werden

(Nagatsuna, Nomura et al. 2005). Mit seiner Funktion als C5-Konvertase trägt Thrombin zu unkontrollierter Inflammation und sekundärem Schaden nach ICB bei, was durch Argatrobangabe limitiert werden konnte (Li, Fan et al. 2014) und die Expression von inflammatorischen Markern wie IL-1 β konnte durch die Behandlung reduziert werden (Sugawara, Jadhav et al. 2009). Auch die Thrombin-induzierte VEGF-Ausschüttung aus Neuronen und Thrombozyten, die eine erhöhte Permeabilität und damit gesteigerter Ödembildung zur Folge hat, konnte durch die Gabe von Thrombininhibitoren gehemmt werden (Sarker, Yamahata et al. 1999). Thrombin-induzierter Gefäßschaden und neuronaler Zelltod konnte durch Argatrobangabe reduziert werden (Chen, Friedman et al. 2012), sowie ein verbessertes neurologisches Outcome im Tiermodell beobachtet werden (Sugawara, Jadhav et al. 2009). Nach Hervorrufen von zerebralen Ischämien konnte bei Argatroban-behandelten Tieren eine höhere Überlebensrate, ein besseres neurologisches Outcome, eine schnellere Erholung des CBF nach Reperfusion sowie eine Reduktion des neuronalen Schadens, verglichen mit der Placebogruppe, gemessen werden (Ohyama, Hosomi et al. 2001). Auch beim Menschen konnte ein neuroprotektiver Effekt durch Thrombininhibition mit Argatroban werden. So wurde in einer kleinen klinischen Studie durch intravenöse Behandlung mit Argatroban nach ICB ein reduziertes periläsionales Hirnödeme beobachtet (Hamada and Matsuoka 2000). In der Metaanalyse von Hou et al. konnte gezeigt werden, dass durch die Infusion von Argatroban bei Schlaganfallpatienten das neurologische Outcome verbessert werden konnte, ohne das Risiko für gastrointestinale Blutungen, symptomatische oder asymptotische ICB und Mortalität zu erhöhen. Auch hier ist die Annahme, dass PAR-1-vermittelte neurovaskuläre Schäden durch die Thrombininhibition reduziert werden und neuroprotektive Effekte über die Reduktion von inflammatorischen Signalmolekülen (wie beispielsweise TNF- α , IL-6, und IL-1 β) durch die Gabe von Argatroban erzielt werden können (Hou, Jin et al. 2021).

In dieser Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen untersucht werden.

Erstens soll die Aktivierung von Thrombin nach Induktion von intrazerebralen Blutungen geprüft und die periläsionale Thrombinmenge gemessen werden.

Zweitens soll das Ausmaß des neuronalen Schadens im Sinne von quantitativem Nervenzelluntergang einerseits und andererseits anhand von neuromotorischen Tests der Tiere nach Intervention gemessen werden. Gleichzeitig wird eine mögliche Korrelation zwischen der Thrombinmenge und dem neuronalen Schaden analysiert.

Drittens soll untersucht werden, ob die Aktivierung des Thrombinsystems durch das Medikament Argatroban beeinflusst wird und ob die Behandlung zu einer Reduktion des neuronalen Schadens und zu einer Verbesserung des neurologischen Outcome der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation führt.

3. Material

3.1 Mäuse

Für die Versuche wurden 6 bis 8 Wochen alte, adulte, männliche C57BL/6J verwendet, die zu Beginn der Untersuchungen ein Gewicht von 20 bis 27g aufwiesen. Die Mäuse wurden von Charles River Laboratories in Deutschland bezogen. Es wurden jeweils vier Tiere pro Käfig 540cm² gehalten und artgerechte Bedingungen hergestellt. Dies wurde durch eine Raumtemperatur von circa 22 °C, eine Luftfeuchtigkeit von 55 bis 60% und ein Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden aufrechterhalten und täglich kontrolliert. Den Mäusen stand täglich frisches Wasser, artgerechtes Trockenfutter sowie Rückzugsmöglichkeiten zur Verfügung. Damit die Tiere sich nach dem Transport an die Bedingungen akklimatisieren konnten, wurde eine Eingewöhnungszeit von drei Tagen vor Beginn der Untersuchungen vorgenommen. Es wurde täglich das Gewicht der Tiere gemessen, sowie die Verhaltenstests durchgeführt und dokumentiert. Die Versuche wurden gemäß geltender Tierschutzbestimmungen und mit Genehmigung des Landesuntersuchungsamt von Rheinland-Pfalz durchgeführt. Hierfür wurde ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes beim Landesuntersuchungsamt im Januar 2018 gestellt und genehmigt. Bei Eintreten von definierten Ausschlusskriterien wurden Tiere aus dem Versuch genommen, diese werden in 4.6. aufgeführt.

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firma	Referenz
Cyro-Gel	Leica Microsystems Surgipath	Ref.: 39475237
Kleber Neg 50	Thermo Scientific	Ref.: 6502, LOT: 445033
Solidofic-Kältespray	Carl Roth GmbH + Co. KG	Art.-Nr. T200.1
Eukitt	O. Kindler GmbH	LOT: A1113
Eukitt	Sigma-Aldrich	PCode: 102237998
Xylol	Roth	Art.-Nr. 9713.3
Xylol	SAV Liquid Production GmbH	Nicht vorhanden
Sucrose	Sigma	LOT: SLBD2965V
Paraformaldehyd	Roth	Art.-Nr. 0335.3
Eosin	Merck	1.15935 Ch.B 0100, LOT: K23580925
Hematoxylin solution	Sigma life Science	51275-1L, LOT: BCBC3259

Isopropylalkohol 100%	Aug. Hedinger GmbH & Co.KG	Best.nr.: 5001
Ethanol 96% Ethanol abs.	SAV Liquid Production GmbH	Nicht vorhanden
H2O2	Merck	1.08600.1000
Methanol	J.T. Baker	8045 2,5L LOT: 0234510002
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma life Science	D1408
Ampuwa Spüllösung, Aqua dest.	Fresenius Kabi	Nicht vorhanden
Triton X-100	Merck	1.08603.1000
Donor Horse Serum 100ml	Biochrom AG	Cat. No. S 9133, LOT: 1050 A
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector	SK-4100
ImmPRESS TM R.T.U. Normal Horse Serum 2,5%	Vector	LOT: ZD0524C
ImmPRESS TM HRP Reagent Peroxidase Ant-Rabbit IgG	Vector	LOT: ZD0609
Peroxidase-Blocking Reagent	DAKO EnVision TM Flex	DM 821, LOT: 20073170
Substrate Buffer	DAKO EnVision TM Flex	DM 823, LOT: 20073596
DAB+ Chromogen	DAKO EnVision TM Flex	DM 827, LOT: 20084142
Citratpuffer pH 6 EnVision Flex TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (50x)	DAKO	REF: K8006
Aqua dest	Universitätsmedizin Mainz	Eigene Leitung
Antibody Diluent Envision Flex	DAKO	REF K8006

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

3.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma	Referenz
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific	J1800AMNZ
Deckgläser 24x60mm,	Knittel Glass	ISO 8255/1

Stärke 1		LOT KN00010042572
Apoptag Plastic CoverSlips	Merck Millipore	Bestell. Nr. S7117
Immun Edge Pen	Vector	Circa No. H-4000
Deckgläser	Knittel Glas	REFLD2450

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.4 Geräte

Gerät	Firma	Referenz
Cryostat CM1850 UV	Leica	Inventarnummer: 10152374
Mikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss	Inventarnummer: 10804223
Vortex-genie 2	Scientific industries	Model No. G560E
Analog Vortex Mixer	VWR	Barcode 90009079
Wärmeplatte	MEDITE	OTS 40.3040
Färbeautomat Autostainer 480S (Immunhistochemische Färbung)	Thermo Fischer, Epreidia	Inventarnummer: 101596771
Ganzdiascanner für Objektträger Nano Zoomer 2.0 HT	HAMAMATSU PHOTONICS K. K., Systems Division	Inventarnummer: 1017253
Dampfgarer	Braun	Barcode: 95088927

Tabelle 3: Geräte

3.5 Antikörper

Primärer Antikörper	Menge	Firma	Referenz	Lagerung
Mouse X Neuronal Nuclei (NeuN) clone A60	500µg (1mg/ml)	Merck Millipore	MAB 377 LOT: 1991263, 31519281 (BB)	Store at 2-8°C
Thrombin heavy chain Polyclonal	100 µl (1 µg/µl)	Bioss	Catalog # bs-1914R	Store at -20°C

Antibody Rabbit	Host				
Purified Anti-GFAP Cocktail	Mouse	0,5mg/ml	BD Biosciences	Cat:556330 LOT: 42548, 9352947 (BB)	Store at 4°C

Sekundärer Antikörper	Firma	Referenz	Lagerung
ABC Kit PK-6102 IgG Mouse	Vectastain	REF: PK-6102 LOT: ZG0211	Store at 2-8°C
MOM Kit, Immunodetection Kit, Peroxidase	Vector	REF: PK-2200, LOT: ZH0119	Store at 2-8°C
ImmPRESS TM HRP Reagent Anti-Rabbit IgG	Vector	LOT: ZD1107	Store at 2-8°C

Tabelle 4: Antikörper

3.6 Medikamente

Medikament	Firma
Isofluran	AbbVie
Bepanthen Augen- und Nasensalbe mit 5% Dexpanthenol	Bayer
Midazolam-hameln 5mg/ml	Hameln Pharmaceuticals GmbH
Dorbene vet Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml (10ml)	Zoetis
Tramadol-ratiopharm 100mg/2ml	ratiopharm
Atipamezol 5mg/ml	Alzane
Flumezenil 0,1mg/ml	hikma
Argatroban Inj. Lsg. 10mg/50ml, 0,2 mg/ml	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz

Tabelle 5: Medikamente

3.7 Software

Programm	Firma	Version
Word für Mac 2017	Microsoft ®	15.41 (171205)
Excel für Mac 2017	Microsoft ®	16.16.27 (201012)
EndNote X20.4	Glarivate TM	3092075443

NDP Viewer	Copyright © 2015 Hamamatsu Photonics	2.5
Fiji for macOS	ImageJ	Version 2.0.0-rc-69/1.52p
Prism 10 for macOS	GraphPad	10.1.0

Tabelle 6: Software

4. Methoden

4.1 Einteilung der Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 48 Versuchstiere untersucht. Um den Einfluss der Behandlungsdauer zu untersuchen, wurden 2 Behandlungsgruppen mit 25 und 23 Tieren gebildet. Die erste Gruppe wurde mit einem Überleben von 3T und die zweite mit einem Überleben von 7T untersucht, wobei jede Behandlungsgruppe weiter eingeteilt wurde in Tiere mit Induktion einer ICB und scheinoperierte Tiere. Diese Untergruppen wurde wiederum jeweils eingeteilt in Tiere mit und Tiere ohne Argatrobanbehandlung. Als Placebo wurde die gleiche Menge Natriumchlorid injiziert. Somit konnte bei den Behandlungsgruppen das Outcome der Tiere und die Immunhistologie im längeren zeitlichen Verlauf beobachtet und ausgewertet werden und der Effekt von Argatroban gesondert untersucht werden.

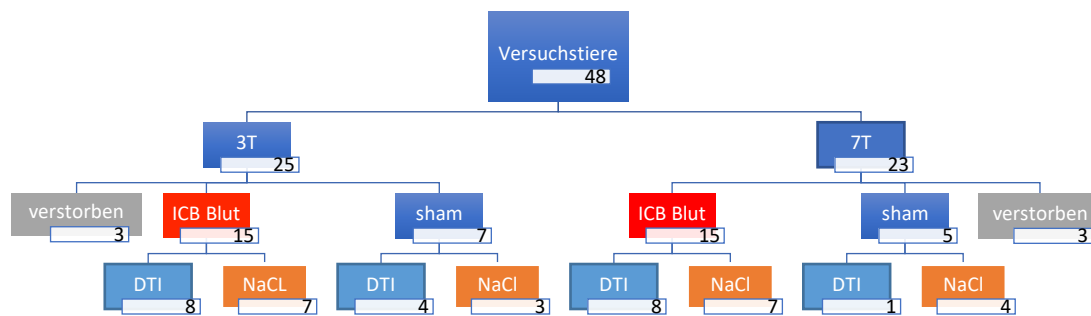


Abbildung 6: Einteilung der Versuchsgruppen (eigene Darstellung)

4.2 Verhaltenstests

4.2.1 Neurological Severity Score

Mit Hilfe des Neurological Severity Score (NSS) können Motorfunktionen der Mäuse standardisiert evaluiert werden. Der Test besteht aus 6 Aufgaben, die unter anderem motorische Fähigkeiten wie Koordination und Gleichgewicht untersuchen und motorische Defizite aufzeigen können (Shohami, Novikov et al. 1995). Die Aufgaben werden im Folgenden einzeln beschrieben (siehe Abb. 7a).

Aufgabe 1, Verlassen des Kreises: Die Maus wird in der Mitte eines gezeichneten Kreises gesetzt, der 30cm im Durchmesser misst, und es wird die Zeit gestoppt, bis die Maus die Begrenzungslinie überschreitet. Eine gesunde Maus ist geprägt von ihrem Suchinstinkt und wird innerhalb kurzer Zeit, unter 30 Sekunden, die Region erkunden wollen und sich aus dem Kreis heraus bewegen. Benötigt sie länger als 30 Sekunden, bekommt sie 1 Punkt, benötigt

sie länger als 60 Sekunden, bekommt sie 2 Punkte und benötigt sie länger als 120 Sekunden bekommt sie 3 Punkte.

Aufgabe 2 Reflexe: Hierbei werden 2 verschiedene Reflexe getestet, zum einen der Schreckreflex und zum anderen der Greifreflex. Beim Schreckreflex wird beobachtet, ob die Maus auf das Geräusch des Händeklatschens des Untersuchers reagiert. Beim Greifreflex wird beobachtet, ob die Maus einen Balken greift, wenn sie in die Nähe gebracht wird. Wenn die Reflexe nicht vorhanden sind, bekommt das Tier 1 Punkt.

Aufgabe 3, Allgemeines Verhalten: Hier wird das allgemeine Verhalten der Maus beobachtet. Dabei wird bewertet, ob sie ein Erkundungsverhalten zeigt und als nächstes, ob sie geradeaus läuft. Auch hier bekommt das Tier 1 Punkt, wenn ein Defizit vorhanden ist.

Aufgabe 4, Koordination: Bei diesem Test wird die Koordination des Tieres beim Laufen über Balken verschiedener Breite geprüft. Die Balken sind 3cm, 1,5cm und 1cm breit und jeweils 50cm lang. Zeigt die Maus beim Laufen Instabilität oder tritt sie daneben, bekommt sie 1 Punkt; fällt sie herunter oder läuft nicht mehr weiter, bekommt sie 2 Punkte.

Aufgabe 5, Gleichgewicht: Hier muss sich die Maus jeweils 10 Sekunden an einem viereckigen und anschließend an einem runden, 5mm messenden Holzstab halten ohne herunter zu fallen. Fällt sie vor dem Ablauf der 10 Sekunden herunter, bekommt sie 1 Punkt.

Aufgabe 6, motorische Defizite: Zeigt das Tier einseitige Parese, so bekommt es 1 Punkt, bei beidseitiger Parese bekommt es 2 Punkte.

Die Gesamtpunktzahl ergibt sich aus der Summe der Punkte einer jeden Aufgabe und gibt Auskunft über das neuromotorische Defizit der Maus. Die maximal erreichbare Punktzahl liegt bei 16 Punkten. Der NSS wurde bei der zu testenden Versuchsgruppe sowohl prä- als auch postoperativ täglich erhoben. Zusammen mit dem Rotarod-Test wurde der NSS täglich 3x pro Tier erhoben und die Summe gemittelt.

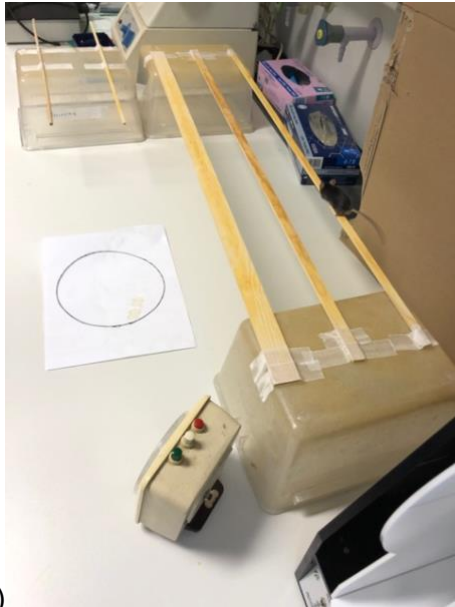
In der Literatur werden verschiedene Varianten des NSS beschrieben, sodass hier eine angepasste Version des NSS verwendet wurde, die sich von anderen NSS unterscheidet.

4.2.2 Rotarod

Durch die höhere Sensitivität können mithilfe des Rotarod-Tests auch leichte neuromotorische Defizite bei Tieren aufgezeigt werden, die bei dem NSS unauffällig geblieben sind (Hamm, Pike et al. 1994). Der Rotarod besteht aus einem sich mit zunehmender Geschwindigkeit drehenden Stab, auf den die Tiere gesetzt werden und mitlaufen müssen. Es gibt 5 Positionen, die durch Plastikwände voneinander abgetrennt sind (siehe Abb. 7b)). Die Geschwindigkeit steigt innerhalb von 5 Minuten von 4 auf 40 Umdrehungen/Minute. Es läuft außerdem eine Stoppuhr mit; die Messung beginnt, sobald das Tier aufgesetzt wird und ein Plastikhebel angehoben wird, wodurch die Beschleunigung startet. Fällt ein Tier herunter, so fällt es auf

den Plastikhebel, der damit die mitlaufende Zeit automatisch stoppt. Es wurden bei jedem Tier 3 Wiederholungen gemacht und täglich trainiert.

Die 3T-Gruppe sowie die 7T-Gruppe wurden jeweils 3T präoperativ trainiert, um die neuromotorische Funktion prä- zu postoperativ vergleichen zu können.



a)



b)

Abbildung 7: a) Neuroscore Aufbau b) Rotarod

a) Zeigt den Versuchsaufbau des Neuroscore mit Beam Walk rechts im Bild (3cm, 1,5cm und 1cm breite, 50cm lange Balken), Beam Balance (5mm breiter runder und viereckiger Balken) und Verlassen des Kreises links im Bild
b) Zeigt den Rotarod Leistungstest, Mäuse sind zur Wand ausgerichtet, um Störfaktoren zu minimieren.

4.3 Narkose und Operation

Die Tiere wurden für die Erzeugung der ICB in Narkose gelegt und es wurde dafür Midazolam (5mg/kg), Tramadolhydrochlorid (40mg/kg) und Medetomidin (0,5mg/kg) verwendet. Insgesamt wurde pro Gramm Körpergewicht 10µl Volumen intraperitoneal (i.p.) appliziert und fortan die Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex überprüft und wenn notwendig, durch eine weitere Gabe aufrechterhalten. Die Augen der Mäuse wurden mit Bepanthen-Augensalbe behandelt, um eine Austrocknung während er Narkose zu verhindern. Um die Maus im Stereotaxie-Rahmen zu fixieren, wurden die Fixierungsstäbe in die äußeren Gehörgänge eingespannt.

Für die Erzeugung der ICB wurden 30µl autologes Blut in die Basalganglien injiziert (siehe 6.1.1 ICB im Mausmodell). Das Blut für die ICB wurde aus der Schwanzvene entnommen, wobei mit dem Skalpell ein circa 2mm langer Schnitt erfolgte und mit der Kanüle das Blut aufgezogen wurde.

Das OP-Gebiet wurde mit einem alkoholischen Hautantiseptikum desinfiziert. Als nächstes wurde der Schädel für die Trepanation freigelegt, dazu wurde mit dem Skalpell ein circa 1,5cm langer longitudinaler Hautschnitt beginnend von dem Punkt zwischen den Augen nach kaudal

gezogen. Anschließend wurde der freigelegte Schädel mit 3% H₂O₂ desinfiziert. Die Bohrlochtrepanation erfolgte an den Koordinaten +1mm zu Bregma und 2mm lateral der medianen Sagittallinie auf der linken Hemisphäre. Um die ICB zu erzeugen, wurde bei jedem Tier insgesamt ein Volumen von 30µl autologen Blutes in die Region des Nucleus Caudatus der linken Hemisphäre injiziert. Die circa 0,45mm im Außendurchmesser messende Punktionskanüle wurde vorsichtig von der Kalotte aus 3mm senkrecht nach unten vorgeschoben und dort zunächst 5µl des zuvor aus der Schwanzvene entnommenen Blutes mit einer Geschwindigkeit von 10µl/min gleichmäßig appliziert. Anschließend wurde die Kanüle noch 1 mm weiter vorgeschoben, um die restlichen 25µl mit gleicher Geschwindigkeit zu applizieren. Die Kanüle wurde nach Inokulation weitere 10min belassen, bevor sie entnommen wurde. In der sham Gruppe wurde die Kanüle in gleicher zeitlicher Abfolge eingeführt, jedoch ohne Volumen zu applizieren.

Nach Entnahme der Kanüle wurden die Bohrlöcher mittels Acrylkleber verschlossen und die Wunde gereinigt. Die Haut mittels monofiler chirurgischer Naht der Stärke 4-0 verschlossen, das Tier aus dem Stereotaxie-Rahmen genommen und zum Erwachen zurück in den Käfig unter eine Rotlichtlampe gelegt, um einen Wärmeerhalt zu ermöglichen. Die Tiere wurden nach der Operation mit Atipamezol (750µg/kg KG) und Flumazenil (0,5mg/kg KG) antagonisiert und engmaschig überwacht. Postoperativ erhielten sie jeweils 0,5ml Kochsalzlösung (NaCl) i.p., um einen möglichen Flüssigkeitsverlust auszugleichen. Um eine suffiziente Schmerzlinderung zu erreichen erhielten die Tiere außerdem 2,5mg Tramadol pro 100ml Trinkwasser für die Dauer der Nachbeobachtung.

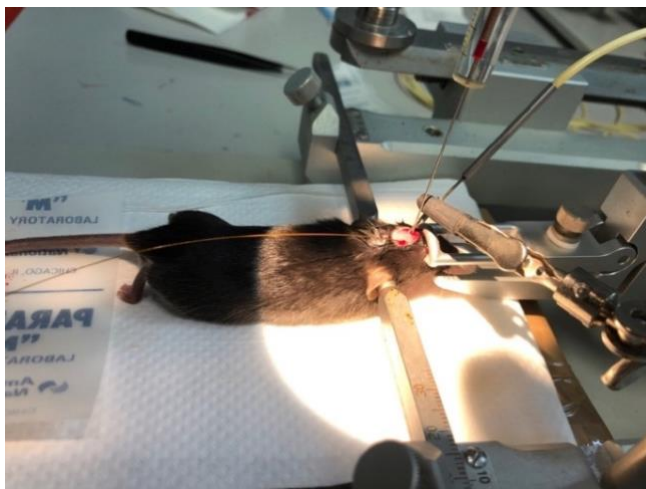


Abbildung 8: Operationsaufbau

Gezeigt ist der Operationsaufbau: der Schädel der Maus ist im Stereotaxierahmen eingespannt; über eine kleine Kraniektomie wurde die ICP-Messsonde angebracht, sowie die mit autologem Blut gefüllte Hamiltonnadel zur Induktion der ICB herabgelassen.

4.4 Intraoperatives Monitoring

Während der Operation wurden bei einer Versuchsgruppe folgende Parameter gemessen: Temperatur, Blutdruck (BP), Herzfrequenz (HF), Hirndruck (ICP), zerebraler Blutfluss (CBF) und zerebrales Blutvolumen (CBV).

Um die Temperatur zu messen wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt. Der Blutdruck wurde kontinuierlich, nicht-invasiv mittels am Schwanz anbrachten Cuff gemessen. Die Herzfrequenz wurde über ein 3-Pol Elektrokardiogramm (EKG) aufgezeichnet. Zur Messung des ICP wurde an einer anderen Stelle eine weitere Trepanation durchgeführt und die Sonde subkortikal platziert. Zur transkortikalen Messung des CBF wurde die entsprechende Sonde locker auf die Kalotte gelegt. Das CBV konnte über die CBF Sonde abgeleitet werden; alle 3 Parameter wurden kontinuierlich über die Dauer der Operation erhoben.

4.5 Behandlung mit Argatroban und Nachbeobachtung

Die Tiere der Argatroban-Gruppe bekamen das Medikament (9mg/kg KG) täglich bis zum Zeitpunkt der Euthanasie i.p. appliziert (Asanuma, Wakabayashi et al. 2004, Li, Fan et al. 2014). Die Gabe erfolgte 30 Minuten nach Operationsende. Die Tiere mit einem Überleben von 3T nach ICB erhielten 3 Argatroban-Gaben und die Tiere mit 7T-Überleben erhielten entsprechend 7 Gaben, jeweils zur gleichen Tageszeit. Die Menge wurde täglich dem gemessenen Körpergewicht eines jeden Tieres angepasst.

Die Versuchsgruppen wurden ab dem ersten postoperativen Tag nachbeobachtet und entsprechend dem präoperativen Training mittels Erhebung des Neuroscores und Rotarod-Testung beurteilt.

4.6 Ausschlusskriterien

Bei ersichtlichem Leiden der Tiere wurden anhand folgender Kategorien Punkte vergeben und die Belastung als gering, mittel oder hoch eingestuft: Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Atmung und versuchsspezifische Kriterien wie Wundheilungsstörungen oder neurologische Defizite. In jeder Kategorie konnten zwischen 0 und 20 Punkte vergeben werden; die Belastung galt als gering bis zu 9, als mittel bis zu 19 und als hoch ab 20 Punkten. Je nach Belastung wurden die Maßnahmen angepasst, diese beinhalteten mehrmals tägliches Beobachten der Tiere, Analgesie verabreichen, Flüssigkeit substituieren und Feuchtfutter anbieten. Bei hoher Belastung (20 oder mehr Punkte) wurde die sofortige Tötung des betroffenen Einzeltiers veranlasst durch zervikale Dislokation in tiefer Narkose.

4.7 Hirnentnahme und Probenaufbewahrung

Je nach Versuchsgruppe wurden die Mäuse 3T oder 7T nach der ICB-Operation euthanasiert. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran in tiefe Narkose gelegt und artgerecht euthanasiert mittels zervikaler Dislokation. Das gesamte Gehirn wurde anschließend vorsichtig mit einem

Dissektor entnommen, wobei die Entnahme auf einer Schale mit Trockeneis durchgeführt wurde. Unmittelbar nach Entnahme wurden das Hirn zur Fixation für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd gelegt und im Kühlschrank aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Hirne in 20% Sucrose gelegt, um das Wasser osmotisch zu entziehen und ebenfalls bei 4°C aufbewahrt, bis sie vollständig abgesunken waren. Nach spätestens 3T waren alle Hirne im Zentrifugenröhrchen abgesunken, sodass sie abgetrocknet und für die weiteren histologischen Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt werden konnten.

4.8 Schneiden und Färben

Die Maushirne wurden auf Trockeneis vom Tiefkühler zum Kryostaten transportiert, der auf -25°C vorgekühlt wurde. Zum Fixieren der Hirne auf der Objektplatte wurden sie mit Kleber befestigt, in Kryogel eingebettet und auf der Schnellgefrierleiste runtergekühlt, um Gefrierartefakte möglichst zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auch das Gel und der Tisch mit Eisspray eingesprüht. Es wurden Coronarschnitte der Dicke 10 μ m hergestellt und jeweils drei Schnitte pro Objektträger aufgenommen. Mit jedem geschnittenen Hirn konnte die benötigte Zahl an Schnitten angepasst und reduziert werden, sodass die Läsion und das periläsionale Gewebe vollständig abgebildet werden konnten. Es wurden aus jedem Hirn sechs bis acht Schnittserien hergestellt, zwischen denen jeweils 20 Schnitte verworfen wurden, um einen größeren Bereich abdecken zu können. Begonnen wurde bei +1,2mm Bregma, sodass der Bereich bis -0,87mm Bregma reichte. Die Position wurde regelmäßig mithilfe des Mausatlas verifiziert (Paxinos and Franklin 2003). Die Objektträger sowie die restlichen Hirne wurden bis zum Zeitpunkt der weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Von jedem Tier wurde jeweils der erste Objektträger einer jeden Serie für eine HE Färbung verwendet, um eine Übersicht über die Läsionsgröße und die periläsionale Region zu bekommen. Bei Bedarf beziehungsweise unzureichender Abbildung der Läsion konnten weitere Schnittserien erfolgen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde repräsentativ ein Objektträger aus der Mitte der Läsion genommen.

4.8.1 HE-Färbung

Nach dem Auftauen und Trocknen der Objektträger wurden sie in einen Küvettenhalter sortiert und für fünf Minuten in Hämatoxylin gehalten. Anschließend wurden sie für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Darauf folgte die Färbung mit Eosin durch Auf- und Abtauchen des Küvettenhalters für 20 Sekunden. Nachdem sie 10 Minuten in reinem Leitungswasser (Bläuen) gespült wurden, folgte ein Entwässerungsschritt mittels aufsteigender Isopropylalkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%). Die Objektträger wurden danach in Xylol gestellt, um die Schnitte zu klären und konnten im Anschluss mittels Eukitt eingedeckt und so zur Diagnostik und Lagerung haltbar gemacht werden.

4.8.2 Immunhistologische Färbung

a) Manuelle Färbung

Um spezifische Strukturen anzufärben, wurde folgendes Protokoll zur indirekten Immunhistologischen Färbung verwendet. Nach dem Auftauen und Trocknen der für die Färbung ausgewählten Objektträger für 30 Minuten auf der Wärmeplatte bei 37°C wurden die Schnitte zunächst mit einem Immopen umrandet, um ein späteres Überlaufen der Inkubationslösungen zu verhindern. Die Objektträger wurden dann für fünf Minuten mit phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurden sie für 20 Minuten mit einer Lösung aus PBS, Methanol und Wasserstoffperoxid behandelt, um die endogene Peroxidase zu blocken. Dies verhindert unerwünschte spätere Reaktionen und damit mögliche Hintergrundfärbungen. Es folgten zwei weitere Waschschrte zu je fünf Minuten, erst in PBS, dann in PBST. Triton X 100 hat als Detergens die Eigenschaft, Lipidverbindungen aufzulösen und so die Zellbestandteile für Antikörper zugänglich zu machen. Ab hier erfolgten alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit 5%-Normalserum vorinkubiert. Dieses wurde entsprechend der verwendeten sekundären Antikörper-Spezies gewählt (siehe Tabelle 7). Nach Abkippen des Normalserums erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper; jeweils ein Schnitt eines jeden Objektträgers wurde als Negativkontrolle geführt und stattdessen mit PBS inkubiert. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten mit PBST gewaschen und anschließend mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren, fünfminütigen Waschschrten in PBST wurden die Objektträger für 30 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Komplex aus dem jeweiligen Vectastain ABC-Kit behandelt, um die so katalysierte Meerrettichperoxidasereaktion mittels Diaminobenzidin (DAB) gefärbt werden konnte. Dies erfolgte nach zwei fünfminütigen Waschschrten, zuerst mit PBST und dann mit PBS. Die Inkubation mit dem DAB erfolgte so lange, bis auf allen Schnitten eine Färbung zu erkennen war, meist zwischen einer und fünf Minuten. Zum Schluss wurden die Objektträger ein letztes Mal in PBS gewaschen und anschließend zur Dehydratisierung mit einer aufsteigenden Isopropylalkoholreihe behandelt (70%, 96%, 100%, 100%). Sie wurden danach in Xylol gestellt, um die Schnitte zu klären und konnten im Anschluss mittels Eukitt eingedeckt und so zur Diagnostik und Lagerung haltbar gemacht werden. Die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Primärer Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit	Sekundärer Antikörper	Dauer DAB
Mouse X Neuronal Nuclei (NeuN) clone A60	1:500	Über Nacht bei 4°C	ABC Kit PK-6102 IgG Mouse	1-3 min

Purified Mouse Anti-GFAP Cocktail	1:500	Über Nacht bei 4°C	ABC Kit PK-6102 Mouse IgG	1-3 min
-----------------------------------	-------	--------------------	---------------------------	---------

Tabelle 7: Antikörper Immunhistochemie manuell

b) Autostainer

In der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz wurden automatisierte immunhistochemische Färbungen durchgeführt und das verwendete Gewebe in Übereinstimmung mit den Regularien der Gewebe-Biobank verwendet. Die Objektträger wurden zunächst für 30 Minuten auf der Wärmeplatte bei 37°C aufgetaut und getrocknet. Für diese Färbungen wurden Färbekits verwendet, sodass die Objektträger für die immunhistochemische Färbung mit einem Antigen-Retrieval im vorgeheizten Dampfgerat vorbereitet wurden. Dafür wurde ein Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 6 für 35 Minuten verwendet. Nach einem Waschschrift von 5 Minuten wurden die Objektträger und vorbereiteten Reagenzien in den Autostainer überführt und der vorher programmierte Lauf gestartet. Für die Färbungen wurde anhand des Host des Primärantikörpers ein entsprechendes Sekundärantikörper-Kit gewählt. Die NeuN- und GFAP-Färbungen wurde mit einem Mouse-on-Mouse (MOM) Kit; die Thrombinfärbungen mit einem polymerbasierten Impress Rabbit-Kit durchgeführt (siehe Tabelle 8). Auch hier wurde jeweils ein Schnitt eines jeden Objektträgers als Negativkontrolle geführt und stattdessen mit PBS inkubiert. Nach Beendigung des Programmlaufs wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 2 Minuten dehydriert. Abschließend wurden sie in Xylol für 3x3 Minuten gewaschen und zur Konservierung eingedeckt. Die Verdünnung der jeweiligen Primärantikörper, sowie die Inkubationszeit und Dauer der Anfärbung mit DAB wurde in vorhergehenden Versuchsreihen an peripheren Schnitten ermittelt, um die bestmögliche Färbung zu erreichen. Die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Primärer Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit	Sekundärer Antikörper	Dauer DAB
Mouse X Neuronal Nuclei (NeuN) clone A60	1:500	30 min	MOM Immunodetection Peroxidase Kit,	2 min
Purified Mouse Anti-GFAP Cocktail	1:500	30 min	MOM Immunodetection Peroxidase Kit,	1 min

Thrombin heavy chain Polyclonal Antibody Host Rabbit	1:200	60 min	ImmPRESS TM HRP Reagent Anti-Rabbit IgG	5 min
--	-------	--------	---	-------

Tabelle 8: Antikörper Immunhistochemie automatisiert

4.8.3 Digitalisierung der Schnitte

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Ganzdiascanner Nano Zoomer 2.0HT zur Auswertung digitalisiert. Dazu wurden die Objektträger mit planem Rand in die Racks des Automaten gestellt und mit 20-facher Vergrößerung im vollautomatischem Modus gescannt. Auf einem externen Datenträger wurden die Dateien gespeichert und Sicherungskopien erstellt.

4.9 Auswertung der Färbungen

4.9.1 HE Färbungen

Um die Läsionsausdehnung zu bestimmen, wurden alle HE-Schnitte mit Hilfe des Programms NDP.view 2 untersucht. Die Läsionsgröße wurde in drei Dimensionen beschrieben und der Einstichkanal der Infusionsnadel unter Zuhilfenahme des Atlas (Paxinos and Franklin 2003) lokalisiert. Auf dem Schnitt mit der größten Ausdehnung der Läsion wurde die Höhe in dorsal-ventraler vom unteren Kortextrand aus und die Breite in medio-lateraler Ausrichtung von der medianen Sagittalebene aus gemessen. Um die anterior-posteriore Ausdehnung zu bestimmen, wurde die erste und die letzte Serie, auf denen eine Läsion zu sehen war, zusammen mit dem Atlas bestimmt und so die Länge der Läsionslokalisierung nach Bregma quantifiziert (siehe Abb. 9). Bei den sham-Tieren wurde lediglich die Einstichstelle lokalisiert. Bei allen Tieren wurde zudem auf weitere Blutungserscheinungen geachtet. Dazu zählen Subduralblutungen, Ventrikeleinblutungen und kontralaterale, diffuse Gewebereinblutungen. Kriterien für eine Subduralblutung waren zum einen eine sichtbare Einblutung über mindestens drei Serien, zum anderen eine Einblutung, die sich über mindestens 50% der Hemisphäre erstreckte. Die Ventrikeleinblutungen wurden gezählt, wenn über 50% des der Fläche des Ventrikels mit Blut gefüllt war. Bei den diffusen Einblutungen wurden kontralaterale Gewebereinblutungen ohne sichtbare Korrelation zur induzierten Läsion gezählt. So konnte einerseits ein Vergleich der Läsionsgröße zwischen den Behandlungsgruppen gestellt werden und andererseits weitere Blutungsereignisse dokumentiert werden.

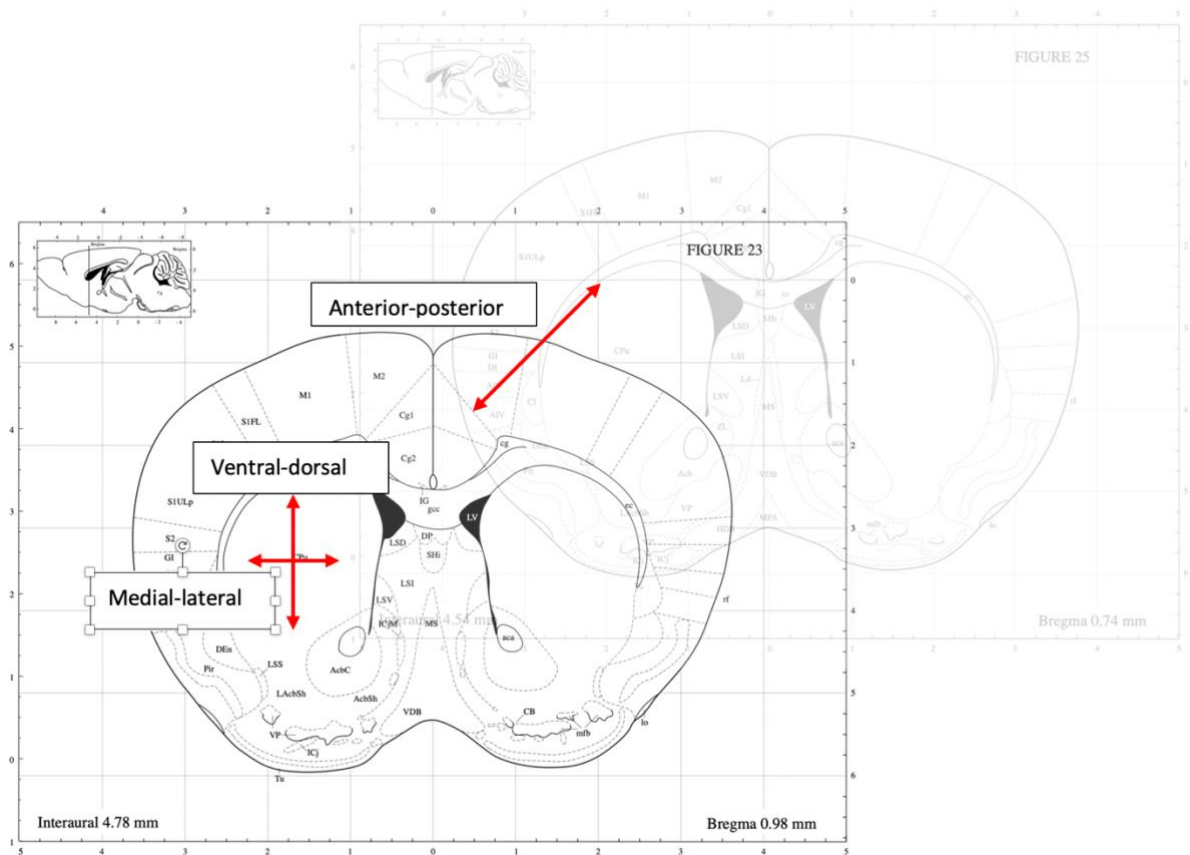


Abbildung 9: Quantifizierung des Hämatomvolumens (Paxinos and Franklin 2003)

Aus dem Atlas *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* entnommener Frontalschnitt auf Höhe Bregma +0,98mm zur Darstellung der Läsionsausdehnung in mediolateraler, ventro-dorsaler und anterior-posteriorer Ausrichtung

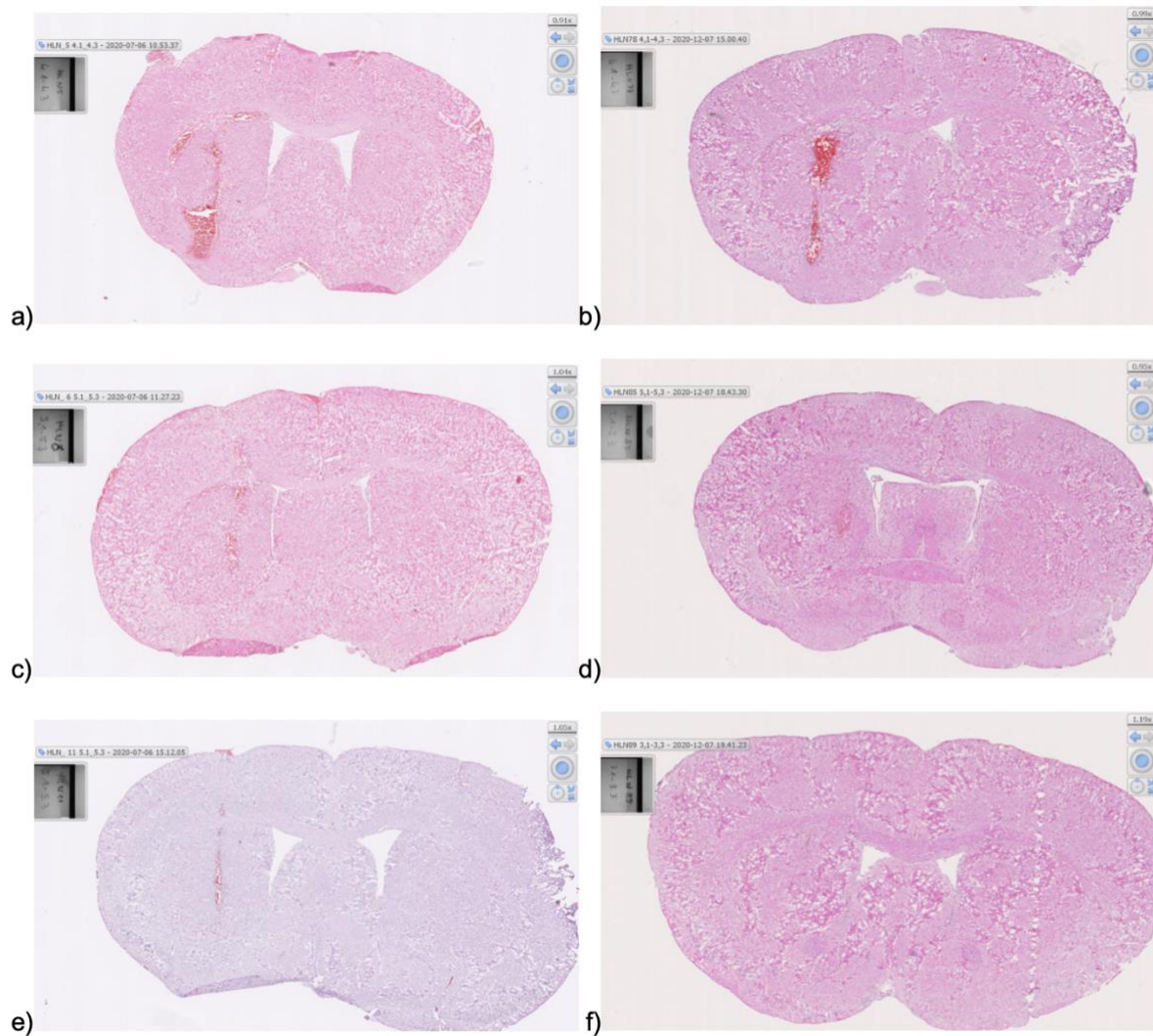


Abbildung 10: HE Färbung

Gezeigt sind HE gefärbte, 10 μ m dicke Frontalschnitte durch die Läsion von jeweils einem Interventionstier einer Zeitgruppe a) 3T-Tier, DTI b) 7T-Tier, DTI, c) 3T-Tier, NaCl d) 7T-Tier, NaCl e) 3T-Tier, sham DTI f) 7T-Tier, sham NaCl

4.9.2 Immunhistologische Färbungen

Zur Auswertung der Immunhistologischen Färbungen wurden zwei Programme verwendet. Um die Regionen und Regions of Interest (ROI) zu markieren, wurde, ebenso wie bei der HE-Auswertung das Programm NDP.view 2 benutzt; zum Auszählen der Zellzahlen sowie des Percent-Area-Stained (PAS) das Programm ImageJ bzw. Fiji für Mac OS.

Zunächst wurde anhand der HE-gefärbten Serien derjenige Schnitt mit der größten Läsionsausdehnung bzw. Narbe ausgewählt; bei den sham-Tieren der Schnitt mit der Einstichstelle. Aus der gleichen Serie wurde die entsprechende immunohistochemische Färbung verwendet und im NDP.view 2 drei Regionen zu je 440x220 μ m bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, diese Regionen möglichst am Oberrand, am Unterrand und in der Mitte neben der Läsion zu platzieren, um den periläsionalen Bereich möglichst gut zu repräsentieren (siehe Abb. 11). Diese Regionen wurden in 20x Vergrößerung analysiert. Im Folgenden

werden als ipsilateral die linke Hemisphäre mit der Läsion und als kontralateral die rechte Hemisphäre ohne Läsion bezeichnet. Als Referenz wurden drei Regionen auf der kontralateralen Hemisphäre markiert, jeweils auf der gleichen Höhe und im gleichen Abstand von der medianen Sagittallinie entfernt. Auf der ipsilateralen Hemisphäre wurde der Abstand von der medianen Sagittallinie von der Mitte der Läsion aus berechnet, um den Volumeneffekt der Läsion zu berücksichtigen.

Diese sechs Regionen wurden wiederum in jeweils vier gleich große ROI's aufgeteilt, wobei eine ROI eine Größe von 484x242µm aufwies. Innerhalb einer Region wurde ROI 1 medial und läsionsnah und ROI 4 lateral und läsionsfern positioniert (siehe Abb. 11). Auf der kontralateralen Seite wurden die ROI's spiegelverkehrt festgelegt, d.h. mit ROI1 medial und ROI 4 lateral. Diese ROI's wurden mithilfe des Programms Fiji bestimmt und im Anschluss einzeln ausgewertet.

Um die Zellzahl und die PAS zu bestimmen, wurde jede ROI zunächst in Grautöne überführt, und im Anschluss mittels Threshold-Funktion der optimale Kontrast in schwarz-weiß eingestellt (siehe Abb. 11). Dabei wurde der Schwellenwert individuell für die jeweilige ROI so eingestellt, dass alle spezifisch angefärbten Zellen bzw. Zellanteile aufgefasst wurden. Durch unterschiedliche Lichtverhältnisse und Farbintensitäten konnte dieser Schwellenwert variieren. Die Range für die zu zählenden Bereiche mussten ebenfalls an die jeweilige Färbung und damit Zellform angepasst werden, um beispielsweise bei der GFAP-Färbung auch angeschnittene Ausläufer von Gliazellen mitzählen zu können.

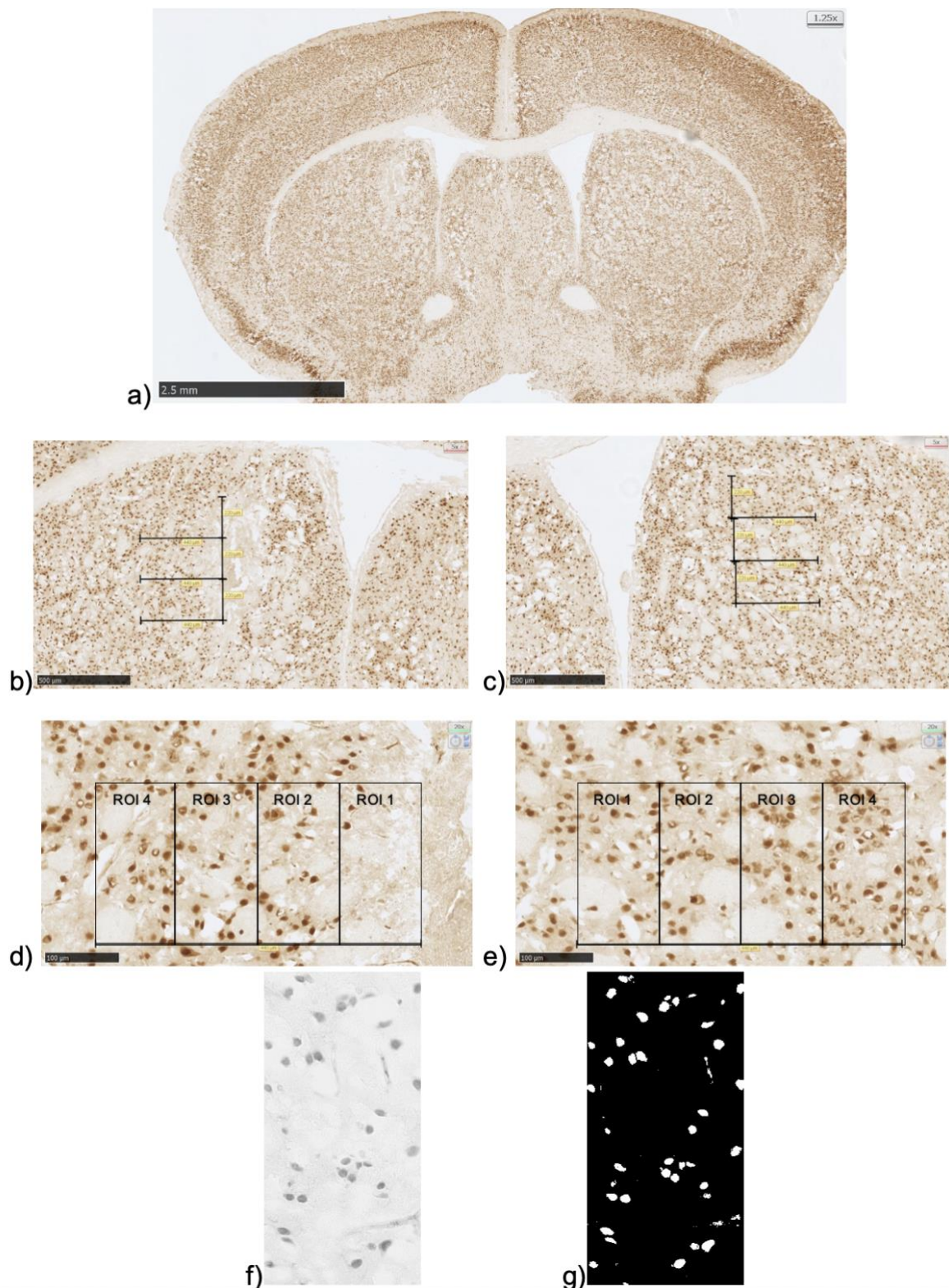


Abbildung 11: Auswertung Immunhistofärbung NeuN

Gezeigt ist das Vorgehen bei der NeuN Auswertung mithilfe der Programme NDP.view und Fiji mit Setzen der ROI's und Überführung in zunächst Grau- dann Schwarz-Weiß-Töne zur automatisierten Zellzählung a) Übersicht, Vergrößerung 1,25x, b) ipsilateral, Vergrößerung 5x, c) kontralateral, Vergrößerung 5x, d) Positionierung der ROI's 1-4 Ipsilateral, Vergrößerung 20x e) Positionierung der ROI's kontralateral 1-4, Vergrößerung 20x f) einzelne ROI Grautöne, Vergrößerung 20x, e) Threshold, Vergrößerung 20x

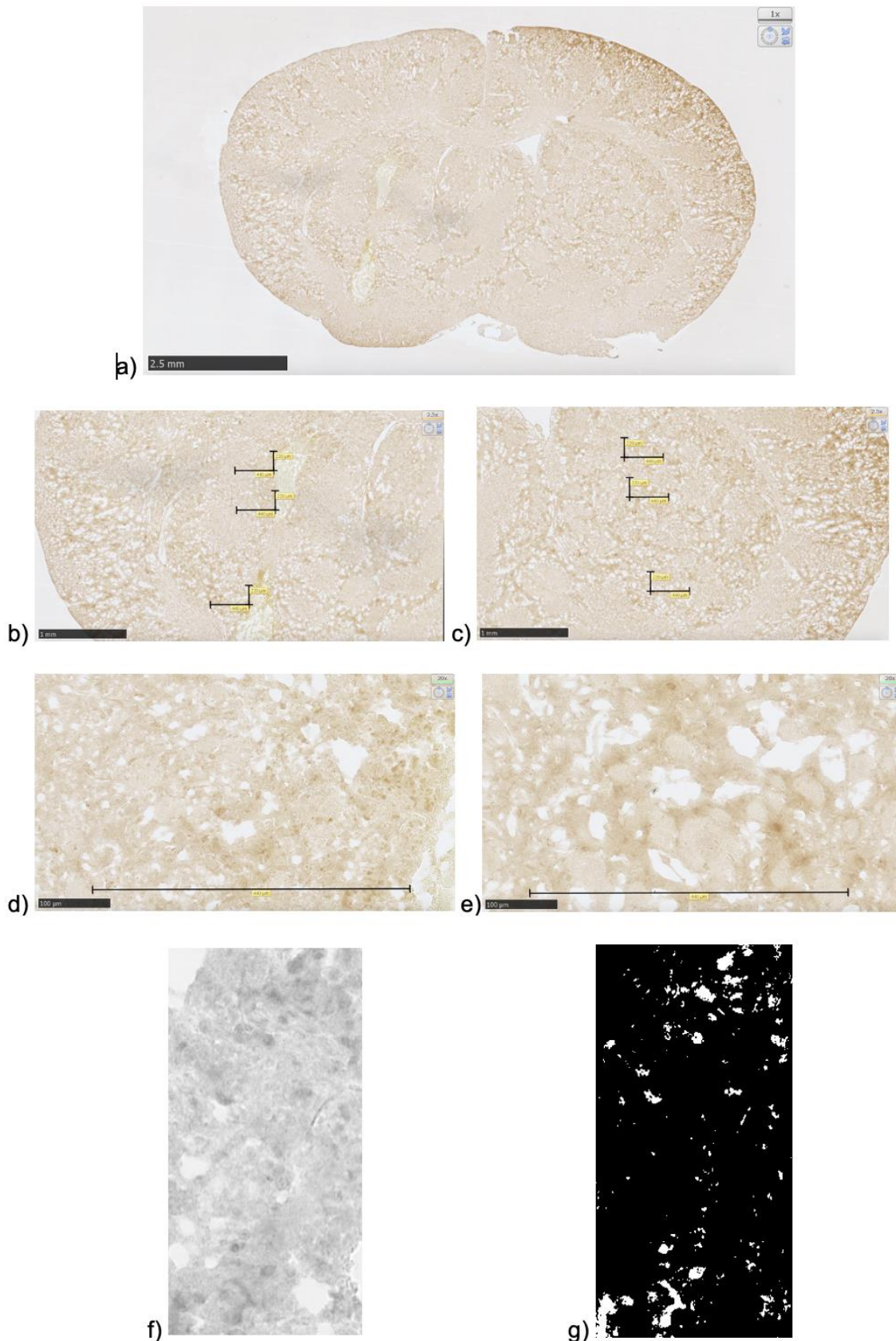


Abbildung 12: Auswertung Immunhistofärbung Thrombin

Gezeigt ist das Vorgehen bei der Thrombin Auswertung mithilfe der Programme NDP.view und Fiji mit Setzen der ROI's und Überführung in zunächst Grau- dann Schwarz-Weiß-Töne zur automatisierten Zellzählung a) Übersicht, Vergrößerung 1x, b) ipsilateral, Vergrößerung 2,5x, c) kontralateral, Vergrößerung 2,5x, d) ROI's Ipsilateral, Vergrößerung 20x e) ROI's kontralateral, Vergrößerung 20x f) einzelne ROI Grautöne, Vergrößerung 20x, e) Threshold, Vergrößerung 20x

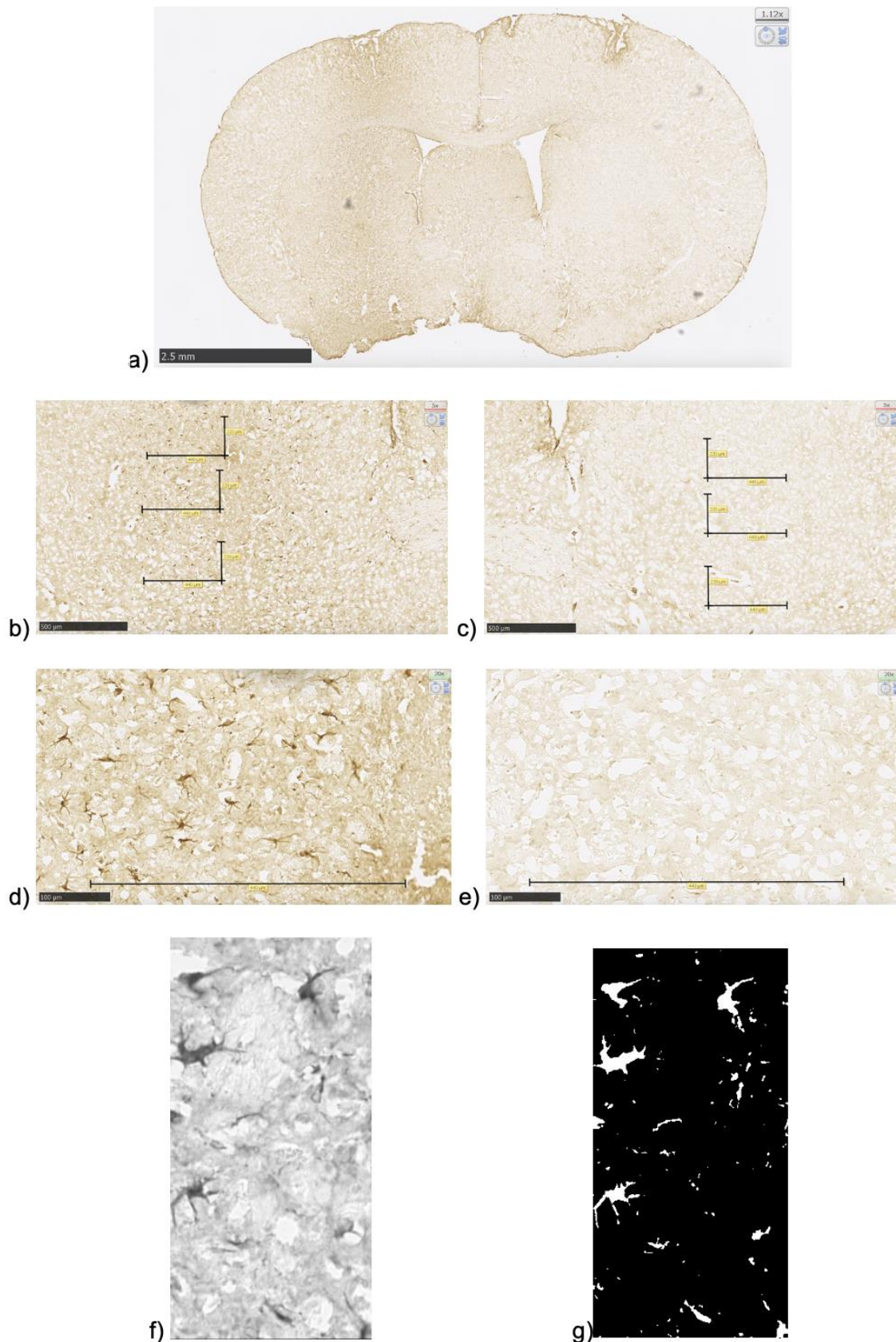


Abbildung 13: Auswertung Immunhistofärbung GFAP

Gezeigt ist das Vorgehen bei der GFAP Auswertung mithilfe der Programme NDP.view und Fiji mit Setzen der ROI's und Überführung in zunächst Grau- dann Schwarz-Weiß-Töne zur automatisierten Zellzählung a) Übersicht, Vergrößerung 1x, b) ipsilateral, Vergrößerung 5x, c) kontralateral, Vergrößerung 5x, d) ROI's Ipsilateral, Vergrößerung 20x e) ROI's kontralateral, Vergrößerung 20x f) einzelne ROI Grautöne, Vergrößerung 20x, e) Threshold, Vergrößerung 20x

4.10 Grafiken und Statistik

Neuroscore

Die Summe der Punkte im Neuroscore einer Interventionsgruppe wurde mit der Anzahl der Tiere der Gruppe dividiert um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten und die Gruppen vergleichen zu können. Es wurde jeweils MW und SEM der erreichten Punktzahl pro Interventionsgruppe berechnet.

Rotarod

Als Referenz für die postoperativen Zeiten der Mäuse wurde die Zeit des letzten Trainingstages präoperativ als Baseline verwendet und die prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Laufzeit grafisch dargestellt. Es wurde jeweils MW und SEM der relativen Laufzeit pro Interventionsgruppe berechnet.

Gewicht

Das absolute Gewicht wurde innerhalb einer Gruppe als MW und SEM angegeben. Als Referenz wurde für das postoperative Gewicht der Mäuse das Gewicht am OP-Tag zum Zeitpunkt vor dem Eingriff verwendet und die prozentuale Zu- bzw. Abnahme des Gewichts grafisch dargestellt.

Hämatomvolumen

Um das Hämatomvolumen zu berechnen, wurden die drei Parameter Länge (a), Breite (b) und Höhe (c) der ICB auf dem Schnitt mit der größten Ausdehnung ausgemessen (siehe 4.9.1). Das Hämatomvolumen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$V=(a*b*c)/2$$

Zellzahl und PAS

Nach Auszählen von Zellzahl und PAS in den 4 ROI's ipsi- und kontralateral mithilfe des Programms Fiji wurden die Daten in Excel gesammelt und gegenübergestellt. Für die Färbungen von NeuN und Thrombin wurde ein Verhältnis von kontralateral zu ipsilateral in Prozent berechnet, um die ipsilaterale Abnahme von Neuronen bzw. die Zunahme von Thrombin im Vergleich zu kontralateral zu berechnen. Dabei stellt kontralateral im entsprechenden ROI 100% dar. Es wurden Mittelwerte für die gleichen ROI's ipsi- bzw. kontralateral gebildet und diese in prozentuale Verhältnisse gesetzt (ipsilateral/kontralateral*100) (siehe Abb. 11). Für GFAP wurde die Differenz der PAS von ipsilateral und kontralateral genommen, um den ipsilateralen Zuwachs der Astrozyten zu berechnen, da kontralateral kaum bis keine Astrozyten zählbar waren (ipsilateral-kontralateral).

Grafiken und Statistische Signifikanz

Alle Grafiken wurden mithilfe von GraphPad Prism 10.1.0 erstellt. Dabei wurden Balken- oder Liniendiagramme aus Mittelwerten und dem jeweiligen Standardfehler erstellt.

Mittels ungepaartem T-Test zweier Stichproben und einem α -Fehler von 0,05 wurde die statistische Signifikanz der Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen in GraphPad berechnet. Die Korrelationsanalysen wurden mithilfe des Korrelationskoeffizient ρ nach Spearman durchgeführt. Die Monitoring Daten wurden mit einer zweifachen Varianzanalyse (2-way ANOVA-Test) ebenfalls mit einem α -Fehler von 0,05 in GraphPad untersucht. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Intraoperatives Monitoring

Der intraoperativ gemessene CBF nahm in beiden Gruppen nach Setzen der Blutung ab und erreichte seinen Tiefpunkt nach 3 Minuten (DTI 18,20 +/- 5,02 %, NaCl 33,3 +/- 1,77 % des Ausgangswertes) (siehe Abb. 14). Danach nahm der CBF stetig zu, um nach 11 Minuten einen steady state von circa 60% zu erreichen (DTI 64,20 +/- 9,48 %, NaCl 60,70 +/- 1,77 %), ohne Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

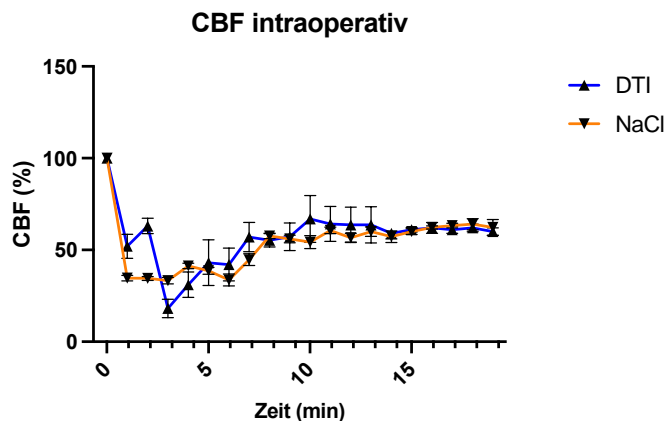


Abbildung 14: intraoperativer CBF

Intraoperativer CBF (in %) über die Zeit (in min) ab Injektion der ICB, dargestellt sind die MW +/- SEM der Interventionsgruppen DTI (blau) und NaCl (orange), jeweils n=2

Der intraoperativ gemessene ICP zeigte zwischen den Interventionsgruppen keinen Unterschied. 3 Minuten nach Setzen der Blutung war ein Anstieg auf 50 ,00+/- 2,32 mmHg in der DTI-Gruppe und auf 54,00 +/- 13,54 mmHg in der NaCl-Gruppe zu sehen (siehe Abb. 15). Nach 10 Minuten normalisierte sich der ICP auf einen Wert von 11,00 +/- 0,73 mmHg in der DTI-Gruppe und 12,00 +/- 2,68 mmHg in der NaCl-Gruppe.

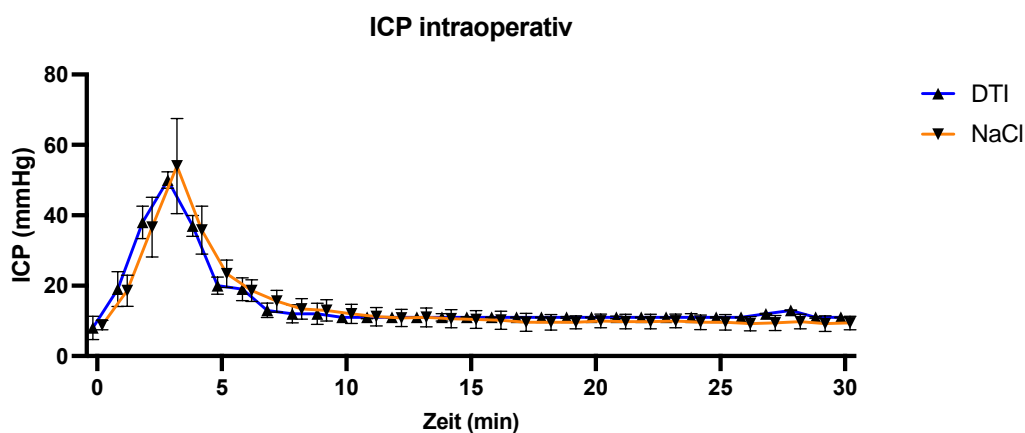


Abbildung 15: intraoperativer ICP

Intraoperativer ICP (in mmHg) über die Zeit (in min) ab Injektion der ICB (Zeitpunkt 0), dargestellt sind die MW +/- SEM der Interventionsgruppen DTI (blau) und NaCl (orange), jeweils n=2

5.2 Überlebenszeit

Von den insgesamt 48 Mäusen haben 6 die geplante Überlebenszeit nicht erreicht (siehe Abb. 6). Eine Maus ist nach der Narkose verstorben, die anderen 5 postoperativ, davon waren 2 scheinoperierte Tiere und 3 operierte Tiere. Von den operierten Tieren waren zwei Tiere mit NaCl und eines mit Argatroban behandelt. Von den verbleibenden 42 Tieren konnten 39 ausgewertet werden, da drei der operierten Tiere histologisch keine Blutung oder Einstichstelle aufwiesen und aus diesem Grund aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei der Auswertung der HE Färbung konnte aufgrund nicht auswertbarer Färbung ein Tier der DTI-Gruppe nicht ausgewertet werden, in der Auswertung der NeuN-Färbungen konnte ein weiteres Tier der DTI-Gruppe aus denselben Gründen nicht berücksichtigt werden.

5.3 Verhaltenstests

5.3.1 Neuroscore

Im Neuroscore zeigten alle Tiere präoperativ keine Defizite. Postoperativ wiesen die DTI-Tiere an Tag 1 signifikant mehr Defizite auf als die sham-Tiere auf mit einem p-Wert von $p < 0,001$ ($p = 0,0006$ in der 3T Gruppe, $p < 0,0001$ in der 7T Gruppe). Zudem zeigte die DTI-Gruppe auch signifikant mehr Defizite an Tag 1 auf als die NaCl-Gruppe ($p = 0,0179$ in der 3T Gruppe, $p < 0,0001$ in der 7T Gruppe). Am ersten postoperativen Tag erreichte die DTI-Gruppe eine Punktzahl von $9,88 \pm 1,91$, die NaCl-Gruppe $3,29 \pm 1,32$ und die sham-Gruppe $0,30 \pm 0,21$. An Tag 3 postoperativ erreichte die DTI-Gruppe eine Punktzahl von $2,13 \pm 0,72$, die NaCl-Gruppe $1,50 \pm 0,56$ und die sham-Gruppe $0,60 \pm 0,34$. An Tag 7 hatte die DTI-Gruppe und die sham-Gruppe eine Punktzahl von 0 und die NaCl-Gruppe $0,29 \pm 0,29$ erreicht.

Diese Defizite in der DTI-Gruppe waren vor allem bei den Koordinationsübungen zu sehen, während bei den Balance-Übungen und dem generellen Verhalten der Mäuse zwischen den Interventionsgruppen wenig bis kein Unterschied zu sehen war (Daten nicht dargestellt). Ein Verlust der Reflexe oder Paresen wurde bei keinem der Tiere beobachtet. Bereits am zweiten postoperativen Tag zeigten sich die Defizite stark rückläufig und nach 5 Tagen wiesen die DTI-Tiere keine Defizite mehr auf, während bei den NaCl-Tieren noch geringe Defizite zu beobachten waren. Zwischen den NaCl- und den sham-Tieren gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied im Neuroscore. Die sham-Tiere wiesen postoperativ durchweg kaum Defizite auf, zwischen den beiden sham-Gruppen zeigte sich kein Unterschied (siehe Abb.16).

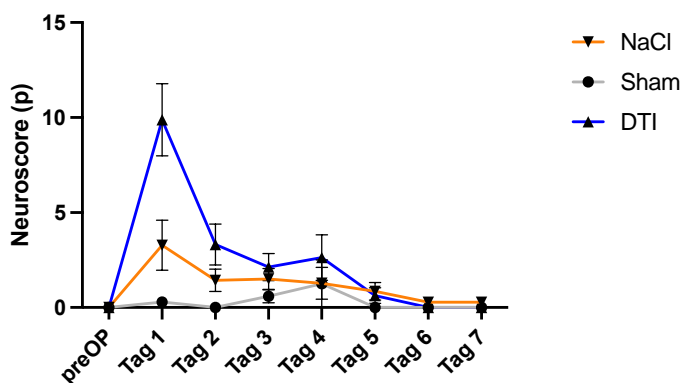


Abbildung 16: Neuroscore 3T und 7T Gruppe

Dargestellt sind die MW \pm SEM der erreichten Punktzahl pro Interventionsgruppe, DTI-Tiere (blau, 3 und 7T zusammengefasst, $n=16$), NaCl-Tiere (orange, 3 und 7T zusammengefasst, $n=14$) und sham-Tiere (grau, 3 und 7T zusammengefasst, $n=10$) über die Zeit (Tage postoperativ), Signifikanzen berechnet mit 2-way ANOVA, multiple comparisons

5.3.2 Rotarod

Der Rotarod-Test zeigte starke Abweichungen innerhalb der Gruppen. Die relativen Zeiten der 3T und 7T Interventionsgruppen zusammen sind in Abbildung 17 dargestellt, bezogen auf die preOP-Zeit nach 3 Tagen Training. Die DTI-Gruppe lief am ersten postoperativen Tag $129,37 \pm 28,86\%$, die NaCl-Gruppe $135,61 \pm 24,30\%$ und die sham-Gruppe $142,82 \pm 34,84\%$. Am Tag 3 postoperativ war die Laufzeit der DTI-Gruppe $166,08 \pm 19,77\%$, der NaCl-Gruppe $118,78 \pm 14,55\%$ und der sham-Gruppe $154,27 \pm 24,59\%$. Am 7. Postoperativen Tag lief die DTI-Gruppe $196,95 \pm 35,27\%$, die NaCl-Gruppe $144,16 \pm 21,25\%$ und die sham-Gruppe $135,89 \pm 35,53\%$ der Ausgangslaufzeit (siehe Abb. 17). Weder nach 3 Tagen, noch nach 7 Tagen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (alle Vergleiche $p > 0,05$). Die Laufzeiten in den beiden sham-Gruppen unterscheiden sich nicht, daher wurden sie in der Darstellung und Berechnung zusammengefasst.

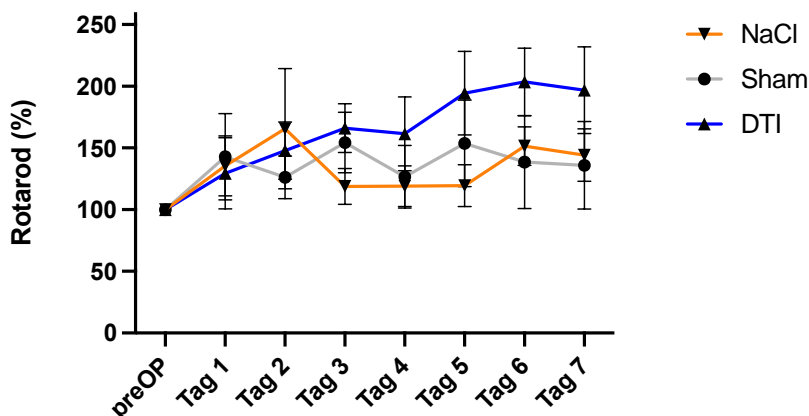


Abbildung 17: Rotarod 3T und 7T Gruppe

Dargestellt sind die MW \pm SEM der relativen Laufzeiten der einzelnen Interventionsgruppen auf dem Rotarod der DTI-Tiere (blau, 3 und 7T zusammengefasst, $n=16$), NaCl-Tiere (orange, 3 und 7T zusammengefasst, $n=14$) und sham-Tiere (grau, 3 und 7T zusammengefasst, $n=10$) über die Zeit (Tage postoperativ), Signifikanzen berechnet mit 2-way ANOVA, multiple comparisons

5.3.3 Gewicht

Das absolute Gewicht lag vor der Operation bei 24,14 +/- 0,42g für die DTI-Tiere (n=16), bei 25,12 +/- 0,68g für die NaCl-Tiere (n=14), bei 24,78 +/- 0,42g für die sham DTI-Tiere (n=10), jeweils MW+/-SEM (alle Vergleiche p>0,05). In Abbildung 18 ist das relative Körpergewicht bezogen auf das präoperative Gewicht dargestellt, hier sind die 3T und 7T zusammen dargestellt. Postoperativ nahm das Körpergewicht bei allen Gruppen zunächst ab, wobei die Abnahme sich bei den sham-Tieren (96,13 +/- 1,23% an Tag 1) weniger deutlich zeigte, als bei den operierten Tieren (DTI: 91,26 +/- 0,99% und NaCl: 92,00 +/- 0,66% an Tag 1). An Tag 3 postoperativ hatte die DTI-Gruppe 94,57 +/- 0,96%, die NaCl-Gruppe 94,94 +/- 1,34% und die sham-Gruppe 97,25 +/- 0,74% des Ursprungsgewicht erreicht. An Tag 7 erreichte die DTI-Gruppe 97,01 +/- 1,33%, die NaCl-Gruppe 98,54 +/- 1,29% und die sham-Gruppe 97,13 +/- 1,45% des Ursprungsgewicht. Alle Gruppen nahmen postoperativ zu und erreichten nach 4-5 Tagen annähernd ihr Ursprungsgewicht. Zwischen den Interventionsgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied (alle Vergleiche p>0,05 an allen Tagen). Auch hier zeigt sich zwischen den beiden sham-Gruppen kein Unterschied, die Darstellung erfolgt als gemeinsame Gruppe.

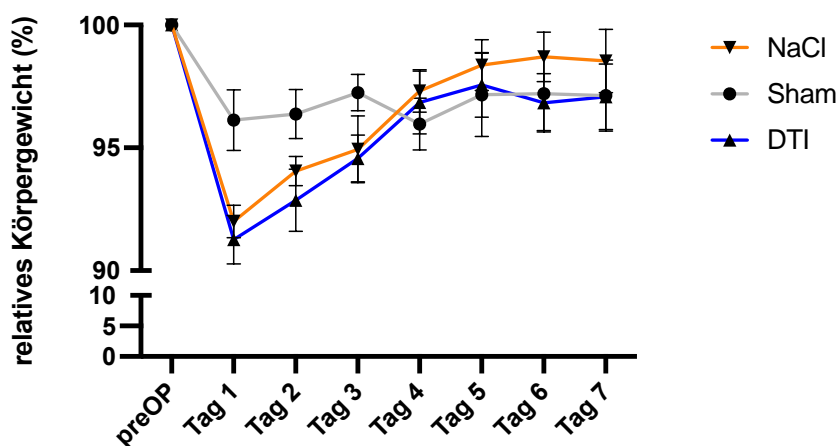


Abbildung 18: Relatives Gewicht 3T und 7T Gruppe

Dargestellt ist die relative Gewichtsveränderung aller Tiere über die Zeit. Auf der x-Achse ist der preOP Tag und Tag 1-7 nach der Operation zu sehen, auf der y-Achse das entsprechende relative Gewicht als Mittelwerte mit SEM einer Interventionsgruppe. Das Gewicht am OP-Tag wurde als Referenz (100%) genommen. NaCl-Tiere orange, n=14; DTI-Tiere blau, n=16; sham grau, n=10, Signifikanzen berechnet mit 2-way ANOVA, multiple comparisons

5.4 Färbungen

5.4.1 Lokalisation und Ausdehnung des Hämatoms

Die Einstichstelle der Infusionsnadel wurde im Durchschnitt bei Bregma +0,67mm (für n=19) bei der 3T-Gruppe und bei Bregma +0,7mm (für n=20) bei der 7T-Gruppe gefunden (siehe Tab. 9, 10). Die argatrobanbehandelten Tiere wiesen im Vergleich zur NaCl-Gruppe ein

größeres Hämatomvolumen sowohl nach 3T als auch nach 7T auf, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Das Volumen der ICB (Berechnung siehe 4.10 Hämatomvolumen) zeigte bei der DTI-Gruppe nach 3T eine Größe von 1,58 +/- 0,42mm³ und nach 7T 0,50 +/- 0,20mm³. In der NaCl-Gruppe lag das ICB-Volumen nach 3T bei 0,97 +/- 0,32mm³ und nach 7T bei 0,13 +/- 0,04mm³ (siehe Abb. 21). Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Interventionsgruppen, weder nach 3T (p=0,14), noch nach 7T (p=0,06). Nach 7T zeigt sich das Hämatomvolumen bei beiden Interventionsgruppen signifikant kleiner verglichen mit der jeweils gleich behandelten 3T Gruppe (jeweils p<0,05, siehe Abb. 21). Den größten Unterschied in der Ausdehnung des Hämatoms zeigt sich bei beiden Zeitgruppen in der Länge der Blutung in anterior-posteriorer Ausrichtung, dabei zeigen sich jedoch große Schwankungen in beiden Interventionsgruppen (siehe Abb. 19 und 20).

In mm	Einstich- stelle	Länge Anterior- posterior	Höhe ventral- dorsal	Breite Medial-lateral	Volumen ICB (mm ³)
ICB DTI (n=7)	0,7	1,89 +/- 0,30	2,09 +/- 0,28	0,65 +/- 0,12	1,58 +/- 0,42
ICB NaCl (n=7)	0,72	1,64 +/- 0,26	1,51 +/- 0,25	0,72 +/- 0,10	0,97 +/- 0,32
Sham (n=5)	0,43	-	-	-	-

Tabelle 9: ICB Daten 3T

In mm	Einstich- stelle	Länge Anterior- posterior	Höhe ventral- dorsal	Breite Medial-lateral	Volumen ICB (mm ³)
ICB DTI (n=8)	0,7	1,38 +/- 0,20	1,45 +/- 0,27	0,41 +/- 0,05	0,50 +/- 0,20
ICB NaCl (n=7)	0,59	0,78 +/- 0,16	0,88 +/- 0,13	0,32 +/- 0,06	0,13 +/- 0,04
Sham NaCl (n=5)	0,84	-	-	-	-

Tabelle 10: ICB Daten 7T

*Tabelle 9 und 10: Tabellarische Auflistung der Einstichstelle (in mm ab Bregma), der Ausrichtung des Hämatoms in den 3 Ebenen (anterior-posterior, ventral-dorsal und medial-lateral) und des errechneten Hämatomvolumens in mm³ der einzelnen Interventionsgruppen nach 3T (Tab 9) und nach 7T (Tab 10) (MW +/- SEM), Volumenberechnung: $V=(a*b*c)/2$*

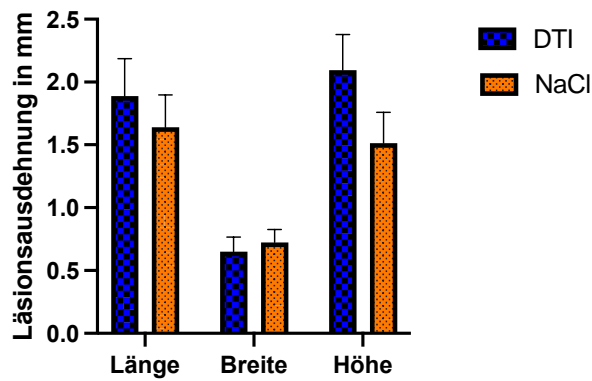


Abbildung 19: Hämatomausdehnung nach 3T

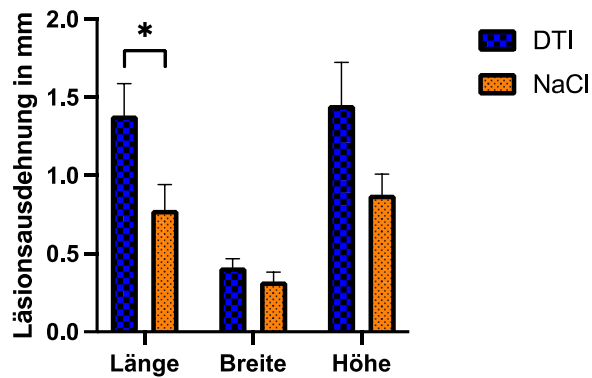


Abbildung 20: Hämatomausdehnung nach 7T

Abbildung 19 und 20: Länge (anterior-posterior), Breite (medial-lateral) und Höhe (ventral-dorsal) des Hämatoms nach 3T und 7T der DTI-Gruppe (blau) und der NaCl-Gruppe (orange), 3T DTI-Gruppe n=7; 3T NaCl-Gruppe n=7 (Abb. 19); 7T DTI-Gruppe n=8, 7T NaCl-Gruppe n= 7 (Abb. 20) (jeweils MW + SEM). Ein signifikanter Unterschied ist zwischen DTI- und NaCl-Gruppe in der Länge (anterior-posteriore Ausdehnung) zu sehen mit einem p-Wert von $p=0,04$, Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

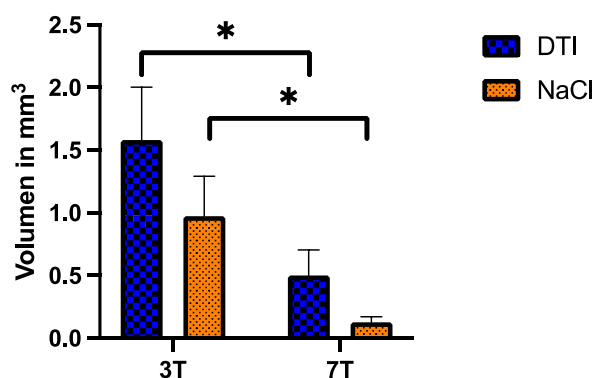


Abbildung 21: Hämatomvolumen nach 3T und 7T

Errechnetes Hämatomvolumen (in mm^3) nach 3T und nach 7T der DTI-Gruppe (blau) und der NaCl-Gruppe (orange) (MW + SEM), DTI, 3T n=7; NaCl, 3T n=7; DTI, 7T n=8; NaCl, 7T n=7; Volumenberechnung: $V=(a*b*c)/2$ Signifikante Unterschiede sind jeweils zwischen den DTI-Gruppen nach 3 und 7T (p_1) bzw. in den NaCl Gruppen nach 3 und 7T (p_2) zu sehen mit p-Werten von $p_1=0,0229$ und $p_2=0,0198$, Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

Die DTI-Gruppe zeigte nach 3T deutlich mehr zusätzliche Blutungszeichen als die NaCl-Gruppe (siehe Abb. 22, Kriterien siehe 4.9.1). Vor allem diffuse Einblutungen konnten bei den DTI-Tieren und nicht bei den NaCl-Tieren beobachtet werden. Nach 7T zeigten sich diese zusätzlichen Blutungszeichen stark rückläufig, sodass in der DTI-Gruppe nur noch 25% der Tiere diffuse Einblutungen hatten (siehe Abb. 23).

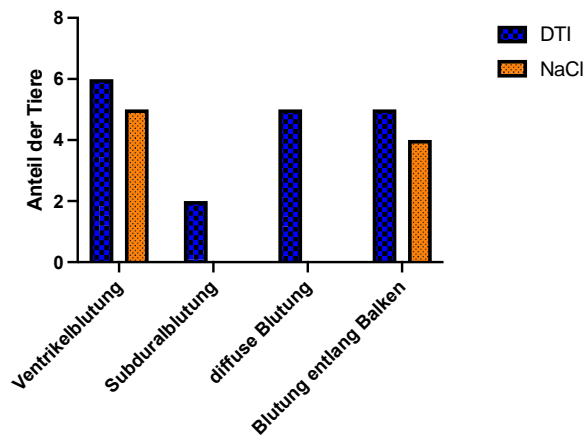


Abbildung 22: zusätzliche Blutungszeichen 3T

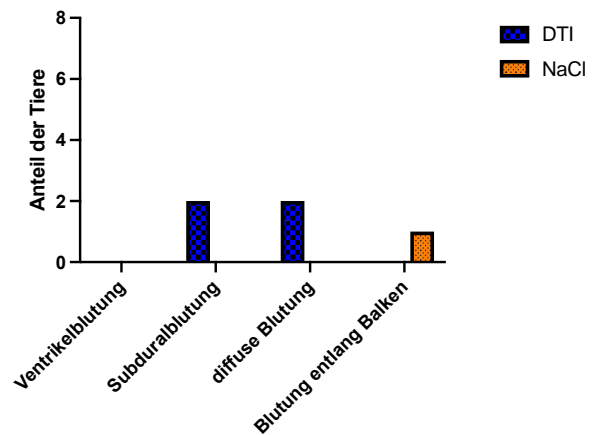
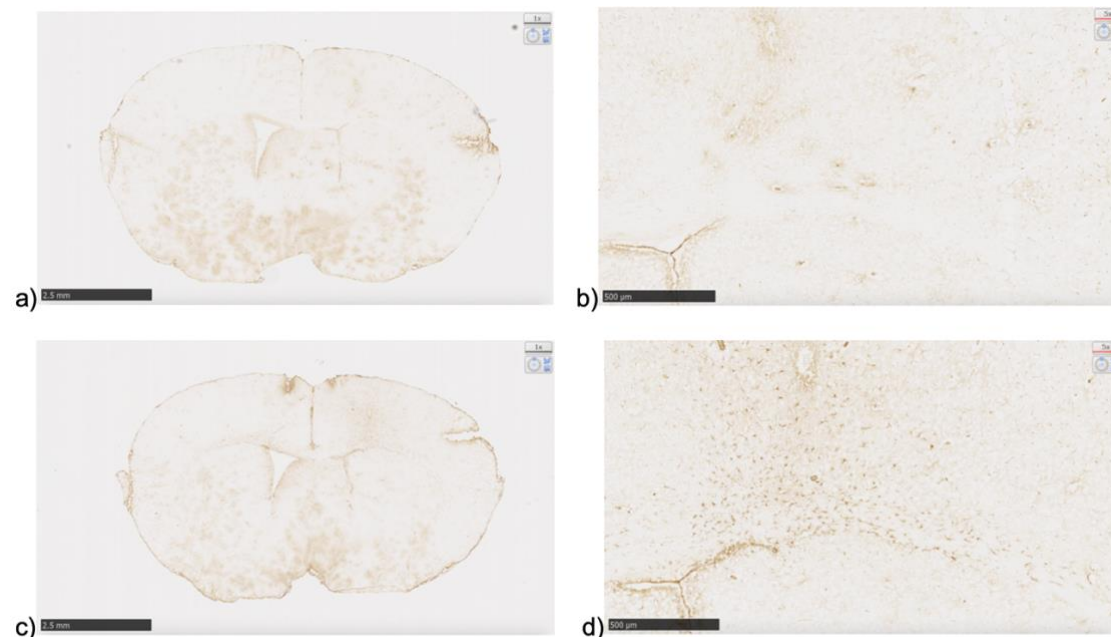


Abbildung 23: zusätzliche Blutungszeichen 7T

Abb. 22 und 23: Anzahl der Tiere mit zusätzlichen Blutungszeichen Ventrikelblutung, Subduralblutung, diffuse Einblutung und Blutung entlang des Balkens (Kriterien siehe 4.9.1) der DTI-Tiere (blau) und NaCl-Tiere (orange) nach 3T und 7T

5.4.2 Negativkontrollen immunhistologische Färbungen

Die bei den immunhistologischen Färbungen (GFAP, NeuN, Thrombin) mitgeführten Negativkontrollen zeigten keine spezifische Färbung an (siehe Abb. 24)



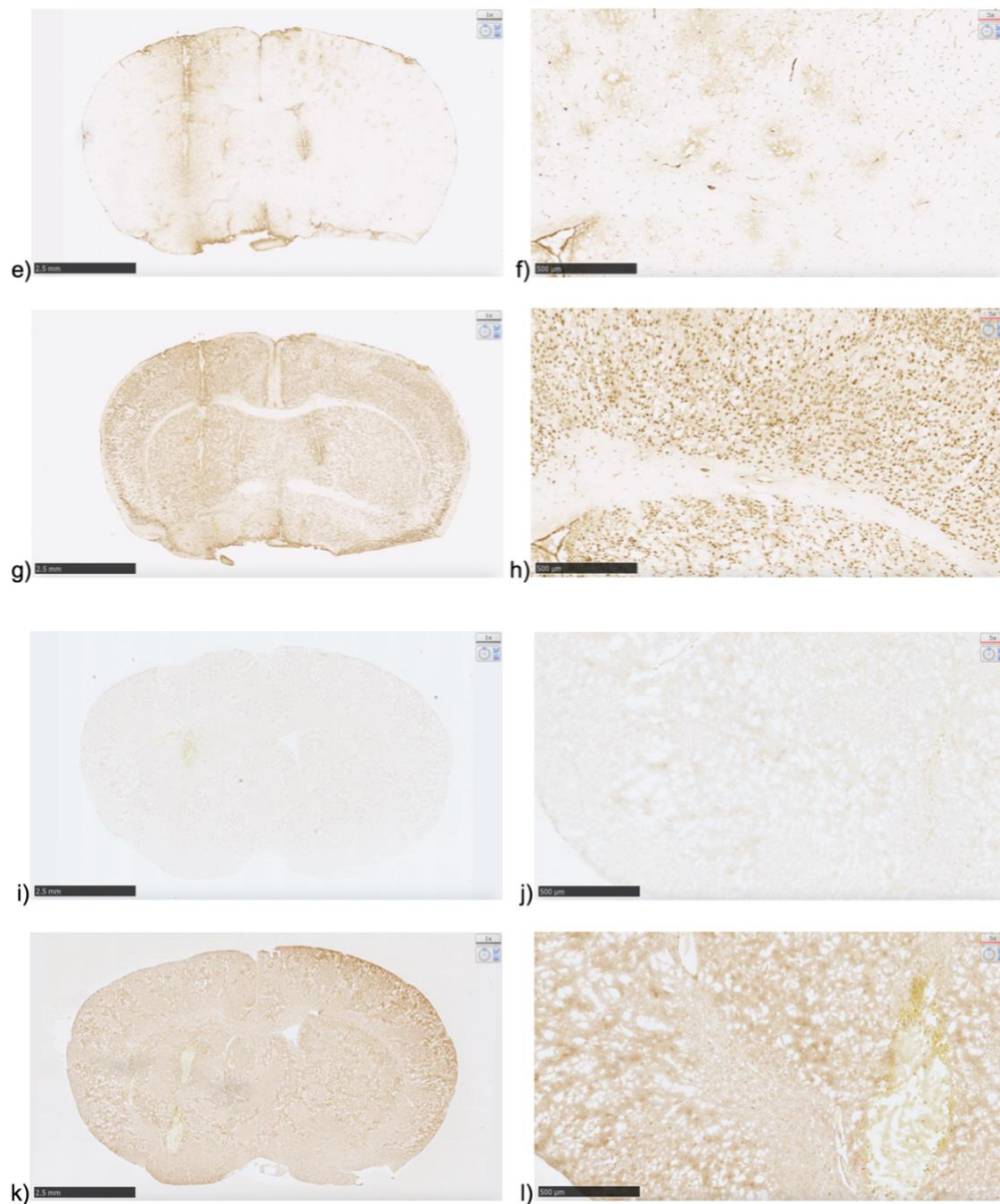


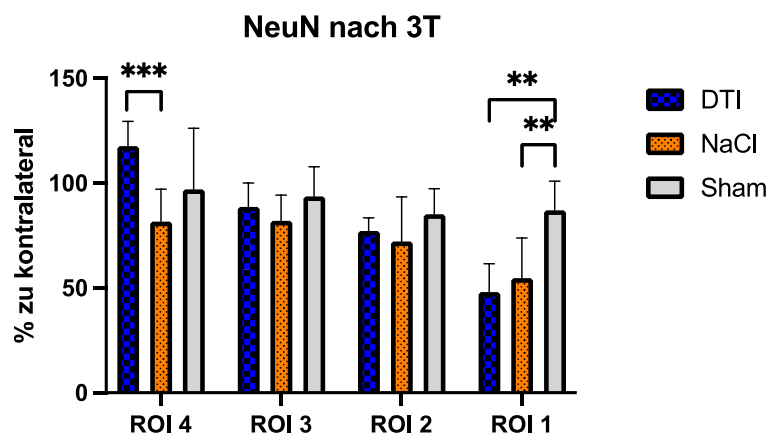
Abbildung 24: Negativkontrollen immunhistologische Färbungen

Abb. 24: a) Negativkontrolle GFAP Vergrößerung 1x b) Negativkontrolle GFAP Vergrößerung 5x c) Positivkontrolle GFAP Vergrößerung 1x d) Positivkontrolle GFAP Vergrößerung 5x
 e) Negativkontrolle NeuN Vergrößerung 1x f) Negativkontrolle NeuN Vergrößerung 5x g) Positivkontrolle NeuN Vergrößerung 1x h) Positivkontrolle NeuN Vergrößerung 5x
 i) Negativkontrolle Thrombin Vergrößerung 1x j) Negativkontrolle Thrombin Vergrößerung 5x k) Positivkontrolle Thrombin Vergrößerung 1x l) Positivkontrolle Thrombin Vergrößerung 5x

5.4.3 Neuronaler Schaden

Der periläsionale neuronale Schaden wurde anhand der reduzierten Zellzahl in der NeuN Färbung gemessen, verglichen mit der kontralateralen Seite (die Zellzahl des jeweiligen kontralateralen ROIs wurde als 100% Referenz genommen) (siehe Abb. 11).

In der 3T-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten Tieren und den sham Tieren in der direkt der Läsion angrenzenden ROI 1 mit jeweils $p < 0,01$ (siehe Abb. 24). Dabei liegt die Zellzahl der Neuronen in ROI 1 der operierten Tiere bei $48,01 \pm 5,56\%$ (DTI) und $54,73 \pm 7,20\%$ (NaCl) und bei den scheinoperierten Tieren bei $87,10 \pm 6,18\%$. Der neuronale Schaden ist bis ROI3 bei den DTI-Tieren zu sehen, das entspricht circa $660\mu\text{m}$ lateral der Läsion, während sich in der NaCl-Gruppe der Schaden bis ROI 4 erstreckt ($880\mu\text{m}$ lateral der Läsion, siehe Abb. 25). In ROI 4 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der DTI und der NaCl-Gruppe, wobei die DTI-Gruppe weniger neuronalen Schaden aufweist als die NaCl-Gruppe, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Dabei liegt die Zellzahl der Neuronen in ROI 4 bei den DTI-Tieren bei $117,63 \pm 4,80\%$ und bei den NaCl-Tieren bei $81,71 \pm 5,79\%$. In den übrigen ROI 1-3 zeigt sich kein Unterschied zwischen beiden Interventionsgruppen NaCl und DTI. Die Zellzahl der periläsionalen Neuronen in den beiden sham-Gruppen unterscheidet sich nicht, daher wurden sie in der Darstellung und Berechnung zusammengefasst.



% zu kontralateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=6	117,63 +/- 4,80	88,66 +/- 4,65	77,16 +/- 2,55	48,01 +/- 5,56
ICB NaCl n=7	81,71 +/- 5,79	82,12 +/- 4,63	72,19 +/- 8,03	54,73 +/- 7,20
Sham n=5	97,06 +/- 13,01	93,63 +/- 6,32	85,13 +/- 5,44	87,10 +/- 6,18

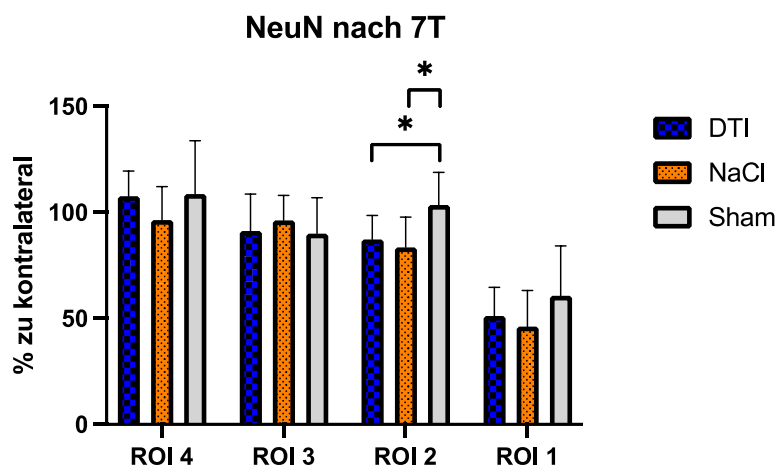
Abbildung 25: NeuN 3T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Abnahme der Zellzahl der Neuronen ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 3T, MW + SEM. In ROI 4 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen DTI- und NaCl-Gruppe mit $p=0,0006$. In ROI 1 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der DTI- und sham-Gruppen mit $p=0,0011$ und zwischen NaCl- und sham-Gruppen mit $p=0,0091$, Signifikanz berechnet mit multiple unpaired t-tests

Nach 7T zeigt sich der neuronale Schaden verkleinert und ist bei den operierten Tieren nur noch in ROI 1 und ROI 2 zu sehen (siehe Abb. 26). Dabei liegt die Zellzahl in ROI 1 bei den

operierten Tieren bei 51,17 +/- 4,79% (DTI) und 46,15 +/- 6,44% (NaCl) und bei den scheinoperierten Tieren bei 60,67 +/- 10,54%.

Es ist in allen ROI's kein signifikanter Unterschied zwischen DTI- und NaCl-Gruppe messbar. In ROI 2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen DTI-Gruppe und sham und zwischen NaCl-Gruppe und sham, jeweils $p < 0,05$. Der neuronale Schaden ist bei den DTI-Tieren tendenziell geringer verglichen mit den NaCl-Tieren mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,54$ bei ROI 1 und $p = 0,14$ für ROI 4. Zwischen beiden sham-Gruppen ist kein Unterschied in der neuronalen Zellzahl messbar.



% zu kontralateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=8	107,70 +/- 4,20	91,26 +/- 6,18	87,25 +/- 4,01	51,17 +/- 4,80
ICB NaCl n=7	96,48 +/- 5,95	96,29 +/- 4,45	83,58 +/- 5,40	46,15 +/- 6,44
Sham n=5	108,70 +/- 11,27	90,05 +/- 7,57	103,62 +/- 6,84	60,67 +/- 10,54

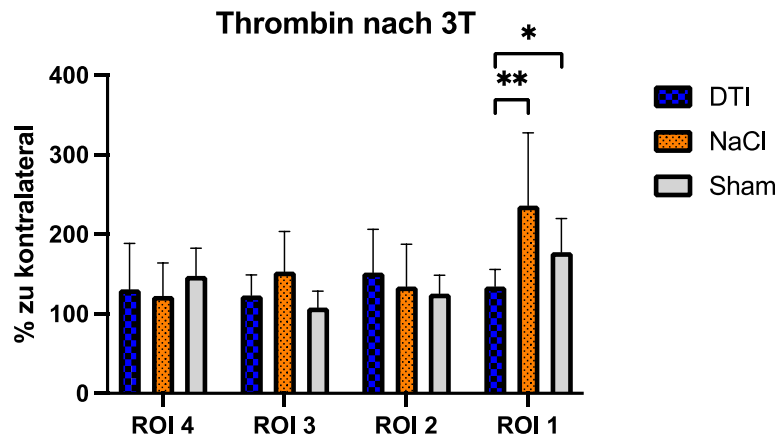
Abbildung 26: NeuN 7T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Abnahme der Zellzahl der Neuronen ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 7T, MW + SEM. In ROI 2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der DTI- und sham-Gruppen mit $p = 0,0480$ und zwischen NaCl- und sham-Gruppen mit $p = 0,0420$, Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

5.4.4 Thrombinaufkommen periläsional

Die Anfärbung von Thrombin wurde wie bei der NeuN-Färbung im Verhältnis zur Gegenseite gemessen (siehe Abb. 12). Bei den 3T-Tieren ist in beiden Interventionsgruppen eine Zunahme der Thrombinreaktivität periläsional zu messen; diese nimmt nach lateral (peripher) stetig ab (siehe Abb. 27). Es zeigt sich zudem in der läsionsnahen ROI 1 eine Zunahme der Thrombinreaktivität in der NaCl-Gruppe, die signifikant höher ist, als bei der DTI-Gruppe mit $p < 0,01$. Die DTI-Gruppe zeigt zudem signifikant weniger Thrombinreaktivität als die sham-

Gruppe mit $p < 0,05$. In ROI 1 liegt die ipsilaterale Thrombinreaktivität bei den NaCl-Tieren bei 236,27 +/- 34,48%, bei der DTI-Gruppe bei 134,42 +/- 7,61%, bei der sham-Gruppe bei 177,60 +/- 18,88%. Das periläsionale Thrombinaufkommen in den beiden sham-Gruppen unterscheidet sich nicht, daher wurden sie in der Darstellung und Berechnung zusammengefasst.

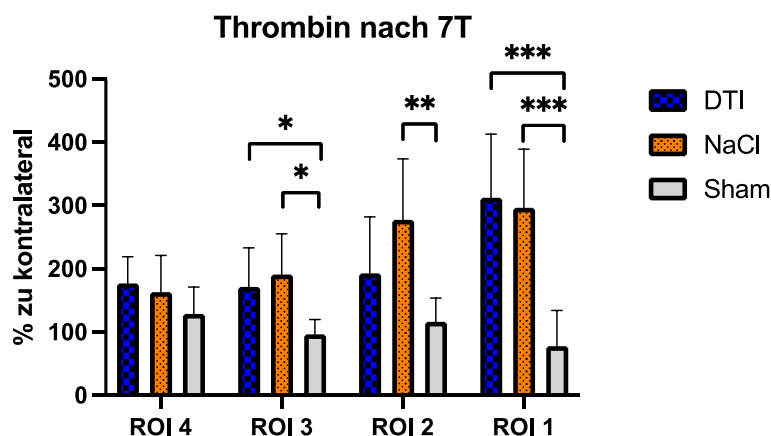


% zu kontralateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=8	130,87 +/- 20,40	123,15 +/- 9,13	151,78 +/- 19,17	134,42 +/- 7,61
ICB NaCl n=7	122,42 +/- 15,63	153,29 +/- 18,99	134,66 +/- 20,02	236,27 +/- 34,48
Sham n=5	147,68 +/- 15,60	107,82 +/- 9,28	125,36 +/- 10,37	177,60 +/- 18,88

Abbildung 27: Thrombin 3T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Abnahme der Thrombinreaktivität ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 3T, MW + SEM, In ROI 1 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen DTI- und sham-Gruppen mit $p=0,0313$, sowie zwischen DTI- und NaCl-Gruppe mit $p=0,0088$, Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

Nach 7T ist eine weitere prozentuale Zunahme an Thrombinreaktivität periläsional in allen Gruppen zu erkennen (siehe Abb. 28). In den läsionsnahen ROI's ist auch hier eine höhere Thrombinreaktivität zu erkennen, die nach peripher stetig abnimmt. In ROI1 und 2 ist eine höhere Thrombinreaktivität bei den operierten Tieren zu messen, verglichen mit den scheinoperierten Tieren. Dies ist jeweils statistisch signifikant mit p-Werten von jeweils $< 0,001$ in ROI 1 (NaCl vs. sham und DTI vs. sham). Dabei liegt in ROI 1 die Thrombinreaktivität bei den NaCl-Tieren bei 296,43 +/- 34,94%, bei der DTI-Gruppe bei 312,46 +/- 35,51%, bei der sham-Gruppe bei 77,59 +/- 25,15%. Zwischen den Interventionsgruppen ist kein signifikanter Unterschied zu messen. Die sham-Tiere zeigten untereinander keinen Unterschied in der Anfärbung von Thrombin.



% zu kontralateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=8	177,00 +/- 14,79	171,44 +/- 21,76	192,86 +/- 31,44	312,46 +/- 35,51
ICB NaCl n=7	163,00 +/- 21,86	190,88 +/- 24,36	277,17 +/- 36,43	296,43 +/- 34,94
Sham DTI n=5	128,60 +/- 18,93	96,32 +/- 10,59	116,08 +/- 16,83	77,59 +/- 25,15

Abbildung 28: Thrombin 7T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Abnahme der Thrombinreaktivität ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 7T, MW + SEM.

Signifikante Unterschiede finden sich zwischen DTI- und sham-Gruppen in ROI 3 ($p=0,0257$), ROI 1 ($p=0,0006$) und zwischen NaCl- und sham-Gruppen in ROI 3 ($p=0,0113$), ROI 2 ($p=0,0056$) und ROI 1 ($p=0,0008$), Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

5.4.5 Korrelation Neuronaler Schaden und Thrombin

Bei dem Vergleich zwischen periläsionalem Thrombinaufkommen und der Neuronenzellzahl periläsional zeigte sich eine negative Korrelation nach Spearman mit einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = -0,189$ und einem signifikanten p-Wert $<0,05$ (siehe Abb. 29). Bei Betrachtung der NaCl- und DTI-Gruppen und der Zeitgruppen 3T und 7T getrennt ergeben sich keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht dargestellt).

Korrelation neuronaler Schaden und Thrombin

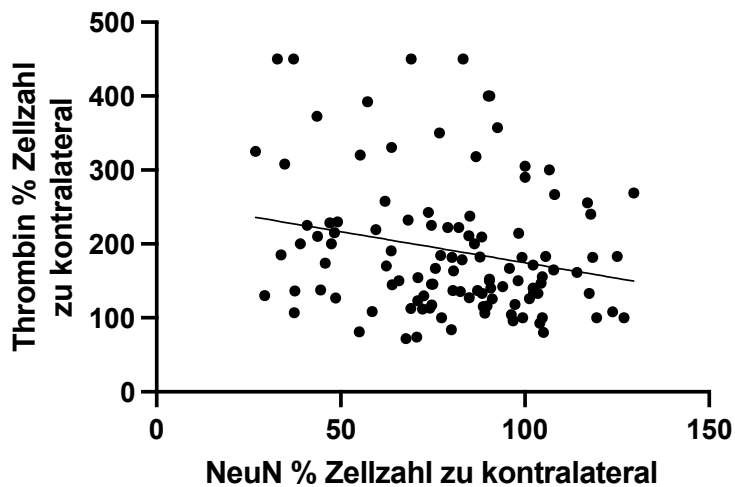
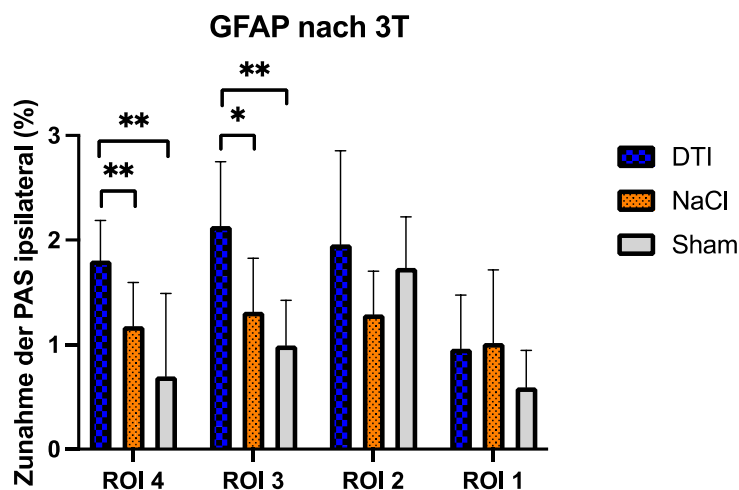


Abbildung 29: Korrelation zwischen Thrombinaufkommen und Neuronenzellzahl periläsional

Darstellung einer Korrelation zwischen der prozentualen Neuronenzellzahl ipsilateral (in Relation zu kontralateral) auf der x-Achse mit der prozentualen Zellzahl mit Thrombinanfärbung (ebenso ipsilateral in Relation zu kontralateral) auf der y-Achse. Es wurden jeweils die Werte von ROI 1 bis 4 aller Interventions- und Zeitgruppen zur Berechnung der Korrelation verwendet, $p=0,0461$, Spearman $r=-0,1889$, $n=112$

5.4.6 Astrozyten periläsional

Die Anfärbung von GFAP wurde wie bei der NeuN-Färbung im Verhältnis zur Gegenseite gemessen (siehe Abb. 13). Hier wurde (im Unterschied zu NeuN und Thrombin) die ipsilaterale Zunahme der PAS mit GFAP verglichen mit dem jeweiligen kontralateralen ROI. Nach 3T war bei allen Gruppen, sowohl den operierten als auch den scheinoperierten Tieren eine Anfärbung von GFAP periläsional zu beobachten, verglichen mit der kontralateralen Seite, auf der kaum bis keine Anfärbung zu sehen war (siehe Abb. 30). Die durchschnittliche Zunahme der PAS ipsilateral in ROI 1 und ROI 2 verglichen mit kontralateral bewegte sich um 1%. Weiter lateral der Läsion in ROI 3 und 4 färbten sich mehr GFAP an und es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Interventionsgruppen: Die DTI-Tiere zeigten in ROI 3 und 4, was 660-880 μ m lateral der Läsion entspricht, eine signifikant stärkere GFAP Anfärbung verglichen mit der NaCl- und mit der sham-Gruppe, p-Werte jeweils $<0,05$. Dabei liegt in ROI 4 die PAS bei den NaCl-Tieren bei $1,18 \pm 0,16\%$, bei der DTI-Gruppe bei $1,80 \pm 0,14\%$ und bei der sham-Gruppe $0,70 \pm 0,35\%$. In ROI 3 liegt die PAS bei den NaCl-Tieren bei $1,18 \pm 0,16\%$, bei der DTI-Gruppe bei $2,13 \pm 0,14\%$ und bei der sham-Gruppe bei $0,99 \pm 0,19\%$. Zwischen den beiden sham-Gruppen ist kein Unterschied erkennbar, jedoch ist eine große Streuung unter den einzelnen Tieren einer sham-Gruppe zu sehen.

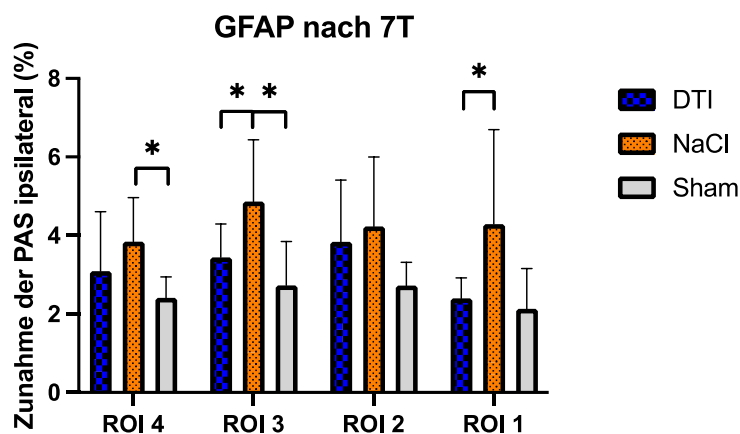


Zunahme der PAS ipsilateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=8	1,80 +/- 0,14	2,13 +/- 0,22	1,96 +/- 0,32	0,96 +/- 0,18
ICB NaCl n=7	1,17 +/- 0,16	1,31 +/- 0,19	1,29 +/- 0,16	1,02 +/- 0,26
Sham n=5	0,70 +/- 0,35	0,99 +/- 0,19	1,73 +/- 0,22	0,59 +/- 0,16

Abbildung 30: GFAP 3T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Zunahme der immunreaktiven Fläche der Astrozyten ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 3T, MW + SEM, in ROI 4 und ROI 3 zeigt sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen DTI- und NaCl-Gruppe mit $p=0,0094$ (ROI4) und $p=0,0156$ (ROI3), zwischen DTI und sham-Gruppen mit $p=0,0056$ (ROI4) und $p=0,0041$ (ROI3), Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

Nach 7T ist weiterhin mehr GFAP ipsilateral bei allen Tieren angefärbt im Vergleich zur Gegenseite. Verglichen mit der 3T-Gruppe ist prozentual mehr GFAP angefärbt und bewegt sich in allen ROI's der sham-Gruppe um 2% (siehe Abb. 31). Operierte Tiere zeigen eine stärkere GFAP-Anfärbung als sham-Tiere. In ROI3 zeigen die NaCl-Tiere signifikant mehr GFAP-Anfärbung verglichen mit den DTI- und sham-Tieren, p-Werte jeweils $<0,05$, in ROI 3 liegt die PAS bei der DTI-Gruppe bei $3,44 \pm 0,30\%$, in der NaCl Gruppe bei $4,86 \pm 0,60\%$ und in der sham-Gruppe bei $2,73 \pm 0,50\%$. Zwischen den beiden sham-Gruppen ist kein Unterschied messbar.



Zunahme der PAS ipsilateral	ROI 4	ROI 3	ROI 2	ROI 1
ICB DTI n=8	3,09 +/- 0,54	3,44 +/- 0,30	3,84 +/-0,56	2,40 +/-0,18
ICB NaCl n=7	3,85 +/- 0,42	4,86 +/- 0,56	4,23 +/- 0,67	4,29 +/- 0,91
Sham n=5	2,41 +/- 0,24	2,73 +/- 0,50	2,72 +/- 0,26	2,13 +/- 0,46

Abbildung 31: GFAP 7T-Gruppe

Darstellung der prozentualen Zunahme der immunreaktiven Fläche der Astrozyten ipsilateral (in Relation zu kontralateral) in den einzelnen ROI's 1-4 der DTI-Gruppe (blau), der NaCl-Gruppe (orange) und der sham-Gruppen (grau) nach 7T, MW + SEM, Statistische Unterschiede zeigen sich in ROI 4 zwischen NaCl- und sham-Gruppe ($p=0,0248$), in ROI 3 zwischen DTI- und NaCl-Gruppe ($p=0,0447$) sowie zwischen NaCl- und sham-Gruppen ($p=0,0269$) und in ROI 1 zwischen DTI- und NaCl-Gruppe ($p=0,0492$), Signifikanzen berechnet mit multiple unpaired t-tests

5.4.7 Korrelation Astrozyten periläsional und Thrombin

Bei dem Vergleich zwischen periläsionalem Thrombinaufkommen und der immunreaktiven Fläche der Astrozyten periläsional zeigte sich eine positive Korrelation nach Spearman mit einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,3022$ und einem signifikanten p-Wert $< 0,001$ (siehe Abb. 32). Bei Betrachtung der NaCl- und DTI-Gruppen getrennt, ergeben sich auch positive Korrelationen mit $p=0,0396$ (nur DTI) und $p=0,0124$ (nur NaCl). Bei Betrachtung der Zeitgruppen 3T und 7T getrennt zeigen sich keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht dargestellt).

Korrelation Astrozyten und Thrombin

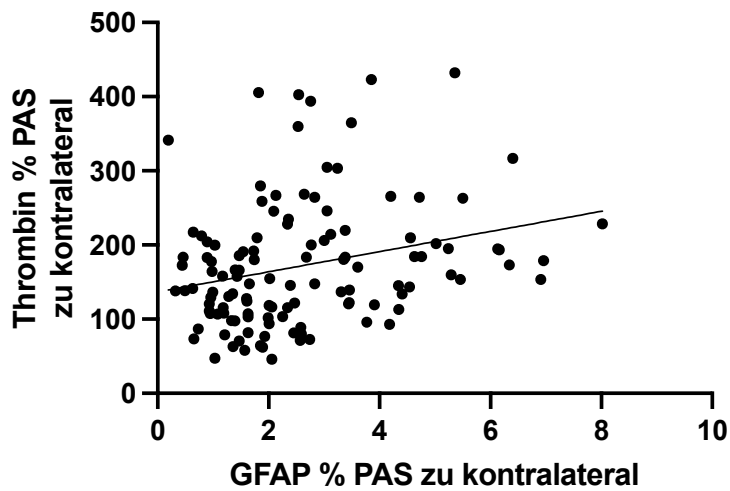


Abbildung 32: Korrelation Astrozyten und Thrombin

Darstellung einer Korrelation zwischen der prozentualen PAS der Astrozyten ipsilateral (in Relation zu kontralateral) auf der x-Achse und der PAS von Thrombin (ebenso ipsilateral in Relation zu kontralateral) auf der y-Achse. Es wurden jeweils die Werte von ROI 1 bis 4 aller Interventions- und Zeitgruppen zur Berechnung der Korrelation verwendet, $p=0,0008$, Spearman $r=0,3033$, PAS = percent-area-stained, $n=120$

6. Diskussion

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 ICB im Mausmodell

Um ICBs kontrolliert und reproduzierbar zu erzeugen und die pathophysiologischen Vorgänge von ICBs zu untersuchen, wurde 2004 für die Maus ein Eigenblut-Infusionsmodell erstmals etabliert. Dabei wird die Maus unter Narkose in einem stereotaktischen Rahmen platziert und eine Bohrlochtrepantation 2,5mm lateral der Mittellinie durchgeführt. Im Anschluss wird eine 25-30 Gauge Nadel stereotaktisch in die Basalganglien eingeführt und 30 μ l Eigenblut injiziert, das zuvor an der Schwanzvene entnommen wurde. Diese Menge entspricht einem durchschnittlichem Hämatomvolumen von 60ml beim Menschen und führt zu messbarem und reproduzierbarem Hirnödemen sowie zu neurologischen Defiziten bei der Maus (Nakamura, Xi et al. 2004). In weiteren Untersuchungen wurde ein Zwei-Stufen-Modell etabliert, das den natürlichen Vorgang einer ICB besser imitiert und Extravasation in den Subarachnoidalraum sowie in den Ventrikel limitiert. Es werden zunächst 5 μ l infundiert und nach 7 Minuten die restlichen 25 μ l, sodass ein zu schneller, unphysiologischer Anstieg des Hirndrucks vermieden wird. Bei den scheinoperierten Tieren als Kontrollgruppe wird lediglich die Hamilton-Nadel eingeführt und keine Injektion von Blut durchgeführt. Die Nadel verbleibt so lange im Gehirn, wie die Injektion bei den operierten Tieren dauert (Belayev, Saul et al. 2003, Rynkowski, Kim et al. 2008). Dieses Modell stellt eine reproduzierbare Methode dar, um ICB bei der Maus zu untersuchen.

Im hier verwendeten ICB-Modell wurde autologes Blut über die stereotaktisch eingebrachte Hamilton-Nadel manuell appliziert, folgend dem Modell von Rynkowski et al., mit wenigen Modifizierungen (Rynkowski, Kim et al. 2008). Es wurden für die ICB, wie in vorhergehenden Untersuchungen, ein Volumen von 30 μ l appliziert, was einem durchschnittlichen ICB-Volumen von 60ml beim Menschen entspricht (Nakamura, Xi et al. 2004, Krenzlin, Gresser et al. 2020). Die Injektion wurde über ein Zwei-Stufen-Modell vorgenommen, um den natürlichen Vorgang einer ICB besser zu imitieren (Wang, Fields et al. 2008). Um eine ICB im Tiermodell zu imitieren, gibt es verschiedene Herangehensweisen, bei denen jeweils unterschiedliche Probleme auftreten können. Einige Studien verwendeten zur Applikation von autologem Blut oder Kollagenase eine Mikroinfusionspumpe (Belayev, Saul et al. 2003, Kitaoka, Hua et al. 2003, Nakamura, Xi et al. 2004, Nagatsuna, Nomura et al. 2005, Krenzlin, Gresser et al. 2020). Durch Verwenden dieser Infusionspumpe ist es denkbar, genauere und gleichmäßigere Geschwindigkeiten der Injektion zu erreichen. Auf der anderen Seite ist durch die manuelle Applikation ein Einschreiten bei Auftreten von Komplikationen oder Schwankungen der Überwachungsparameter besser möglich.

Verglichen mit dem Kollagenasemodell hat das ICB Modell mit Verwendung von autologem Blut ein höheres Risiko von Abflussstörungen des Blutes in den subduralen oder intraventrikulären Raum (Manaenko, Chen et al. 2011). Auch die Geschwindigkeit der Applikation spielt eine Rolle bei der Verteilung des Blutes. Eine zu hohe Applikationsgeschwindigkeit erhöht das Risiko von Zurücklaufen des Blutes aus der Einstichstelle und führt zu größeren Schwankungen der Hämatomgröße bei den operierten Tieren. Diese Problematik wurde ebenso bei einer Infusionsmenge von 20-30 μ l autologen Blutes beobachtet, sodass die Arbeitsgruppe von Wang et al. ein verbessertes, reproduzierbares ICB-Modell vorstellte mit einer deutlich geringeren Injektionsmenge von 10 μ l, einer Applikationsgeschwindigkeit von 0,2 μ l/min und einem Verbleib der Nadel 20 Minuten nach Injektion (Wang, Fields et al. 2008). Die Volumenmenge der ICB zeigte in unseren Tieren größere Schwankungen und subdurale oder intraventrikuläre Blutungen ließen sich bei einigen Tieren nachweisen, sodass dies sich möglicherweise durch Anpassen des Modells verhindern ließe.

Von den 48 operierten Tieren sind insgesamt 6 verstorben und konnten nicht in die Auswertung einbezogen werden. Davon ist ein Tier bereits präoperativ nach der Narkose verstorben, 2 waren scheinoperierte Tiere und 3 ICB-Tiere. Bei der Obduktion der verstorbenen Tiere fanden sich in 2 der 3 operierten ICB-Tiere der NaCl-Gruppe große intrakranielle Hämatome, die durch das ICB-Modell erklärt werden könnte, 2 scheinoperierte Tiere wiesen in keinem der angefärbten Schnitte eine Einstichstelle und eines der ICB-Tiere wies keine Blutung auf, sodass diese Tiere ebenso nicht ausgewertet werden konnten. Eine Optimierung des ICB-Modells durch Verwendung von Infusionspumpen oder eine langsamere Applikation geringerer Mengen autologen Blutes könnte diese Probleme verhindern.

6.1.2 Verhaltenstests

Zur Beurteilung des neurologischen Outcomes wurden zwei Verhaltenstests verwendet. Einerseits wurde der NSS der Tiere erhoben und andererseits der Rotarod Test durchgeführt (Hamm, Pike et al. 1994, Shohami, Novikov et al. 1995)

Dabei fiel auf, dass die Mäuse im Rotarod Test lediglich am ersten postoperativen Tag ein Defizit aufwiesen und in den darauf folgenden Tagen zunehmend länger auf dem Gerät laufen konnten. Des weiteren zeigte sich im Rotarod Test kein Unterschied zwischen den operierten und den scheinoperierten Tieren. Daher scheint dieser Test in unseren Untersuchungen für die Beurteilung des neurologischen Outcomes nach ICB bei Mäusen nicht aussagekräftig zu sein, was sich mit den Ergebnissen in der Literatur unterscheidet (Curzon, Zhang et al. 2009, Jin, Zhou et al. 2020).

Im NSS wurden Defizite vor allem in den ersten 3T postoperativ gemessen, danach waren kaum noch Defizite messbar. In diesem Test zeigten die ICB-Tiere größere Defizite als die

scheinoperierten Tiere. Der Test umfasst mehrere Aufgaben, und es war auffällig, dass die größten Defizite der operierten Tiere in denjenigen Aufgaben zu sehen waren, die eine willkürliche Initiation erforderten, wie beispielsweise der *Beam Walk* Test. Die Evaluierung des neurologischen Status lässt sich einteilen in die Beurteilung der begrenzten Bewegung und der freien Bewegung (Chen, Xia et al. 2019). Der *Beam Walk* Test zählt zu den freien Bewegungen, während der *Pole grip* Test oder das Laufen auf dem Rotarod zu den begrenzten Bewegungen zählen, da das Tier zur Bewegung durch äußere Faktoren animiert wird. Einschränkungen in der begrenzten Bewegungen zeigen sich vor allem durch Schäden am neuromuskulären Kreislauf, während Einschränkungen in der freien Bewegung zusätzlich von Faktoren wie Schmerz, Stimmung und Lernverhalten beeinflusst werden. Dies könnte erklären, warum die operierten Mäuse im NSS ein höheres Defizit aufwiesen, als im Rotarod Test. Dadurch stellt sich die Frage, ob für den langfristige Messung des neurologischen Outcomes nach ICB im Mausmodell eine andere Zusammenstellung und eine größere Auswahl von Tests sensitiver wäre (MacLellan, Auriat et al. 2006).

6.1.3 Färbungen und Auswertung

Für die konventionell-histologische Diagnostik und Immunhistologie kann die Asservierung von Gewebe entweder in gepuffertem Paraformaldehyd oder durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff oder Isopentan erfolgen. Der Goldstandard für die Fixierung von Gewebe für Histologie und Immunhistologie stellt die Formalinfixierung dar. Vorteile der Formalinfixierung sind ein maximaler Erhalt der Morphologie und die Möglichkeit der langfristigen Lagerung. Zeitpunkt und Dauer der Fixierung ist dabei von großer Wichtigkeit, da eine verzögerte Fixierung zu ungleichmäßiger Verteilung der Querverbindungen führt, während eine Fixierung über 24 Stunden übermäßige Querverbindungen des Formalins im Gewebe zur Folge hat (Werner, Chott et al. 2000). Nachteilig an der Formalinfixierung ist das Risiko einer Reduktion der Immunreaktivität durch Querverbindungen innerhalb des Antigenepitops. Manche Antigene werden durch das Formalin zerstört, sodass für deren Untersuchung das Gewebe schockgefroren sein muss (Ramos-Vara 2011). Um die Immunreaktivität zu verbessern, kann vor der Färbung ein Enzymverdau oder Antigen-Retrieval durchgeführt werden. Dies wurde bei unserer Thrombinfärbung angewandt, da für diese Antigenfärbung das Retrieval zu besseren Ergebnissen geführt hat (Ward and Rehg 2014). Durch Verwendung schockgefrorener Hirne könnte die Thrombinfärbung möglicherweise weiter verbessert werden.

Ein weiteres mögliches Problem beim Färben ist die Bildung von Gefrierartefakten durch Kristallbildung. Dies tritt auf, wenn die Geschwindigkeit des Einfrierens zu gering ist. Beim Schockgefrieren von Gewebe in Isopentan können diese Gefrierartefakte limitiert werden. Andererseits ist bei der Asservierung von großen Gewebeproben, wie auch bei Maushirnen, durch Einlegen des Gewebes in Sucrose ein besserer Gefrierschutz beschrieben (Hare,

George et al. 2014). In unseren Schnitten zeigten sich jedoch geringe Gefrierartefakte, die möglicherweise durch Auftauen des Hirns vor dem Schneiden am Kryostaten entstanden sind. Um dies weiter zu minimieren wurde der Transport der Hirne vom Gefrierschrank zum Kryostaten auf Trockeneis durchgeführt.

Das Setzen der zu untersuchenden Regionen kann aufgrund verschiedener Faktoren erschwert sein. Das Hämatom kann bei diffuser Verteilung des Blutes oder bei Entstehen von Narbengewebe im Bereich der ICB nicht eindeutig abgrenzbar sein. So kann die Positionierung der Regionen zu Schwankungen in den Bewertungen führen. Gleichzeitig ist das Anlegen der Regionen an die ICB einem gewissen Maß an Subjektivität ausgesetzt, wodurch die Interrater-Reliabilität herabgesetzt sein könnte. Bei den sham-Tieren wurde die auszuwertende Region direkt neben den Einstichkanal der Nadel gesetzt, was den geringen Zellschaden in ROI1 durch die Nadel selbst in der Auswertung erklärt.

In den ausgewählten Regionen kann es durch die Färbe- und Schneidetechniken zu Falten oder Rissen im Gewebe kommen, sodass in diesen Fällen die zu untersuchende Region an eine andere Stelle gesetzt werden musste oder nicht ausgewertet werden konnte. Für jedes Tier wurden die Regionen individuell positioniert. So wurde beispielsweise an Läsionen, die teilweise durch das Corpus Callosum oder den Kortex gingen, keine Regionen gesetzt. Dadurch werden die Auswertungen zwar genauer, der Datensatz wird jedoch weiter verkleinert.

Im verwendeten Programm Fiji wurden die einzelnen ROI's in Schwarz-Weiß kontrastiert und der Threshold je nach Belichtungsverhältnissen und Färbeintensität so eingestellt, dass alle spezifisch angefärbten Zellen oder Zellanteile angezeigt werden. Dies kann aufgrund starker Hintergrundfärbung oder unspezifischen Anfärbungen erschwert sein. Um diesen Faktor möglichst zu minimieren, wurde das jeweils kontralaterale ROI als Referenz genommen und derselbe Threshold ipsilateral eingestellt. Dieses Vorgehen setzt jedoch eine gleichmäßige Verteilung der Zellanfärbung innerhalb eines Hirnschnittes voraus, was nicht immer der Fall war. Vor allem die immunhistologischen Anfärbung von Thrombin wies starke Hintergrundfärbung auf, was die Auswertung maßgeblich erschwerte. Das Färbeprotokoll wurde daraufhin angepasst und eine verbesserte Färbung mithilfe der automatisierten Färbung in der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz und Einsetzen eines Antigen-Retrieval erreicht. Trotzdem ließ sich die Hintergrundfärbung nicht vollständig eliminieren. Es wäre für weitere Untersuchungen hilfreich, Hintergrundfärbungen weiter zu reduzieren und Färbetechniken zu optimieren.

6.2 Ergebnisdiskussion

6.2.1 Nach ICB kommt es periläsional zu einem Anstieg an Thrombin

Es konnte gezeigt werden, dass es bei den operierten Tieren sowohl nach 3T als auch nach 7T zu einem periläsionalen Anstieg von Thrombin kommt (siehe Abb. 27 und 28). In den direkt der Läsion angrenzenden ROI's fällt dies deutlicher aus und nimmt nach peripher stetig ab. Gleiches ließ sich in vorhergehenden Untersuchungen 24 Stunden nach ICB im Mausmodell zeigen (Krenzlin, Gresser et al. 2020). Diese Ergebnisse decken sich zudem mit denen von Bushi et al., wobei in jenen Untersuchungen die Thrombinaktivität durch Quantifizierung von Spaltprodukten und nicht das Vorhandensein von Thrombin selbst gemessen wurde (Bushi, Chapman et al. 2013). Auch in Rattenmodellen konnte nachgewiesen werden, dass um die zerebrale Ischämie oder um die ICB ein höheres Thrombinaufkommen zu sehen ist (Gong, Xi et al. 2008, Chen, Friedman et al. 2012) und die Prothrombinexpression hochreguliert wird (Riek-Burchardt, Striggow et al. 2002).

Die Zunahme an periläsionalem Thrombin ipsilateral verglichen mit der Gegenseite fällt nach 7T deutlicher aus, als nach 3T. Es wurde in der Literaturrecherche keine Studie zum Langzeitverlauf des periläsionalen Thrombinaufkommens nach zerebralem Schaden im Tiermodell gefunden. Beim Menschen konnte eine erhöhte Thrombinaktivität nach Subduralblutung bis zu 14 Tagen im Liquor nachgewiesen werden (Suzuki, Ogawa et al. 1992).

Trotz des größeren Hämatomvolumens der argatrobanbehandelten Tiere nach 3T ist kein höheres Thrombinaufkommen in dieser Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, nachweisbar. Im Gegenteil, es wurde in den läsionsnahen ROI signifikant weniger Thrombin in der DTI-Gruppe angefärbt. Dieses Ergebnis könnte durch den reduzierten neuronalen Schaden in der DTI-Gruppe zu erklären sein.

Thrombin wird nicht nur über das Blut und den Zusammenbruch der BBB an die Läsionsstelle gebracht. Auch durch den Schaden selbst und den dadurch entstehenden Gewebedruck wird das zerebrale Thrombinsystem aktiviert und die Expression von Prothrombin hochreguliert (Chen, Friedman et al. 2012, Krenzlin, Gresser et al. 2020). Größerer neuronaler Schaden führt demnach zu höherem Thrombinaufkommen. Da nach 3T Argatrobanbehandlung in unseren Untersuchungen der neuronale Zelltod und das periläsionale Thrombinaufkommen geringer ausfiel als in der Kontrollgruppe, könnte dies in einem kausalen Zusammenhang stehen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die reduzierte Thrombinmenge bei den argatrobanbehandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe ist die Hemmung der weiteren Thrombinbildung durch das Medikament. Bisher konnte dies für neuronales Thrombin noch nicht gezeigt werden, jedoch ist bekannt, dass Thrombin im Plasma die Expression

prokoagulatorischer Aktivität auf der Thrombozytenoberfläche triggert, was zur weiteren Bildung von Thrombin führt; es amplifiziert damit seine eigene Produktion (Handin 2003, Foley and Conway 2016). Argatroban bindet an das katalytische Zentrum von Thrombin und hemmt dessen weitere Funktionen reversibel, somit könnte durch die Argatrobanbehandlung auch im Gewebe die lokale, zusätzliche Thrombinbildung limitiert worden sein.

6.2.2 Ein höheres Thrombinaufkommen korreliert mit dem Ausmaß des neuronalen Schadens

Es wurde für die beiden Interventionsgruppen für jeweils ROI1 bis ROI 4 eine Korrelation zwischen der neuronalen Zellzahl angrenzend an die Läsion und dem periläsionalen Thrombinaufkommen durchgeführt (siehe Abb. 29). Die prozentuale Neuronenzahl ipsilateral in Relation zu kontralateral zeigte eine signifikante, negative Korrelation mit dem Aufkommen von Thrombin periläsional mit einem Korrelationskoeffizienten nach Spearman von $\rho = -0,189$. Dass bei der Korrelation der einzelnen Untergruppen keine signifikanten Unterschiede zu sehen war, lag wahrscheinlich an der Gruppengröße. Dies zeigt, dass in Bereichen mit erhöhtem neuronalen Schaden ein höheres Thrombinaufkommen zu messen war. Das legt nahe, dass Thrombin eine zentrale Rolle in der Vermittlung des neuronalen Schadens nach ICB spielt, was den bisherigen Ergebnissen in der Literatur entspricht. Bei den Untersuchungen von Bushi et al. korrelierte das Infarktvolumen mit der Thrombinaktivität in Maushirnen 24 Stunden bis 3T nach zerebraler Ischämie (Bushi, Chapman et al. 2013). In Hirnschnitten der Ratte wurde der Thrombin-induzierte Zellschaden untersucht und zeigte im zunehmenden Zeitverlauf eine erhöhte Zytotoxizität abhängig von der Thrombinkonzentration (Fujimoto, Katsuki et al. 2006). Auch mit *in vitro* Studien decken sich diese Ergebnisse. Durch hohe Konzentrationen von Thrombin kommt es in Zellkulturen aus dem Hippocampus der Ratte nach Sauerstoffentzug zu erhöhtem neuronalen Schaden und durch sehr hohe Konzentrationen zum direkten Zelltod (Striggow, Riek et al. 2000). Diese Ergebnisse bestätigen weiter, dass die Effekte von Thrombin konzentrationsabhängig sind. Dass das höhere Thrombinaufkommen mit höherem neuronalem Schaden assoziiert ist, könnte durch Thrombin-induzierte Apoptose bei hoher Konzentration erklärbar sein. Der kleinere neuronale Schaden könnte durch zellprotektive Effekte aufgrund geringerer Thrombinkonzentration und dadurch geringerer Aktivierung des RhoA-Signalweges bedingt sein (Posma, Posthuma et al. 2016). Dass in unseren Untersuchungen bei der Korrelation der einzelnen Untergruppen keine signifikanten Unterschiede zu sehen war, lag wahrscheinlich an der Gruppengröße und stärkeren Streuung der Daten innerhalb der DTI-Gruppe.

Der Thrombin-induzierte neuronale Schaden wurde in vielen Studien untersucht und kann über mehrere Signalwege vermittelt werden (Babu, Bagley et al. 2012). Trotzdem könnte der neuronale Schaden periläsional ebenso über andere Mechanismen, als durch die erhöhte Thrombinmenge vermittelt worden sein.

6.2.3 Argatroban verringert den periläsionalen neuronalen Schaden nach ICB

Bei den operierten Tieren konnte nach 3T histologisch ein periläsionaler neuronaler Schaden bis zu einem Abstand von 880 μ m lateral des Hämatoms gemessen werden (siehe Abb. 25). In vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten Mäuse nach 24 Stunden einen periläsionalen neuronalen Schaden bis zu einem Abstand von circa 440 μ m lateral der Läsion, was eine Expansion des Schadens nach 3T aufzeigt (Krenzlin, Gresser et al. 2020). Das größere Läsionsareal könnte jedoch auch durch Expansion des Gewebes aufgrund des vasogenen Ödems entstanden sein. Viele Untersuchungen konnten durch Thrombininhibition in Tiermodellen eine Reduktion des ICB-assoziierten, periläsionalen Ödems erreichen (Lee, Kawai et al. 1997, Kitaoka, Hua et al. 2003, Fujimoto, Katsuki et al. 2006, Hua, Keep et al. 2007, Bodmer, Vaughan et al. 2012). Auch bei Menschen wurde die Reduktion des Hirnödems durch intravenöse Gabe von Argatroban in kleinen klinischen Studien gezeigt (Hamada and Matsuoka 2000).

Durch die Applikation von Argatroban konnte nach 3T eine signifikante Reduktion des periläsionalen neuronalen Zelltods erreicht werden, wodurch ein neuroprotektiver Effekt des DTI vermutet werden kann (siehe Abb. 25). Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Chen et al; hier zeigte sich ebenso ein reduzierter neuronaler Zelltod 24 Stunden nach zerebraler Ischämie im Rattenmodell durch Behandlung mit Argatroban. Auch in weiteren Studien wurde eine Reduktion des periläsionalen, neuronalen Zelltods durch DTI-Gabe nach zerebralem Schaden gefunden, wobei einerseits das Zeitfenster für die Applikation zwischen einer Stunde vor und 4 Tagen nach ICB oder zerebraler Ischämie, andererseits die Applikationsform variiert (Mima, Jin et al. 2000, Ohnishi, Katsuki et al. 2007, Chen, Friedman et al. 2012). In Gewebeschnitten von Rattenhirnen konnte durch die Gabe von Argatroban der Thrombin-induzierte Zelltod ebenfalls reduziert werden, dabei zeigte sich nach 3T der größte Effekt (Fujimoto, Katsuki et al. 2006).

Nach 7T zeigt sich bei unseren Ergebnissen kein Unterschied mehr zwischen den Interventionsgruppen (siehe Abb. 26). Der neuronale Schaden ist im Vergleich zur 3T-Überlebensgruppe kleiner und beläuft sich auf eine Größe von 220-440 μ m lateral der Läsion. Im ICB-Modell der Ratte zeigt sich der an die ICB angrenzende neuronale Zelltod nach 24 Stunden am meisten ausgeprägt und löst sich nach 7T auf. Über die Zeit werden die abgestorbenen Zellen durch Mikroglia abgeräumt, die Densität der Neuronen nimmt ab und es entsteht Narbengewebe mit kompensatorischer Dilatation des ipsilateralen Ventrikelsystems (Felberg, Grotta et al. 2002, Trepel 2004). Die Abnahme des periläsionalen neuronalen Zellschadens über die Zeit und das Auflösen nach 7T konnte hier annähernd in gleichem Maße gezeigt werden.

Intakte Neuronen exprimieren das nukleäre Protein und es wurde in der Literatur diskutiert, ob eine verminderte Anfärbung von NeuN mit verminderter Expression des Proteins oder mit dem Verlust der Neuronen einhergeht und damit, ob eine Reduktion der Anfärbung mit neuronalem Schaden gleichzusetzen ist. Es konnte jedoch durch Western Blot Analysen gezeigt werden, dass der Verlust der Immunreaktivität von NeuN zu keiner Reduktion der Expression des Proteins sondern ein Ausdruck reduzierter Antigenität in degenerativen Neuronen ist, sodass an dieser Stelle von neuronalem Schaden gesprochen werden kann (Collombet, Masqueliez et al. 2006).

Die Gruppe von Yang et al. hat die Effekte von Thrombin und Neurogenese untersucht und konnte zeigen, dass 7T nach einer ICB im Rattenmodell die Menge an doublecortin, einem unreifen neuronale Marker, ipsilateral ansteigt und die Neurogenese beginnt. Die Injektion einer geringen Thrombindosis, die keinen neuronalen Schaden verursacht, ins Caudatum der Tiere konnte diese Neurogenese induzieren (Yang, Song et al. 2008). Dies zeigt, dass es nach einer ICB zu einer neuralen Regeneration kommt und eine geringe Thrombinmenge zur Erholung des Gewebes beitragen könnte. Gleichzeitig könnte ein Mangel an Unterschied zwischen den Interventionsgruppen nach 7T auch ein Zeichen von Adaption der Mäuse an den Schaden sein.

6.2.4 Durch Argatroban kommt es nach ICB initial zu vermehrter Inflammation, langfristig senkt es die Stärke der Gliose

In beiden Interventionsgruppen kam es sowohl nach 3T als auch nach 7T zu einer Zunahme an Astrozyten periläsional (siehe Abb. 30 und 31). Dies zeigt sich nach 7T ausgeprägter als nach 3T in beiden Gruppen, jeweils verglichen mit den scheinoperierten Tieren. Ähnliche Ergebnisse finden sich in der Literatur. Nach 3T zeigt sich bei Mäusen mit ICB ein verstärkte Astrozytenanfärbung ipsilateral verglichen zu kontralateral (Nagatsuna, Nomura et al. 2005, Wang 2010). In einem Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass es nach Induktion einer ICB durch intrazerebroventrikulärer Thrombininjektion zu einem Anstieg an Astrozyten nach 7T kommt, welches sich nach 14 Tagen rückläufig zeigt (Liu, Ander et al. 2010). Ein stetiger Anstieg der GFAP-positiven Astrozyten über einen Zeitraum von 1 bis 7T nach zerebralem Schaden wurde auch bei den Untersuchungen von Kubo et al. im Rattenmodell nachgewiesen (Kubo, Suzuki et al. 2000). Die deutliche Zunahme an GFAP-positiven Astrozyten nach 7T könnte in einem Zusammenhang zu dem Anstieg des periläsionalen Thrombinaufkommens nach den 7T stehen. Dies spiegelt sich auch in der Korrelationsanalyse von Thrombin und Astrozyten wieder, in der sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der periläsionalen Astrozyteneinwanderung und dem periläsionalen Thrombin über alle Zeitgruppen hinweg zeigte (siehe Abb. 32). Thrombin führt zu Inflammation, Narbenbildung und reaktiver Astrogliose nach zerebralem Schaden. Zu einem geringen Anteil, wird Thrombin

in Gliazellen exprimiert, sodass bei starker Astrozytose eine erhöhte Thrombinmenge erwartet werden kann (Chen, Friedman et al. 2012).

Weitere *in vivo* Studien zeigten ebenfalls die Beteiligung von Thrombin an der Entstehung einer Glianarbe und demonstrierten im Rattenmodell eine Zunahme an Vimentin-positiven Astrozyten durch Thrombininfusion in den Nucleus caudatus (Nishino, Suzuki et al. 1993). Vimentin stellt, wie GFAP, ein Proliferationsmarker der Astrozyten dar und wird für immunhistologische Färbungen verwendet. In einigen Studien wird die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der GFAP-positiven und Vimentin-positiven Zellen aufgezeigt. Es wird angenommen, dass VIM- oder GFAP-exprimierende, proliferierende Astrozyten um eine zerebrale Läsion sich innerhalb des Schadensgebiets unterschiedlich verteilen (Janeczko 1993). Eine andere Möglichkeit ist, dass es durch Thrombin-unabhängige Faktoren zu GFAP-Anfärbung kommt und Thrombin eine untergeordnete Rolle in der Anfärbung von GFAP-positiven Astrozyten spielt, verglichen mit VIM-positiven Astrozyten, da durch den direkten Thrombininhibitor Hirudin VIM-positive Astrozyten nach zerebralem Schaden reduziert werden konnten (Motohashi, Suzuki et al. 1997). Andere Untersuchungen, die VIM und GFAP-Anfärbungen miteinander verglichen, konnten vor allem in der weißen Hirnsubstanz eine sensitivere Immunreaktivität von VIM verglichen zu GFAP zeigen (Ekmark-Lewén, Lewén et al. 2010).

Interessanterweise wurde in unseren Ergebnissen bei den argatrobanbehandelten Tieren nach 3T in der peripheren ROI's signifikant mehr GFAP angefärbt, verglichen mit den NaCl-behandelten Tieren. Diese Ergebnisse unterschieden sich mit denen in der Literatur. In Untersuchungen von Kubo et al. zeigte sich in einem Rattenmodell zwar ein Anstieg der periläsionalen GFAP-Anfärbung 3T nach zerebralem Schaden, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den Argatroban-behandelten und den NaCl-behandelten Tieren. Sie untersuchten außerdem VIM-positive Astrozyten. Dabei ließ sich ein Unterschied zwischen den Interventionsgruppen sehen, wobei die DTI-Tiere weniger VIM-positive Astrozyten aufwiesen und somit durch die Thrombininhibition eine Reduktion der Glianarbe beschrieben wird (Kubo, Suzuki et al. 2000). In Untersuchungen von Nagatsuna et al. wurde in einem ICB-Mausmodell nach 3T GFAP-positive und VIM-positive Astrozyten angefärbt und auch hier zeigte sich eine Reduktion der VIM-positiven Astrozyten ohne Reduktion der GFAP-positiven Astrozyten nach Behandlung mit Argatroban (Nagatsuna, Nomura et al. 2005). Die verstärkte inflammatorische Reaktion im Sinne einer verstärkten GFAP-Reaktivität der DTI-Gruppe nach 3T in unseren Untersuchungen könnte durch das vergrößerte Hämatomvolumen dieser Gruppe zu erklären sein. Ein größeres Hämatomvolumen bzw. eine stärkere Verteilung des Blutes im Gewebe könnte dazu führen, dass mehr Zellen Kontakt zu Thrombin aus dem Blut und aus den Neuronen haben und damit eine stärkere Inflammationsreaktion injizieren. Neben Thrombin sind jedoch auch andere Gründe für eine verstärkte GFAP-Reaktivität möglich.

Nach 7T zeigen sich in unseren Interventionsgruppen andere Ergebnisse: in ROI3 und ROI1 waren bei den argatrobanbehandelten Tieren signifikant weniger GFAP-positive Astrozyten zu sehen, verglichen mit den NaCl-behandelten Tieren. Es könnte somit erst durch die längerfristige Behandlung mit Argatroban zu einer Reduktion der Astrozytenaktivierung gekommen sein. Dies korreliert mit den Befunden von verschiedenen Studien, in denen jedoch eine Reduktion der VIM-positiven (und nicht der GFAP-positiven) Astrozyten durch die Behandlung mit einem DTI zu sehen war (Motohashi, Suzuki et al. 1997, Kubo, Suzuki et al. 2000).

Nach zerebralem Schaden werden durch inflammatorische Prozesse Astrozyten aktiviert, um den Gewebeschaden zu reparieren. Zusammen mit aktivierten Mikroglia, Leukozyten, Makrophagen sind sie wichtige zelluläre Mediatoren des sekundären Schadens nach ICB. Werden Astrozyten aktiviert, kommt es zur Proliferation des Zellkörpers und zur Erhöhung der Produktion von GFAP, das zur reaktiven Gliose führt. (Wang 2010). Die Thrombin-induzierte Astrozytenaktivierung scheint PAR-1 vermittelt zu sein, da PAR-1 knockout Tiere eine reduzierte astrozytäre Antwort auf zerebralen Schaden zeigen und diese Astrozytenproliferation durch PAR-1-Agonisten imitiert werden kann (Nicole, Goldshmidt et al. 2005, Radulovic, Yoon et al. 2016, Rajput, Lamb et al. 2020). Durch die Behandlung von Argatroban nach ICB bei Ratten konnte die PAR-1 Expression reduziert werden (Zhou, Qu et al. 2011). Auch die anderen Thrombinrezeptoren PAR-2, PAR-3 und PAR-4 werden in Astrozyten exprimiert und haben durch ihre Aktivierung einen Einfluss auf die Proliferation der Gliazellen in unterschiedlicher Weise. So führt deren Aktivierung wie durch PAR-1 auch durch PAR-2 und PAR-3 zu einer Proliferation, während PAR-4-Aktivierung zu einer Reduktion der Gliazellzahl führt. Diese verschiedenen Wege sind konzentrations- und zeitabhängig (Wang, Ubl et al. 2002). Somit könnte die höhere Astrozytenaktivierung bei den operierten Tieren nach 7T durch die höhere Menge an Thrombin zu dieser Zeit weiter begründet werden, da höhere Konzentrationen von Thrombin erst zur Aktivierung der PAR-3 in Astrozyten und damit zur weiteren Proliferation führen (Wang, Ubl et al. 2002).

6.2.5 Das Hämatomvolumen der ICB ist durch die Therapie mit Argatroban vergrößert

Das Hämatomvolumen der argatrobanbehandelten Tiere zeigte sich bei unseren Untersuchungen größer als bei den NaCl-behandelten Tieren, wobei dieser Unterschied nach 3T deutlicher ausfiel, als nach 7T (siehe Abb. 21) Diese Ergebnisse unterscheiden sich zu denen in der Literatur. Die Sicherheit von Argatroban bezüglich Hämatomexpansion wurde im Kollagenase-Modell von Rosenberg et al. untersucht und zeigte nach Infusion des DTI in die ICB keine Ausdehnung der Blutung. (Rosenberg, Mun-Bryce et al. 1990, Kitaoka, Hua et al. 2003). In weiteren Studien konnte durch die Gabe von Argatroban nach ICB kein Einfluss auf das Hämatomvolumen, verglichen mit Kontrollgruppen, gesehen werden (Kitaoka, Hua et al.

2002, Nagatsuna, Nomura et al. 2005, Ohnishi, Katsuki et al. 2007). In all diesen Studien wurde jedoch Kollagenase für die ICB-Induktion verwendet und nicht autologes Blut. Möglicherweise ist das Risiko einer Hämatomexpansion durch die Behandlung mit einem DTI nach ICB mit autologem Blut erhöht, verglichen mit dem Kollagenasemodell. Argatroban hemmt sowohl Fibrin-gebundenes, als auch lösliches Thrombin und durch das Vorhandensein von autologem Blut kann es zu vermehrter Auflösung von bereits koaguliertem Blut der ICB kommen und dadurch zu lokal verstärkter Einblutung. Das Risiko für Nachblutungen nach ICB ist auch beim Menschen erhöht, besonders in den ersten 24 Stunden (Fujii, Tanaka et al. 1994, Kazui, Naritomi et al. 1996). Bei der Studie von Fujii et al. zeigten Patienten mit einer unregelmäßig geformten ICB ein höheres Risiko zur Hämatomexpansion, genauso wie Patienten mit Gerinnungsstörungen. Eine Zunahme des Hämatomvolumens korrelierte zudem mit einem verschlechterten neurologischen Outcome, was sich mit den Ergebnissen in unserem Tiermodell deckt (Brott, Broderick et al. 1997).

Bei unseren DTI-Tieren zeigten sich große Schwankungen bezüglich der Größe der Läsion. Dies ist einerseits durch den höheren Anteil an diffusen Blutungen bei den DTI-Tieren erklärbar, wodurch die Volumenbestimmung erschwert war. Andererseits ist die Zahl der Tiere pro Gruppe relativ klein mit n=8 und die Streuung der Hämatomgröße unter den Tieren einer Interventionsgruppe groß. Um die Sicherheit von Argatrobanapplikation nach ICB mit autologem Blut bezüglich Hämatomexpansion besser zu untersuchen, könnten größere Interventionsgruppen hilfreich sein. Eine Volumenberechnung durch Ausmessen der Blutung eines jeden Schnitts oder durch Verwendung einer Software ist für die Volumenbestimmung geeigneter und könnte Unterschiede zwischen DTI und NaCl besser darstellen (Kitaoka, Hua et al. 2003, Nakamura, Xi et al. 2004, Nagatsuna, Nomura et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit, diese Abweichungen zu erklären, ist die Applikationsart des DTI. Bei Kitaoka et al. und bei Nagatsuna et al. wurde das DTI über eine intraperitoneal eingelegte osmotische Minipumpe appliziert, was einerseits zu einer genaueren Dosierung und andererseits zu einer konstanten Wirkstoffkonzentration führt, verglichen mit intraperitonealer Applikation ein Mal pro Tag (Kamiya, Nito et al. 2003, Kitaoka, Hua et al. 2003, Nagatsuna, Nomura et al. 2005). Des Weiteren unterscheidet sich auch die Operationsart der ICB-Induktion in der Literatur. Häufig wurden die Blutungen durch Mikroinfusionspumpen induziert, was zu einer genaueren Applikationsgeschwindigkeit und -menge führt, verglichen mit der manuellen Injektion (Kitaoka, Hua et al. 2003, Ohnishi, Katsuki et al. 2007, Krenzlin, Gresser et al. 2020).

6.2.6 Argatroban erhöht das Risiko für zusätzliche Blutungszeichen nach ICB

Die argatrobanbehandelten Tiere zeigten mehr zusätzliche Blutungszeichen, wie Ventrikelblutungen, Subduralblutungen, diffuse Einblutungen und Blutungen entlang des Balkens (siehe Abb. 22 und 23). Dieser Befund geht mit dem vergrößerten Hämatom in dieser Gruppe einher, da diejenigen Tiere mit den größten ICB Volumina auch diese zusätzlichen

Blutungszeichen aufwiesen (Daten nicht dargestellt). Verglichen mit anderen Thrombininhibitoren, wie Hirudin, weist Argatroban ein geringeres Blutungsrisiko auf (Hursting, Alford et al. 1997). Dennoch ist die Hauptnebenwirkung des DTI, wie bei allen Antikoagulanzen, das Vorkommen von Blutungsproblemen und diese treten dosisabhängig auf (Hook and Abrams 2010). Das Blutungsrisiko des Medikaments variiert je nach therapeutischem Einsatzgebiet, zwischen 0,4% bei der akuten Therapie des ST-Hebungsinfarkts und 7% bei der Therapie der HIT (Yeh and Jang 2006). In den vergleichbaren *in vivo* Studien von Argatrobantherapie nach ICB-Induktion wurden keine zusätzlichen Blutungszeichen beschrieben. Der Zeitpunkt der systemischen Applikation ist bei der Arbeitsgruppe von Kitaoka et al. 6 Stunden nach der ICB-Induktion (Kitaoka, Hua et al. 2003). Beim Menschen kommen Nachblutungen nach ICB zumeist innerhalb der ersten 6h nach ICB auf und selten nach 24 Stunden, weswegen in einer kleinen klinischen Studie die intravenöse Gabe frühestens 6 Stunden nach Auftreten der ICB untersucht wurde (Matsuoka and Hamada 2002). Dabei zeigten sich keine erhöhten Blutungszeichen nach 7T. Somit könnte der Zeitpunkt der Argatrobanapplikation mit 30 Minuten postoperativ zu früh gewählt worden sein, im Hinblick auf das Risiko von Nachblutungen bzw. Auftreten von anderen Blutungszeichen. Dieses Argument wird durch die Tatsache gestützt, dass zwei der drei scheinoperierten Tiere, die als Kontrolle mit Argatroban behandelt wurden, ebenfalls diffuse Blutungen aufwiesen, während dies bei den scheinoperierten Tieren mit NaCl-Behandlung nicht der Fall war. Das Blutungsrisiko scheint minimiert zu werden, solange die Blutungszeit nicht über das Doppelte verlängert wird, verglichen mit der Kontrollgruppe (Kawai, Yuki et al. 1996, Nagatsuna, Nomura et al. 2005). Es fanden sich in der Literatur auch Arbeitsgruppen, die den neuroprotektiven Effekt durch intraperitoneale Argatrobangabe im Tiermodell untersuchten und dafür geringere Dosierungen des Medikaments verwendeten (Zhou, Qu et al. 2011). Gegebenenfalls ist eine Untersuchung der Blutungszeit unter Behandlung von Argatroban notwendig, um die Dosierung besser anzupassen und damit das zusätzliche Blutungsrisiko zu senken.

6.2.7 Das langfristige neurologische Outcome wird durch Argatroban nicht verschlechtert

Im verwendeten Neuroscore, ein Test, durch den die Motorfunktionen von Mäusen standardisiert evaluiert werden können, zeigten sich kurzfristig bei den argatrobanbehandelten Tieren stärkere neuromotorische Defizite als bei den NaCl-behandelten Tieren, dieser Unterschied war in der 7T Gruppe auch statistisch signifikant (siehe Abb. 16). Die Defizite waren vor allem bei der Koordination zu sehen, während bei den anderen Motorfunktionen, wie Reflexe, generelles Verhalten und Balance weniger bzw. kein Unterschied zwischen den beiden Interventionsgruppen zu sehen war. In dem Test wird die Koordination durch das Laufen auf unterschiedlich breiten Balken untersucht. Punkte werden einerseits durch

Instabilität oder Danebentreten vergeben, andererseits durch Herunterfallen oder Verharren auf dem Balken. Letzteres konnte bei den DTI-Tieren am häufigsten beobachtet werden. Somit zeigten sich eher Defizite in der willkürlichen spontane Initiierung der Bewegung als in der Koordination auszuführender Bewegungen, die bei von außen forcierter Bewegung – wie beim Rotarod – nicht mehr zu sehen waren. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch einen unterschiedlichen Motivationszustand der beiden Gruppen erklären. Eine weitere Ausdeutung für diese Defizite der DTI-Tiere kann das größere Hämatomvolumen dieser Tiere sein, da die DTI-Tiere in anterior-posteriorer Ausrichtung eine ausgedehntere Blutung aufwiesen. Hierdurch könnten andere Areale betroffen sein, die zu unterschiedlichen Defiziten führen.

Im Rotarodtest konnte zwischen den DTI und NaCl-Tieren lediglich in der 7T Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (siehe Abb. 17). Die DTI-Gruppe lief bei den 7T Gruppen im Vergleich zur NaCl-Gruppe durchschnittlich länger auf dem Rotarod, Dadurch wird deutlich, dass durch die Applikation von Argatroban nach ICB keine Verschlechterung der Lokomotor- und Balance-Funktion verglichen mit der Kontrollgruppe erzielt wird.

Im Rattenmodell nach zerebraler Ischämie konnten vergleichbare Ergebnisse durch Argatroban erzielt werden; auch hier wurde die motorischen Funktion durch den Einsatz von DTI nicht verschlechtert (Chen, Friedman et al. 2012, Kramer, Sakas et al. 2018). Die Tendenz der DTI-Gruppe, länger auf dem Rotarod zu laufen, was sowohl nach 3T als auch 7T nach ICB zu sehen ist, legt nahe, dass die Behandlung mit Argatroban trotz größerem Hämatomvolumen zu keiner Einschränkung in der Durchführung der von außen forcierten Bewegung führt.

In der Literatur findet sich in einigen Studien ein verbessertes neurologisches Outcome durch die Behandlung mit Argatroban nach Induktion von Schlaganfällen im Tiermodell. Bei Sugawara et al. zeigten Ratten nach Induktion eines subarachnoidalen Hämatoms (SAH) durch Applikation von Argatroban in hohen Dosen nach 24 Stunden und auch nach 3T ein verbessertes neurologisches Outcome, jedoch gemessen mit anderen neurologischen Tests, die die sensomotorische Funktion der Tiere untersucht (Sugawara, Jadhav et al. 2009). Auch bei Rennmäusen konnte 24 Stunden nach zerebraler Ischämie und Behandlung mit Argatroban ein verbessertes neurologisches Outcome gezeigt werden. Dabei wurde aus verschiedenen Parametern ein Stroke Index ermittelt, der sich teilweise von denjenigen unseres Neuroscore unterscheiden (Ohyama, Hosomi et al. 2001). Jedoch ist hier das verbesserte Outcome nur nach 24 Stunden gezeigt; Messungen des Stroke Indexes nach längeren Überlebenszeiten werden nicht gezeigt, sodass der Therapieeffekt im längeren Verlauf fraglich ist. Bei Chen et al. wurde das Lernverhalten von Ratten nach fokaler Ischämie durch die Behandlung mit DTI positiv beeinflusst, gemessen 2 Wochen nach Induktion des Schadens. Diese Studien untersuchten jedoch einen anderen Tierstamm, sowie ein anderes Schadensmodell und nutzten einen anderen Applikationsweg des DTI. So wurde das

Medikament in diesen Studien intravenös (Ohyama, Hosomi et al. 2001, Chen, Friedman et al. 2012) oder intraperitoneal über Minipumpen (Sugawara, Jadhav et al. 2009) appliziert, was zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse herangezogen werden kann.

Eine besser vergleichbare Studie, die das gleiche ICB-Modell an C57BL/6 Wildtypmäusen mit einer intraperitoneal applizierten Argatrobanbehandlung untersucht, findet sich bei Li et al. (Li, Fan et al. 2014). Hier zeigten die DTI-behandelten Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe 1 und 3T postoperativ ein verbessertes neurologisches Outcome. Dies wurde an einem 28-Punkte-System gemessen, welches den neurologischen Status detaillierter auffasst, als der in unseren Versuchen verwendete Neuroscore. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wiesen die Mäuse in besagter Studie jedoch kein vergrößertes Hämatomvolumen auf. Nach 5T zeigten sich zwischen den Interventionsgruppen kein Unterschied mehr, was sich wiederum mit unseren Ergebnissen deckt. Generell ist die Beurteilung des neurologischen Status in einem Test, bei dem keine wesentliche Beeinträchtigung des Verhaltens zu messen ist, problematisch und es müssten Tests verwendet werden, die striatalen Schaden sensitiver auffassen (MacLellan, Davies et al. 2006). Des Weiteren ist die Beurteilung der Ergebnisse in Verhaltenstests eines Versuchsmodells mit hoher Varianz der Lokalisation und Ausdehnung des Schadens erschwert. Um zytoprotektive Effekte besser nachzuweisen, ist die Verwendung einer Reihe von Verhaltenstests, die verschiedene Defizite testen, notwendig (MacLellan, Auriat et al. 2006).

6.3 Ausblick

Diese Dissertation hatte zum Ziel, den Einfluss von Thrombin und seinem direkten Inhibitor Argatroban auf den sekundären Schaden nach ICB anhand eines *in vivo* Mausmodells zu überprüfen. Durch die Behandlung mit Argatroban kam es zu einer signifikanten Reduktion des neuronalen Schadens 3T nach der ICB. Es zeigte sich ein signifikant höheres Aufkommen von Thrombin um das Schadensgebiet, verglichen mit der Kontrollgruppe. Dies gibt einen weiteren Hinweis auf die zentrale Rolle von Thrombin bei neuronalem Schaden und legt einen neuroprotektiven Effekt des direkten Thrombininhibitors nahe.

Durch die Therapie mit Argatroban kam es zu gehäuftem Auftreten von Hämatomexpansion und zusätzlichen Blutungszeichen. Das Risiko für Blutungen und Hämatomexpansion bei der Gabe von Argatroban im ICB-Mausmodell wurde bisher nur an Kollagenasemodellen überprüft (Kitaoka, Hua et al. 2003, Nagatsuna, Nomura et al. 2005, Ohnishi, Katsuki et al. 2007). Ein späterer Zeitpunkt der systemischen Applikation und eine Applikation über osmotische Minipumpen würden sich anbieten, um die Sicherheit des Medikaments im Hinblick auf Blutungsrisiken im ICB-Mausmodell, induziert durch autologes Blut weiter zu untersuchen. Dazu könnte man verschiedene Zeitpunkte der Argatrobangabe postoperativ vergleichen, um das optimale Zeitfenster zu finden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach 7T kein

zusätzlicher Effekt durch die Therapie erzielt werden konnte. Dies sollte in weiteren Untersuchungen verifiziert werden. Durch zusätzliche, milde Hypothermie während der Operation könnte der neuroprotektive Effekt des Argatroban erhöht werden (Kamiya, Nito et al. 2003).

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Anfärbarkeit von Thrombin und nicht die Thrombinaktivität gemessen. Es könnte hilfreich sein, den neuroprotektiven Effekt von Argatroban zusätzlich über die Messung der Aktivität der Serinprotease zu überprüfen. Dies ist bereits in anderen Studien beispielsweise durch die Messung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes als quantitativer Marker der Thrombinbildung untersucht worden (Handin 2003, Krenzlin, Frenz et al. 2020). Bei Chen et al. wurde zur Messung der proteolytischen Aktivität des Enzyms PPRSFL-ACPP angefärbt. Dies ist ein Peptid (ACPP = *activating cell penetrating peptide*), das die Aktivierungsstelle von Thrombin am PAR-1 imitiert und so die Thrombinaktivität durch Bindung von Thrombin an das Peptid darstellt (Chen, Friedman et al. 2012). Hier wird jedoch nur die Aktivität gezeigt, die über PAR-1 vermittelt wird. Um die Wirkung der anderen Rezeptoren oder PAR-unabhängige Signalwege zu untersuchen, könnten PAR-1 knock-out Mausmodelle zu weiteren Erkenntnissen des thrombinvermittelten sekundären Schadens nach einer ICB führen. So würde gezielt die PAR-1 vermittelte Ödementwicklung, Astrozytenaktivierung und Apoptoseinduktion untersucht werden und gegebenenfalls andere Wege der Schadensinduktion aufgezeigt werden. Außerdem ließe sich so untersuchen, ob der neuroprotektive Effekt durch die direkte Thrombininhibition durch Behandlung mit Argatroban ausschließlich PAR-1-vermittelt ist oder ob Argatroban auch PAR-unabhängig, beispielsweise über Einwirken in MAPK-Signalwege, einen positiven Effekt auf den neuronalen Schadensverlauf hat.

7. Zusammenfassung

ICBs haben unter den Schlaganfällen die höchste Morbidität und Mortalität und stellen eine zunehmende Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Der Gerinnungsfaktor Thrombin spielt in der Entstehung des sekundären Schadens nach ICB eine zentrale Rolle, weshalb das Verständnis der pathophysiologischen Prozesse von Thrombin im Rahmen von ICBs von großer Bedeutung ist. Ziel dieser Dissertation war es, die Aktivierung von Thrombin im Rahmen eines ICB-Mausmodells weiter zu untersuchen und den Einfluss des direkten Thrombininhibitors Argatroban auf den neuronalen Schaden und das neurologische Outcome der Tiere zu messen. Dafür wurde den Mäusen stereotaktisch 30µl autologes Blut in die Basalganglien injiziert und intraoperativ die Parameter ICP und CBF gemessen. Im Anschluss wurden die Tiere entweder mit 9mg/kg Argatroban oder mit der gleichen Menge NaCl behandelt. Die Läsionsausdehnung, das neurologische Outcome und periläsionale Neuronen, Gliazellen und Thrombin wurden nach 3T und nach 7T gemessen und die Gruppen miteinander verglichen.

Diese Untersuchungen führten zu drei wichtigen Erkenntnissen: (1) nach ICB kommt es periläsional zu einem Anstieg von Thrombin, (2) das periläsionale Thrombinaufkommen korreliert signifikant mit dem neuronalen Schaden und (3) durch die Behandlung mit Argatroban konnte der periläsionale Schaden 3T nach ICB verringert werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Behandlung von Argatroban das Risiko einer Hämatomexpansion und zusätzlicher Blutungen nach 3T erhöht. Auch das neurologische Outcome der Argatroban-Tiere zeigte sich nach 3T in einem der beiden Verhaltenstests tendenziell verschlechtert. Trotz dieser Ergebnisse zeigen sich bei dieser Gruppe nach 7T keine Defizite mehr, das Hämatomvolumen und das Auftreten zusätzlicher Blutungen zeigen sich nach 7T deutlich rückläufig und der neuronale Schaden reduziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung von Argatroban nach ICB im Mausmodell einen gewissen neuroprotektiven Effekt nach 3T erzielt und trotz des erhöhten Blutungsrisikos langfristig keinen negativen Effekt auf das Überleben und das neurologische Outcome hat.

Der periläsionale Thrombinanstieg hielt 7T an und es konnte bei den argatrobanbehandelten Tieren nach 3T eine stärkere inflammatorische Reaktion im Sinne einer Astrogliose gemessen werden, die sich jedoch nach 7T rückläufig zeigt. Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen Inflammation und Thrombinmenge und es erscheint möglich, dass durch die Behandlung mit Argatroban astrozytenabhängige Reparatur- oder Anpassungsmechanismen vermittelt werden, die den Gewebeschaden minimieren.

ICBs sind schwer zu therapierende Erkrankungen und können meist lediglich durch symptomatische Therapie behandelt werden. Diese Arbeit zeigt einen möglichen Therapieansatz durch Thrombininhibition mittels Argatroban auf. Thrombin stellt einen

wichtigen Faktor in der Schadensvermittlung nach ICB dar und dessen selektive Hemmung könnte sich durch Reduktion von neuronalem Schaden und Mitwirken bei inflammatorischen Reparaturprozessen positiv auf den Erkrankungsverlauf auswirken. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um einerseits den neuroprotektiven Effekt zu verifizieren und andererseits das Blutungsrisiko durch Anpassen des therapeutischen Zeitfensters, der Dosierung und der Applikationsart zu minimieren.

8. Literaturverzeichnis

- Adams, T. E. and J. A. Huntington (2016). "Structural transitions during prothrombin activation: On the importance of fragment 2." *Biochimie* **122**: 235-242.
- Adeoye, O. and J. P. Broderick (2010). "Advances in the management of intracerebral hemorrhage." *Nat Rev Neurol* **6**(11): 593-601.
- Akiyama, H., K. Ikeda, H. Kondo and P. L. McGeer (1992). "Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **146**(2): 152-154.
- Alberelli, M. A. and E. De Candia (2014). "Functional role of protease activated receptors in vascular biology." *Vascul Pharmacol* **62**(2): 72-81.
- Almonte, A. G., C. E. Hamill, J. P. Chhatwal, T. S. Wingo, J. A. Barber, P. N. Lyuboslavsky, J. David Sweatt, K. J. Ressler, D. A. White and S. F. Traynelis (2007). "Learning and memory deficits in mice lacking protease activated receptor-1." *Neurobiol Learn Mem* **88**(3): 295-304.
- Anderson, C. S., E. Heeley, Y. Huang, J. Wang, C. Stapf, C. Delcourt, R. Lindley, T. Robinson, P. Lavados, B. Neal, J. Hata, H. Arima, M. Parsons, Y. Li, J. Wang, S. Heritier, Q. Li, M. Woodward, R. J. Simes, S. M. Davis and J. Chalmers (2013). "Rapid blood-pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage." *N Engl J Med* **368**(25): 2355-2365.
- Arai, T., J. Miklossy, A. Klegeris, J. P. Guo and P. L. McGeer (2006). "Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain." *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(1): 19-25.
- Ariesen, M. J., S. P. Claus, G. J. Rinkel and A. Algra (2003). "Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review." *Stroke* **34**(8): 2060-2065.
- Arima, H., J. G. Wang, Y. Huang, E. Heeley, C. Skulina, M. W. Parsons, B. Peng, Q. Li, S. Su, Q. L. Tao, Y. C. Li, J. D. Jiang, L. W. Tai, J. L. Zhang, E. Xu, Y. Cheng, L. B. Morgenstern, J. Chalmers and C. S. Anderson (2009). "Significance of perihematomal edema in acute intracerebral hemorrhage: the INTERACT trial." *Neurology* **73**(23): 1963-1968.
- Asanuma, K., H. Wakabayashi, T. Hayashi, N. Okuyama, M. Seto, A. Matsumine, K. Kusuzaki, K. Suzuki and A. Uchida (2004). "Thrombin inhibitor, argatroban, prevents tumor cell migration and bone metastasis." *Oncology* **67**(2): 166-173.
- Babu, R., J. H. Bagley, C. Di, A. H. Friedman and C. Adamson (2012). "Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention." *Neurosurg Focus* **32**(4): E8.
- Béjot, Y., C. Cordonnier, J. Durier, C. Aboa-Eboulé, O. Rouaud and M. Giroud (2013). "Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study." *Brain* **136**(Pt 2): 658-664.
- Belayev, L., I. Saul, K. Curbelo, R. Busto, A. Belayev, Y. Zhang, P. Riyamongkol, W. Zhao and M. D. Ginsberg (2003). "Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model." *Stroke* **34**(9): 2221-2227.
- Ben Shimon, M., M. Lenz, B. Ikenberg, D. Becker, E. Shavit Stein, J. Chapman, D. Tanne, C. G. Pick, I. Blatt, M. Neufeld, A. Vlachos and N. Maggio (2015). "Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease." *Front Cell Neurosci* **9**: 151.
- Ben Shimon, M., T. Zeimer, E. Shavit Stein, A. Artan-Furman, S. Harnof, J. Chapman, A. Eisenkraft, C. G. Pick and N. Maggio (2017). "Recovery from trauma

- induced amnesia correlates with normalization of thrombin activity in the mouse hippocampus." PLoS One **12**(11): e0188524.
- Benjamin, E. J., P. Muntner, A. Alonso, M. S. Bittencourt, C. W. Callaway, A. P. Carson, A. M. Chamberlain, A. R. Chang, S. Cheng, S. R. Das, F. N. Delling, L. Djousse, M. S. V. Elkind, J. F. Ferguson, M. Fornage, L. C. Jordan, S. S. Khan, B. M. Kissela, K. L. Knutson, T. W. Kwan, D. T. Lackland, T. T. Lewis, J. H. Lichtman, C. T. Longenecker, M. S. Loop, P. L. Lutsey, S. S. Martin, K. Matsushita, A. E. Moran, M. E. Mussolino, M. O'Flaherty, A. Pandey, A. M. Perak, W. D. Rosamond, G. A. Roth, U. K. A. Sampson, G. M. Satou, E. B. Schroeder, S. H. Shah, N. L. Spartano, A. Stokes, D. L. Tirschwell, C. W. Tsao, M. P. Turakhia, L. B. VanWagner, J. T. Wilkins, S. S. Wong and S. S. Virani (2019). "Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **139**(10): e56-e528.
- Bodmer, D., K. A. Vaughan, B. E. Zacharia, Z. L. Hickman and E. S. Connolly (2012). "The Molecular Mechanisms that Promote Edema After Intracerebral Hemorrhage." Transl Stroke Res **3**(Suppl 1): 52-61.
- Brott, T., J. Broderick, R. Kothari, W. Barsan, T. Tomsick, L. Sauerbeck, J. Spilker, J. Duldner and J. Khoury (1997). "Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage." Stroke **28**(1): 1-5.
- Bundesamt, S. (2021). Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland: ausführliche 4-stellige ICD-Klassifikation. jährlich. Destatis, Statistisches Bundesamt.
- Burzynski, L. C., M. Humphry, K. Pyrrillou, K. A. Wiggins, J. N. E. Chan, N. Figg, L. L. Kitt, C. Summers, K. C. Tatham, P. B. Martin, M. R. Bennett and M. C. H. Clarke (2019). "The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin." Immunity **50**(4): 1033-1042.e1036.
- Bushi, D., J. Chapman, A. Katzav, E. Shavit-Stein, N. Molshatzki, N. Maggio and D. Tanne (2013). "Quantitative detection of thrombin activity in an ischemic stroke model." J Mol Neurosci **51**(3): 844-850.
- Chen, B., B. Friedman, M. A. Whitney, J. A. Winkle, I. F. Lei, E. S. Olson, Q. Cheng, B. Pereira, L. Zhao, R. Y. Tsien and P. D. Lyden (2012). "I α s." J Neurosci **32**(22): 7622-7631.
- Chen, W., M. Xia, C. Guo, Z. Jia, J. Wang, C. Li, M. Li, X. Tang, R. Hu, Y. Chen, X. Liu and H. Feng (2019). "Modified behavioural tests to detect white matter injury-induced motor deficits after intracerebral haemorrhage in mice." Sci Rep **9**(1): 16958.
- Collombet, J. M., C. Masqueliez, E. Four, M. F. Burckhart, D. Bernabé, D. Baubichon and G. Lallement (2006). "Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus." Neurosci Lett **398**(3): 337-342.
- Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-264.
- Curzon, P., M. Zhang, R. J. Radek and G. B. Fox (2009). Frontiers in Neuroscience The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. J. J. Buccafusco. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis
- Copyright © 2009, Taylor & Francis Group, LLC.
- Cusack, T. J., J. R. Carhuapoma and W. C. Ziai (2018). "Update on the Treatment of Spontaneous Intraparenchymal Hemorrhage: Medical and Interventional Management." Curr Treat Options Neurol **20**(1): 1.
- Danckwardt, S., M. W. Hentze and A. E. Kulozik (2013). "Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond." J Mol Med (Berl) **91**(11): 1257-1271.

- Deschepper, C. F., V. Bigornia, M. E. Berens and M. C. Lapointe (1991). "Production of thrombin and antithrombin III by brain and astroglial cell cultures." Brain Res Mol Brain Res **11**(3-4): 355-358.
- Dihanich, M., M. Kaser, E. Reinhard, D. Cunningham and D. Monard (1991). "Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system." Neuron **6**(4): 575-581.
- Donovan, F. M., C. J. Pike, C. W. Cotman and D. D. Cunningham (1997). "Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities." J Neurosci **17**(14): 5316-5326.
- Ekmark-Lewén, S., A. Lewén, C. Israelsson, G. L. Li, M. Farooque, Y. Olsson, T. Ebendal and L. Hillered (2010). "Vimentin and GFAP responses in astrocytes after contusion trauma to the murine brain." Restor Neurol Neurosci **28**(3): 311-321.
- Elijovich, L., P. V. Patel and J. C. Hemphill, 3rd (2008). "Intracerebral hemorrhage." Semin Neurol **28**(5): 657-667.
- Feigin, V. L., M. Brainin, B. Norrving, S. Martins, R. L. Sacco, W. Hacke, M. Fisher, J. Pandian and P. Lindsay (2022). "World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022." Int J Stroke **17**(1): 18-29.
- Feistritzer, C. and M. Riewald (2005). "Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation." Blood **105**(8): 3178-3184.
- Felberg, R. A., J. C. Grotta, A. L. Shirzadi, R. Strong, P. Narayana, S. J. Hill-Felberg and J. Aronowski (2002). "Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the "black hole" model of hemorrhagic damage." Ann Neurol **51**(4): 517-524.
- Fenton, J. W., 2nd (1986). "Thrombin." Ann N Y Acad Sci **485**: 5-15.
- Flaherty, M. L. (2010). "Anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage." Semin Neurol **30**(5): 565-572.
- Foley, J. H. and E. M. Conway (2016). "Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation." Circ Res **118**(9): 1392-1408.
- Fujii, Y., R. Tanaka, S. Takeuchi, T. Koike, T. Minakawa and O. Sasaki (1994). "Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage." J Neurosurg **80**(1): 51-57.
- Fujimoto, S., H. Katsuki, T. Kume and A. Akaike (2006). "Thrombin-induced delayed injury involves multiple and distinct signaling pathways in the cerebral cortex and the striatum in organotypic slice cultures." Neurobiol Dis **22**(1): 130-142.
- Gong, Y., G. Xi, H. Hu, Y. Gu, F. Huang, R. F. Keep and Y. Hua (2008). "Increase in brain thrombin activity after experimental intracerebral hemorrhage." Acta Neurochir Suppl **105**: 47-50.
- Grand, R. J., A. S. Turnell and P. W. Grabham (1996). "Cellular consequences of thrombin-receptor activation." Biochem J **313** (Pt 2)(Pt 2): 353-368.
- Greenberg, S. M., W. C. Ziai, C. Cordonnier, D. Dowlatshahi, B. Francis, J. N. Goldstein, J. C. Hemphill, 3rd, R. Johnson, K. M. Keigher, W. J. Mack, J. Mocco, E. J. Newton, I. M. Ruff, L. H. Sansing, S. Schulman, M. H. Selim, K. N. Sheth, N. Sprigg and K. S. Sunnerhagen (2022). "2022 Guideline for the Management of Patients With Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **53**(7): e282-e361.
- Gunel, M., I. A. Awad, K. Finberg, J. A. Anson, G. K. Steinberg, H. H. Batjer, T. A. Kopitnik, L. Morrison, S. L. Giannotta, C. Nelson-Williams and R. P. Lifton (1996). "A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans." N Engl J Med **334**(15): 946-951.
- Hamada, R. and H. Matsuoka (2000). "Antithrombin therapy for intracerebral hemorrhage." Stroke **31**(3): 794-795.

- Hamm, R. J., B. R. Pike, D. M. O'Dell, B. G. Lyeth and L. W. Jenkins (1994). "The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury." J Neurotrauma **11**(2): 187-196.
- Handin, R. I. (2003). Blood : principles and practice of hematology.
- Hanley, D. F., K. Lane, N. McBee, W. Ziai, S. Tuhim, K. R. Lees, J. Dawson, D. Gandhi, N. Ullman, W. A. Mould, S. W. Mayo, A. D. Mendelow, B. Gregson, K. Butcher, P. Vespa, D. W. Wright, C. S. Kase, J. R. Carhuapoma, P. M. Keyl, M. Diener-West, J. Muschelli, J. F. Betz, C. B. Thompson, E. A. Sugar, G. Yenokyan, S. Janis, S. John, S. Harnof, G. A. Lopez, E. F. Aldrich, M. R. Harrigan, S. Ansari, J. Jallo, J. L. Caron, D. LeDoux, O. Adeoye, M. Zuccarello, H. P. Adams, Jr., M. Rosenblum, R. E. Thompson and I. A. Awad (2017). "Thrombolytic removal of intraventricular haemorrhage in treatment of severe stroke: results of the randomised, multicentre, multiregion, placebo-controlled CLEAR III trial." Lancet **389**(10069): 603-611.
- Hanley, D. F., R. E. Thompson, M. Rosenblum, G. Yenokyan, K. Lane, N. McBee, S. W. Mayo, A. J. Bistran-Hall, D. Gandhi, W. A. Mould, N. Ullman, H. Ali, J. R. Carhuapoma, C. S. Kase, K. R. Lees, J. Dawson, A. Wilson, J. F. Betz, E. A. Sugar, Y. Hao, R. Avadhani, J. L. Caron, M. R. Harrigan, A. P. Carlson, D. Bulters, D. LeDoux, J. Huang, C. Cobb, G. Gupta, R. Kitagawa, M. R. Chicoine, H. Patel, R. Dodd, P. J. Camarata, S. Wolfe, A. Stadnik, P. L. Money, P. Mitchell, R. Sarabia, S. Harnof, P. Barzo, A. Unterberg, J. S. Teitelbaum, W. Wang, C. S. Anderson, A. D. Mendelow, B. Gregson, S. Janis, P. Vespa, W. Ziai, M. Zuccarello and I. A. Awad (2019). "Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial." Lancet **393**(10175): 1021-1032.
- Hare, D. J., J. L. George, L. Bray, I. Volitakis, A. Vais, T. M. Ryan, R. A. Cherny, A. I. Bush, C. L. Masters and P. A. Adlard (2014). "The effect of paraformaldehyde fixation and sucrose cryoprotection on metal concentration in murine neurological tissue." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **29**(3): 565-570.
- Hemphill, J. C., 3rd, D. C. Bonovich, L. Besmertis, G. T. Manley and S. C. Johnston (2001). "The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage." Stroke **32**(4): 891-897.
- Hook, K. M. and C. S. Abrams (2010). "Treatment options in heparin-induced thrombocytopenia." Curr Opin Hematol **17**(5): 424-431.
- Hostettler, I. C., D. J. Seiffge and D. J. Werring (2019). "Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment." Expert Rev Neurother **19**(7): 679-694.
- Hou, X., C. Jin, C. Pan, X. Wang, J. Xue, Z. Yang and D. Qi (2021). "Effects of argatroban therapy for stroke patients: A meta-analysis." J Clin Neurosci **90**: 225-232.
- Hoxie, J. A., M. Ahuja, E. Belmonte, S. Pizarro, R. Parton and L. F. Brass (1993). "Internalization and recycling of activated thrombin receptors." J Biol Chem **268**(18): 13756-13763.
- Hua, Y., R. F. Keep, Y. Gu and G. Xi (2009). "Thrombin and brain recovery after intracerebral hemorrhage." Stroke **40**(3 Suppl): S88-89.
- Hua, Y., R. F. Keep, J. T. Hoff and G. Xi (2007). "Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron." Stroke **38**(2 Suppl): 759-762.
- Hua, Y., J. Wu, R. F. Keep, J. T. Hoff and G. Xi (2003). "Thrombin exacerbates brain edema in focal cerebral ischemia." Acta Neurochir Suppl **86**: 163-166.
- Hua, Y., J. Wu, R. F. Keep, T. Nakamura, J. T. Hoff and G. Xi (2006). "Tumor necrosis factor-alpha increases in the brain after intracerebral hemorrhage and thrombin stimulation." Neurosurgery **58**(3): 542-550; discussion 542-550.

- Hua, Y., G. Xi, R. F. Keep, J. Wu, Y. Jiang and J. T. Hoff (2002). "Plasminogen activator inhibitor-1 induction after experimental intracerebral hemorrhage." J Cereb Blood Flow Metab **22**(1): 55-61.
- Hursting, M. J., K. L. Alford, J. C. Becker, R. L. Brooks, J. L. Joffrion, G. D. Knappenberger, P. W. Kogan, T. P. Kogan, A. A. McKinney and R. P. Schwarz, Jr. (1997). "Novastan (brand of argatroban): a small-molecule, direct thrombin inhibitor." Semin Thromb Hemost **23**(6): 503-516.
- Ishida, Y., A. Nagai, S. Kobayashi and S. U. Kim (2006). "Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase." J Neuropathol Exp Neurol **65**(1): 66-77.
- Itsekson-Hayosh, Z., E. Shavit-Stein, A. Katzav, V. Rubovitch, N. Maggio, J. Chapman, S. Harnof and C. G. Pick (2016). "Minimal Traumatic Brain Injury in Mice: Protease-Activated Receptor 1 and Thrombin-Related Changes." J Neurotrauma **33**(20): 1848-1854.
- Janeczko, K. (1993). "Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study." Int J Dev Neurosci **11**(2): 139-147.
- Jiang, Y., J. Wu, Y. Hua, R. F. Keep, J. Xiang, J. T. Hoff and G. Xi (2002). "Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance." J Cereb Blood Flow Metab **22**(4): 404-410.
- Jin, J., F. Zhou, J. Zhu, W. Zeng and Y. Liu (2020). "MiR-26a inhibits the inflammatory response of microglia by targeting HMGA2 in intracerebral hemorrhage." J Int Med Res **48**(6): 300060520929615.
- Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara and S. R. Coughlin (1999). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin." J Clin Invest **103**(6): 879-887.
- Kamiya, T., C. Nito, M. Ueda, K. Kato, S. Amemiya, A. Terashi and Y. Katayama (2003). "Mild hypothermia enhances the neuroprotective effects of a selective thrombin inhibitor following transient focal ischemia in rats." Acta Neurochir Suppl **86**: 195-198.
- Kawai, H., S. Yuki, J. Sugimoto and Y. Tamao (1996). "Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model." J Pharmacol Exp Ther **278**(2): 780-785.
- Kazui, S., H. Naritomi, H. Yamamoto, T. Sawada and T. Yamaguchi (1996). "Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course." Stroke **27**(10): 1783-1787.
- Keep, R. F., N. Zhou, J. Xiang, A. V. Andjelkovic, Y. Hua and G. Xi (2014). "Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage." Fluids Barriers CNS **11**: 18.
- Kemkes-Matthes, P. D. B. (2006). "Argatroban." Retrieved 05.08.2022, from <https://www.arzneimitteltherapie.de/heftarchiv/2006/09/argatroban-die-arzneimitteltherapie-im-internet-http-www-arzneimitteltherapie-de.html>.
- Kidwell, C. S., J. A. Chalela, J. L. Saver, S. Starkman, M. D. Hill, A. M. Demchuk, J. A. Butman, N. Patronas, J. R. Alger, L. L. Latour, M. L. Luby, A. E. Baird, M. C. Leary, M. Tremwel, B. Ovbiagele, A. Fredieu, S. Suzuki, J. P. Villablanca, S. Davis, B. Dunn, J. W. Todd, M. A. Ezzeddine, J. Haymore, J. K. Lynch, L. Davis and S. Warach (2004). "Comparison of MRI and CT for detection of acute intracerebral hemorrhage." Jama **292**(15): 1823-1830.
- Kikelj, D. (2003). "Peptidomimetic thrombin inhibitors." Pathophysiol Haemost Thromb **33**(5-6): 487-491.

- Kim, K. Y., M. Y. Kim, H. S. Choi, B. K. Jin, S. U. Kim and Y. B. Lee (2002). "Thrombin induces IL-10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF-alpha release." Neuroreport **13**(6): 849-852.
- Kitaoka, T., Y. Hua, G. Xi, J. T. Hoff and R. F. Keep (2002). "Delayed argatroban treatment reduces edema in a rat model of intracerebral hemorrhage." Stroke **33**(12): 3012-3018.
- Kitaoka, T., Y. Hua, G. Xi, S. Nagao, J. T. Hoff and R. F. Keep (2003). "Effect of delayed argatroban treatment on intracerebral hemorrhage-induced edema in the rat." Acta Neurochir Suppl **86**: 457-461.
- Kramer, T. J., W. Sakas, D. Jussen, H. Krenzlin, O. Kempfski and B. Alessandri (2018). "Thrombin contributes to the injury development and neurological deficit after acute subdural hemorrhage in rats only in collaboration with additional blood-derived factors." BMC Neurosci **19**(1): 81.
- Krenzlin, H., C. Frenz, J. Schmitt, J. Masomi-Bornwasser, D. Wesp, D. Kalasauskas, T. Kerz, J. Lotz, B. Alessandri, F. Ringel and N. Keric (2020). "High CSF thrombin concentration and activity is associated with an unfavorable outcome in patients with intracerebral hemorrhage." PLoS One **15**(11): e0241565.
- Krenzlin, H., E. Gresser, D. Jussen, N. Riede, L. Taylor, C. F. Vogelaar, F. Ringel, O. Kempfski and B. Alessandri (2020). "The Cerebral Thrombin System Is Activated after Intracerebral Hemorrhage and Contributes to Secondary Lesion Growth and Poor Neurological Outcome in C57Bl/6 Mice." J Neurotrauma.
- Krenzlin, H., V. Lorenz, S. Danckwardt, O. Kempfski and B. Alessandri (2016). "The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease." Int J Mol Sci **17**(1).
- Krishnamurthi, R. V., T. Ikeda and V. L. Feigin (2020). "Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017." Neuroepidemiology **54**(2): 171-179.
- Kubo, Y., M. Suzuki, A. Kudo, K. Yoshida, T. Suzuki, K. Ogasawara, A. Ogawa, A. Kurose and T. Sawai (2000). "Thrombin inhibitor ameliorates secondary damage in rat brain injury: suppression of inflammatory cells and vimentin-positive astrocytes." J Neurotrauma **17**(2): 163-172.
- Lee, K. R., A. L. Betz, S. Kim, R. F. Keep and J. T. Hoff (1996). "The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage." Acta Neurochir (Wien) **138**(4): 396-400; discussion 400-391.
- Lee, K. R., N. Kawai, S. Kim, O. Sagher and J. T. Hoff (1997). "Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model." J Neurosurg **86**(2): 272-278.
- Li, G., R. M. Fan, J. L. Chen, C. M. Wang, Y. C. Zeng, C. Han, S. Jiao, X. P. Xia, W. Chen and S. T. Yao (2014). "Neuroprotective effects of argatroban and C5a receptor antagonist (PMX53) following intracerebral haemorrhage." Clin Exp Immunol **175**(2): 285-295.
- Liu, D. Z., B. P. Ander, H. Xu, Y. Shen, P. Kaur, W. Deng and F. R. Sharp (2010). "Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury." Ann Neurol **67**(4): 526-533.
- Luney, M. S., S. W. English, A. Longworth, J. Simpson, S. Gudibande, B. Matta, R. M. Burnstein and T. Veenith (2016). "Acute Posterior Cranial Fossa Hemorrhage-Is Surgical Decompression Better than Expectant Medical Management?" Neurocrit Care **25**(3): 365-370.
- MacLellan, C. L., A. M. Auriat, S. C. McGie, R. H. Yan, H. D. Huynh, M. F. De Butte and F. Colbourne (2006). "Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies." J Cereb Blood Flow Metab **26**(8): 1031-1042.

- MacLellan, C. L., L. M. Davies, M. S. Fingas and F. Colbourne (2006). "The influence of hypothermia on outcome after intracerebral hemorrhage in rats." Stroke **37**(5): 1266-1270.
- Manaenko, A., H. Chen, J. H. Zhang and J. Tang (2011). "Comparison of different preclinical models of intracerebral hemorrhage." Acta Neurochir Suppl **111**: 9-14.
- Martorell, L., J. Martínez-González, C. Rodríguez, M. Gentile, O. Calvayrac and L. Badimon (2008). "Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis." Thromb Haemost **99**(2): 305-315.
- Matsuoka, H. and R. Hamada (2002). "Role of thrombin in CNS damage associated with intracerebral haemorrhage: opportunity for pharmacological intervention?" CNS Drugs **16**(8): 509-516.
- McNamara, C. A., I. J. Sarembock, L. W. Gimple, J. W. Fenton, 2nd, S. R. Coughlin and G. K. Owens (1993). "Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor." J Clin Invest **91**(1): 94-98.
- Mendelow, A. D., B. A. Gregson, H. M. Fernandes, G. D. Murray, G. M. Teasdale, D. T. Hope, A. Karimi, M. D. Shaw, D. H. Barer and S. investigators (2005). "Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial." Lancet **365**(9457): 387-397.
- Mendelow, A. D., B. A. Gregson, E. N. Rowan, G. D. Murray, A. Gholkar, P. M. Mitchell and S. I. Investigators (2013). "Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial." Lancet **382**(9890): 397-408.
- Mima, T., Y. J. Jin, T. Hirayama, M. G. Mostafa and K. Mori (2000). "Argatroban, a thrombin inhibitor, decreased mortality after 10 min of forebrain ischemia in the gerbil." Neurosci Lett **279**(2): 93-96.
- Mittal, M. K. and A. Lackamp (2016). "Intracerebral Hemorrhage: Perihemorrhagic Edema and Secondary Hematoma Expansion: From Bench Work to Ongoing Controversies." Front Neurol **7**: 210.
- Molino, M., E. S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J. A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis and L. F. Brass (1997). "Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2." J Biol Chem **272**(7): 4043-4049.
- Montaño, A., D. F. Hanley and J. C. Hemphill, 3rd (2021). "Hemorrhagic stroke." Handb Clin Neurol **176**: 229-248.
- Motohashi, O., M. Suzuki, N. Shida, K. Umezawa, K. Sugai and T. Yoshimoto (1997). "Hirudin suppresses the invasion of inflammatory cells and the appearance of vimentin-positive astrocytes in the rat cerebral ablation model." J Neurotrauma **14**(10): 747-754.
- Nagatsuna, T., S. Nomura, E. Suehiro, H. Fujisawa, H. Koizumi and M. Suzuki (2005). "Systemic administration of argatroban reduces secondary brain damage in a rat model of intracerebral hemorrhage: histopathological assessment." Cerebrovasc Dis **19**(3): 192-200.
- Nakamura, T., G. Xi, Y. Hua, T. Schallert, J. T. Hoff and R. F. Keep (2004). "Intracerebral hemorrhage in mice: model characterization and application for genetically modified mice." J Cereb Blood Flow Metab **24**(5): 487-494.
- Niclou, S. P., H. S. Suidan, A. Pavlik, R. Vejsada and D. Monard (1998). "Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion." Eur J Neurosci **10**(5): 1590-1607.
- Nicole, O., A. Goldshmidt, C. E. Hamill, S. D. Sorensen, A. Sastre, P. Lyuboslavsky, J. R. Hepler, R. J. McKeon and S. F. Traynelis (2005). "Activation of protease-

- activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury." J Neurosci **25**(17): 4319-4329.
- Nishino, A., M. Suzuki, H. Ohtani, O. Motohashi, K. Umezawa, H. Nagura and T. Yoshimoto (1993). "Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury." J Neurotrauma **10**(2): 167-179.
- O'Brien, P. J., M. Molino, M. Kahn and L. F. Brass (2001). "Protease activated receptors: theme and variations." Oncogene **20**(13): 1570-1581.
- Ohnishi, M., H. Katsuki, S. Fujimoto, M. Takagi, T. Kume and A. Akaike (2007). "Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury." Exp Neurol **206**(1): 43-52.
- Ohyama, H., N. Hosomi, T. Takahashi, K. Mizushige and M. Kohno (2001). "Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia." Brain Res **902**(2): 264-271.
- Ossovskaya, V. S. and N. W. Bunnnett (2004). "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease." Physiol Rev **84**(2): 579-621.
- Pai, K. S., V. B. Mahajan, A. Lau and D. D. Cunningham (2001). "Thrombin receptor signaling to cytoskeleton requires Hsp90." J Biol Chem **276**(35): 32642-32647.
- Paxinos, G. and K. Franklin (2003). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition*. Pub, Elsevier Science & Technology Books.
- Poon, M. T., A. F. Fonville and R. Al-Shahi Salman (2014). "Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis." J Neuro Neurol Psychiatry **85**(6): 660-667.
- Posma, J. J., J. J. Posthuma and H. M. Spronk (2016). "Coagulation and non-coagulation effects of thrombin." J Thromb Haemost **14**(10): 1908-1916.
- Qureshi, A. I., A. D. Mendelow and D. F. Hanley (2009). "Intracerebral haemorrhage." Lancet **373**(9675): 1632-1644.
- Radulovic, M., H. Yoon, J. Wu, K. Mustafa and I. A. Scarisbrick (2016). "Targeting the thrombin receptor modulates inflammation and astrogliosis to improve recovery after spinal cord injury." Neurobiol Dis **93**: 226-242.
- Rajput, P. S., J. Lamb, S. Kothari, B. Pereira, D. Soetkamp, Y. Wang, J. Tang, J. E. Van Eyk, E. S. Mullins and P. D. Lyden (2020). "Neuron-generated thrombin induces a protective astrocyte response via protease activated receptors." Glia **68**(2): 246-262.
- Ramos-Vara, J. A. (2011). "Principles and methods of immunohistochemistry." Methods Mol Biol **691**: 83-96.
- Riek-Burchardt, M., F. Striggow, P. Henrich-Noack, G. Reiser and K. G. Reymann (2002). "Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors." Neurosci Lett **329**(2): 181-184.
- Rittirsch, D., M. A. Flierl and P. A. Ward (2008). "Harmful molecular mechanisms in sepsis." Nat Rev Immunol **8**(10): 776-787.
- Rosenberg, G. A., S. Mun-Bryce, M. Wesley and M. Kornfeld (1990). "Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats." Stroke **21**(5): 801-807.
- Rudge, J. S. and J. Silver (1990). "Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro." J Neurosci **10**(11): 3594-3603.
- Rynkowski, M. A., G. H. Kim, R. J. Komotar, M. L. Otten, A. F. Ducruet, B. E. Zacharia, C. P. Kellner, D. K. Hahn, M. B. Merkow, M. C. Garrett, R. M. Starke, B. M. Cho, S. A. Sosunov and E. S. Connolly (2008). "A mouse model of intracerebral hemorrhage using autologous blood infusion." Nat Protoc **3**(1): 122-128.
- Sarker, K. P., H. Yamahata, M. Nakata, T. Arisato, T. Nakajima, I. Kitajima and I. Maruyama (1999). "Recombinant thrombomodulin inhibits thrombin-induced vascular endothelial growth factor production in neuronal cells." Haemostasis **29**(6): 343-352.

- Shlobin, N. A., M. Har-Even, Z. Itsekson-Hayosh, S. Harnof and C. G. Pick (2021). "Role of Thrombin in Central Nervous System Injury and Disease." Biomolecules **11**(4).
- Shohami, E., M. Novikov and R. Bass (1995). "Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat." Brain Res **674**(1): 55-62.
- Sokolova, E. and G. Reiser (2008). "Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases." Thromb Haemost **100**(4): 576-581.
- Spiegel, P. C. (2022). "Shining a light on thrombin activation." Blood **139**(24): 3451-3453.
- Stein, M., B. Misselwitz, G. F. Hamann, W. Scharbrodt, D. I. Schummer and M. F. Oertel (2012). "Intracerebral hemorrhage in the very old: future demographic trends of an aging population." Stroke **43**(4): 1126-1128.
- Steiner, T., M. Kaste, M. Forsting, D. Mendelow, H. Kwicinski, I. Szikora, S. Juvela, A. Marchel, R. Chapot, C. Cognard, A. Unterberg and W. Hacke (2006). "Recommendations for the management of intracranial haemorrhage - part I: spontaneous intracerebral haemorrhage. The European Stroke Initiative Writing Committee and the Writing Committee for the EUSI Executive Committee." Cerebrovasc Dis **22**(4): 294-316.
- Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger and M. D. Hollenberg (2005). "Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response." Endocr Rev **26**(1): 1-43.
- Stojanovski, B. M., L. A. Pelc, X. Zuo, N. Pozzi and E. D. Cera (2018). "Enhancing the anticoagulant profile of meizothrombin." Biomol Concepts **9**(1): 169-175.
- Striggow, F., M. Riek, J. Breder, P. Henrich-Noack, K. G. Reymann and G. Reiser (2000). "The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2264-2269.
- Striggow, F., M. Riek-Burchardt, A. Kiesel, W. Schmidt, P. Henrich-Noack, J. Breder, M. Krug, K. G. Reymann and G. Reiser (2001). "Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia." Eur J Neurosci **14**(4): 595-608.
- Sturgeon, J. D., A. R. Folsom, W. T. Longstreth, Jr., E. Shahar, W. D. Rosamond and M. Cushman (2007). "Risk factors for intracerebral hemorrhage in a pooled prospective study." Stroke **38**(10): 2718-2725.
- Sugawara, T., V. Jadhav, R. Ayer, W. Chen, H. Suzuki and J. H. Zhang (2009). "Thrombin inhibition by argatroban ameliorates early brain injury and improves neurological outcomes after experimental subarachnoid hemorrhage in rats." Stroke **40**(4): 1530-1532.
- Suzuki, M., A. Ogawa, Y. Sakurai, A. Nishino, K. Venohara, K. Mizoi and T. Yoshimoto (1992). "Thrombin activity in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage." Stroke **23**(8): 1181-1182.
- Trepel, M. (2004). Neuroanatomie: Struktur und Funktion. München, Urban&Fischer.
- Tsao, C. W., A. W. Aday, Z. I. Almarzooq, A. Alonso, A. Z. Beaton, M. S. Bittencourt, A. K. Boehme, A. E. Buxton, A. P. Carson, Y. Commodore-Mensah, M. S. V. Elkind, K. R. Evenson, C. Eze-Nliam, J. F. Ferguson, G. Generoso, J. E. Ho, R. Kalani, S. S. Khan, B. M. Kissela, K. L. Knutson, D. A. Levine, T. T. Lewis, J. Liu, M. S. Loop, J. Ma, M. E. Mussolino, S. D. Navaneethan, A. M. Perak, R. Poudel, M. Rezk-Hanna, G. A. Roth, E. B. Schroeder, S. H. Shah, E. L. Thacker, L. B. VanWagner, S. S. Virani, J. H. Voeks, N. Y. Wang, K. Yaffe and S. S. Martin (2022). "Heart Disease

- and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **145**(8): e153-e639.
- Tsivgoulis, G., V. A. Lioutas, P. Varelas, A. H. Katsanos, N. Goyal, R. Mikulik, K. Barlinn, C. Krogias, V. K. Sharma, K. Vadikolias, E. Dardiotis, T. Karapanayiotides, A. Pappa, C. Zompola, S. Triantafyllou, O. Kargiotis, M. Ioakeimidis, S. Giannopoulos, A. Kerro, A. Tsantes, C. Mehta, M. Jones, C. Schroeder, C. Norton, A. Bonakis, J. Chang, A. W. Alexandrov, P. Mitsias and A. V. Alexandrov (2017). "Direct oral anticoagulant- vs vitamin K antagonist-related nontraumatic intracerebral hemorrhage." Neurology **89**(11): 1142-1151.
- van Asch, C. J., M. J. Luitse, G. J. Rinkel, I. van der Tweel, A. Algra and C. J. Klijn (2010). "Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **9**(2): 167-176.
- van Rossum, D. and U. K. Hanisch (2004). "Microglia." Metab Brain Dis **19**(3-4): 393-411.
- Vaughan, P. J., C. J. Pike, C. W. Cotman and D. D. Cunningham (1995). "Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults." J Neurosci **15**(7 Pt 2): 5389-5401.
- Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton and S. R. Coughlin (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." Cell **64**(6): 1057-1068.
- Wang, H. and G. Reiser (2003). "Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors." Biol Chem **384**(2): 193-202.
- Wang, H., J. J. Ubl and G. Reiser (2002). "Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling." Glia **37**(1): 53-63.
- Wang, J. (2010). "Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage." Prog Neurobiol **92**(4): 463-477.
- Wang, J., J. Fields and S. Dore (2008). "The development of an improved preclinical mouse model of intracerebral hemorrhage using double infusion of autologous whole blood." Brain Res **1222**: 214-221.
- Wang, J. W., J. P. Li, Y. L. Song, K. Tan, Y. Wang, T. Li, P. Guo, X. Li, Y. Wang and Q. H. Zhao (2014). "Stereotactic aspiration versus craniotomy for primary intracerebral hemorrhage: a meta-analysis of randomized controlled trials." PLoS One **9**(9): e107614.
- Ward, J. M. and J. E. Rehg (2014). "Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting." Vet Pathol **51**(1): 88-101.
- Werner, M., A. Chott, A. Fabiano and H. Battifora (2000). "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry." Am J Surg Pathol **24**(7): 1016-1019.
- Wu, X., W. Zhang, J. Y. Li, B. X. Chai, J. Peng, H. Wang and M. W. Mulholland (2011). "Induction of apoptosis by thrombin in the cultured neurons of dorsal motor nucleus of the vagus." Neurogastroenterol Motil **23**(3): 279-285, e123-274.
- Xi, G., G. Reiser and R. F. Keep (2003). "The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective?" J Neurochem **84**(1): 3-9.
- Xiong, L., Y. D. Reijmer, A. Charidimou, C. Cordonnier and A. Viswanathan (2016). "Intracerebral hemorrhage and cognitive impairment." Biochim Biophys Acta **1862**(5): 939-944.
- Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie and D. C. Foster (1998). "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6642-6646.

- Xue, M., M. D. Hollenberg, A. Demchuk and V. W. Yong (2009). "Relative importance of proteinase-activated receptor-1 versus matrix metalloproteinases in intracerebral hemorrhage-mediated neurotoxicity in mice." Stroke **40**(6): 2199-2204.
- Yang, S., S. Song, Y. Hua, T. Nakamura, R. F. Keep and G. Xi (2008). "Effects of thrombin on neurogenesis after intracerebral hemorrhage." Stroke **39**(7): 2079-2084.
- Yao, Z., L. Ma, C. You and M. He (2018). "Decompressive Craniectomy for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis." World Neurosurg **110**: 121-128.
- Yeh, R. W. and I. K. Jang (2006). "Argatroban: update." Am Heart J **151**(6): 1131-1138.
- Zhou, Z. H., F. Qu and C. D. Zhang (2011). "Systemic administration of argatroban inhibits protease-activated receptor-1 expression in perihematomal tissue in rats with intracerebral hemorrhage." Brain Res Bull **86**(3-4): 235-238.

9. Danksagung

Mein Dank geht an den Direktor für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik durchführen zu dürfen.

Besonders danken möchte ich mich bei meinen Betreuern für die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Den Rat und die konstruktive Kritik haben mir in so vielen Situationen weitergeholfen und mich motiviert, auch in beschwerlichen Zeiten dabei zu bleiben.

Des weiteren möchte ich mich bei den Labormitarbeitenden für die großartige Unterstützung und Hilfestellung im Labor bedanken. Ich danke dem gesamten Team der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz für die mühevollen Geduld und Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Ferner danke ich meiner Mitdoktorandin, mit der ich zusammen dieses Projekt gemeistert habe. Das Arbeiten mit Dir wird mir immer in besonderer Erinnerung bleiben.

Ich danke meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben, für ihr stets offenes Ohr und den moralischen Beistand bei der Umsetzung meiner Arbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Für Eure Geduld, Rücksichtnahme und Glauben an mich bin ich Euch in aller Hinsicht tief verbunden. Ihr gabt mir die Inspiration und Kraft zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation und habt mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht, dafür bin ich Euch auf Ewig dankbar.