

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Histologische und molekularbiologische Untersuchungen bei Protease-aktivierter  
Rezeptor 4-defizienten Mäusen nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

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

Vorgelegt von

Leonie Sophie Link  
aus Freising

Mainz, 2026

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 27. April 2026

Nachnutzungslizenz: Urheberrechtsschutz (in C-1.0)

# **Inhalt**

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) .....	3
2.1.1 Definition des SHT .....	3
2.1.2 Epidemiologie des SHT .....	3
2.1.3 Pathophysiologie des SHT .....	4
2.1.3.1 Primärer Hirnschaden.....	4
2.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden.....	6
2.1.4 Blutungskomplikationen nach SHT .....	10
2.2 Das Gerinnungssystem .....	14
2.2.1 Physiologie der Blutgerinnung .....	14
2.2.1.1 Primäre Hämostase .....	14
2.2.1.2 Sekundäre Hämostase .....	16
2.2.1.3 Antikoagulatorisches System .....	17
2.2.1.4 Fibrinolyse.....	19
2.2.2 Hämostase nach SHT .....	19
2.3 PAR4.....	23
2.3.1 Grundlagen .....	23
2.3.2 Rolle des PAR4 in der Blutgerinnung.....	25
2.3.3 Rolle des PAR4 in der Hämostase nach SHT .....	27
2.3.4 Rolle des PAR4 in der Neuroinflammation .....	27
2.3.5 PAR4 als potenzieller Therapieansatz in der Klinik .....	28
2.4 Das SHT im Mausmodell.....	31
3 Methoden.....	33
3.1 Tierexperiment .....	33
3.1.1 Tierversuchsantrag .....	33
3.1.2 Versuchstiere.....	33
3.1.3 Haltung der Versuchstiere .....	33
3.1.4 Abbruchkriterien.....	34
3.1.5 Studiendesign .....	34
3.2 Invasive Verfahren .....	34

3.2.1	Präoperative Phase .....	34
3.2.2	Induktion des SHT durch das CCI-Modell .....	35
3.2.3	Postoperative Phase.....	37
3.3	Erfassung des Körpergewichts .....	37
3.4	Verhaltensbiologische Untersuchungen .....	37
3.4.1	Neurological Severity Score (NSS) .....	37
3.4.2	Rotarod-Test (RR) .....	38
3.5	Euthanasie und Gehirnentnahme .....	39
3.6	Histologische Datenerhebung .....	39
3.6.1	Kryosektion und Probengewinnung.....	39
3.6.2	Nissl-Färbung .....	41
3.6.3	Quantifizierung des Läsionsvolumens.....	42
3.6.4	Quantifizierung des Körnerzellbandes im Gyrus dentatus .....	43
3.6.5	Immunhistochemische Färbung auf Immunglobulin G (IgG).....	43
3.6.6	Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung.....	45
3.6.7	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung.....	46
3.6.8	Quantifizierung des Hämatomareals .....	47
3.7	Molekularbiologische Methoden .....	47
3.7.1	Analyse der exprimierten mRNA.....	47
3.7.2	Extraktion der mRNA .....	47
3.7.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	49
3.7.4	Herstellung der cDNA .....	49
3.7.5	qRT-PCR .....	50
3.8	Statistische Auswertung .....	54
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Kaplan-Meier-Überlebenskurve .....	57
4.2	Körpergewicht und Verhaltensuntersuchungen .....	58
4.2.1	Körpergewicht.....	58
4.2.2	NSS .....	60
4.2.3	RR-Test .....	61
4.3	Histologische Untersuchungen .....	63
4.3.1	Auswertung des Läsionsvolumen .....	63
4.3.2	Auswertung der Körnerzellbandmessung.....	65
4.3.3	Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf IgG .....	68
4.3.4	Auswertung der HE-Färbung .....	71

4.4	Auswertung der qRT-PCR.....	72
4.4.1.1	<i>Iba1</i> .....	74
4.4.1.2	<i>Gfap</i> .....	75
4.4.1.3	<i>IL6</i> .....	75
4.4.1.4	<i>IL1<math>\beta</math></i> .....	75
4.4.1.5	<i>Serpine1</i> .....	75
4.4.1.6	<i>Tnfa</i> .....	76
4.4.1.7	<i>Fcgr1</i> .....	76
4.4.1.8	<i>Plau</i> .....	77
4.4.1.9	<i>Plat</i> .....	77
4.4.1.10	<i>Hck</i> .....	77
4.4.1.11	<i>Cd68</i> .....	78
4.4.1.12	<i>Mmp9</i> .....	78
4.4.1.13	<i>Mpo</i> .....	79
4.4.1.14	<i>Lcn2</i> .....	79
5	Diskussion .....	80
5.1	Motorische und neurologische Einschränkungen sowie Phänotyp.....	80
5.2	Blutgerinnung .....	81
5.3	Störung der BHS und Neuroinflammation.....	83
5.4	Zusammenhang Gerinnung und Immunsystem .....	85
5.5	Klinische Relevanz .....	86
5.6	Limitationen dieser Dissertation.....	88
5.7	Fazit und Ausblick .....	89
6	Zusammenfassung .....	90
7	Literaturverzeichnis.....	92
8	Anhang .....	111
8.1	Verbrauchsmaterialien .....	111
8.2	Geräte .....	112
8.3	Chemikalien .....	113
8.4	Arzneimittel .....	114
8.5	Antikörper.....	114
8.6	Kits .....	115
8.7	Puffer und Lösungen .....	115
8.8	Primer .....	116
8.9	Software.....	118
9	Publikationen .....	119

10	Danksagung .....	120
11	Tabellarischer Lebenslauf .....	122

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
a	Aktiviert
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BL6	Wildtyp-Kontrollmäuse
CCI	Controlled Cortical Impact (= kontrolliertes Schädel-Hirn-Trauma)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (= komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
CP	Crossing Point (= Schwellenwertzyklus)
DAB	3-3' Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
ECL	Extracellular loop (= extrazelluläre Schleife)
EDH	Epidurales Hämatom
FcγRI	Hochaffiner Fc-γ-Rezeptor I
FPI	Fluid percussion injury (= Flüssigkeits-Perkussions-Verletzung)
g	Gramm
GCL	Granular cell layer (= Körnerzellband)
GCS	Glasgow-Coma-Scale
gDNA	Genomic deoxyribonucleic acid (= genomische Desoxyribonukleinsäure)
GFAP	Saures Gliafaserprotein
h	Stunden
HCK	Hämatopoetische Zellkinase

<b>HE</b>	Hämatoxylin/Eosin
<b>HRP</b>	Horseradish-peroxidase (= Meerrettichperoxidase)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>Iba1</b>	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptormolekül 1
<b>ICB</b>	Intrazerebrale Blutung
<b>ICL</b>	Intracellular loop (= intrazelluläre Schleife)
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>Lcn2</b>	Lipocalin-2
<b>m/s</b>	Meter pro Sekunde
<b>min</b>	Minute(n)
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>3</sup></b>	Kubikmillimeter
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid (= Boten- Ribonukleinsäure)
<b>ms</b>	Millisekunden
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NSS</b>	Neurological Severity Score (= Neurologischer Schweregrad Score)
<b>OP</b>	Operation
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PAI-1</b>	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
<b>PAR4</b>	Protease-activated receptor 4 (= Protease- aktivierter Rezeptor 4)
<b>PAR4<sup>-/-</sup></b>	Mäuse mit Gen-Knockout für PAR4
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PL</b>	Phospholipid
<b>Post</b>	Postoperativ
<b>PPIA</b>	Peptidylprolyl Isoerase A
<b>Prä</b>	Präoperativ
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (= quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde(n)
<b>SAB</b>	Subarachnoidalblutung
<b>SDH</b>	Subdurales Hämatom
<b>SEM</b>	Standard error of the mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
<b>SHT</b>	Schädel-Hirn-Trauma
<b>TF</b>	Tissue factor
<b>TL</b>	Tethered ligand (= angebundener Ligand)
<b>TM</b>	Transmembrandomäne
<b>tMCAO</b>	Transient middle cerebral artery occlusion (= transienter Verschluss der mittleren Hirnarterie)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>t-PA</b>	Gewebsplasminogenaktivator
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>u-PA</b>	Urokinase/ Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas .....	6
Abbildung 2: Übersicht intrakranielle Blutungen .....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der primären Hämostase .....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase .....	18
Abbildung 5: Aufbau und Struktur der Protease-aktivierten Rezeptoren modifiziert nach Chandrabalan et al. (135) .....	23
Abbildung 6: Übersicht über Proteasen, die Protease-aktivierte Rezeptoren spalten, mit korrespondierender Spaltungsstelle, modifiziert nach Han et al.(136, 146, 147) .....	25
Abbildung 7: Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von Protease- aktiviertem Rezeptor 4 (PAR4) modifiziert nach French et al. (132) .....	26
Abbildung 8: Schnittführung Hautschnitt sowie Kraniotomie während des Controlled Cortical Impact-Modells .....	35
Abbildung 9: Ablauf des Controlled Cortical Impact-Modells .....	36
Abbildung 10: Rotarod-Test .....	39
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Anfertigung der Hirnschnitte sowie exemplarischer Hirnschnitt mit Läsion, verursacht durch das Controlled Cortical Impact-Modell .....	40
Abbildung 12: Exemplarischer Ablauf einer quantitativen Real-Time- Polymerasenkettenreaktion .....	51
Abbildung 13: Amplifikationskurve mit Crossing Point .....	52
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve .....	57
Abbildung 15: Vergleich präoperatives und postoperatives Körpergewicht.....	58
Abbildung 16: Postoperativer Gewichtsverlust in Prozent.....	59
Abbildung 17: Ergebnisse des Neurological Severity Score .....	60
Abbildung 18: Ergebnisse Rotarod.....	61
Abbildung 19: Differenz Rotarodwerte präoperativ vs. postoperativ .....	62

Abbildung 20: Absolutes Läsionsvolumen .....	63
Abbildung 21: Läsionsvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der ipsiläsionalen Hemisphäre.....	64
Abbildung 22: Läsionsvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der kontraläsionalen Hemisphäre .....	64
Abbildung 23: Mikroskopie-Bilder der Kresylviolett-färbung .....	65
Abbildung 24: Dicke des ipsiläsionalen Körnerzellbandes.....	66
Abbildung 25: Verhältnis der Dicke der GCL zwischen ipsiläsionaler und kontraläsionaler Hemisphäre.....	66
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der granular cell layer (GCL) in koronarer Schnittführung.....	67
Abbildung 27: Areal Immunglobulin G (IgG)-Extravasation im Verhältnis zum totalen Gehirnareal.....	68
Abbildung 28: Areal Immunglobulin G (IgG)-Extravasation ipsiläsional im Verhältnis zur ipsiläsionalen Hemisphäre .....	69
Abbildung 29: Areal Immunoglobulin G (IgG)-Extravasation kontraläsional im Verhältnis zur kontraläsionalen Hemisphäre .....	69
Abbildung 30: Mikroskopie-Bilder der Immunglobulin-G (IgG)-Immunohistochemiefärbung .....	70
Abbildung 31: Ergebnis Hämatomareal.....	71
Abbildung 32: Mikroskopie-Bilder der Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung .....	72
Abbildung 33: Quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)-Ergebnisse [1] .....	73
Abbildung 34: Quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)-Ergebnisse [2] .....	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Modifizierter Neurological Severity Score nach Chen et al. (202) ....	38
Tabelle 2:	Pipettierschema für die quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion .....	53
Tabelle 3:	Signifikanzniveaus .....	54
Tabelle 4:	Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien .....	111
Tabelle 5:	Übersicht verwendeter Geräte .....	112
Tabelle 6:	Übersicht verwendeter Chemikalien .....	113
Tabelle 7:	Übersicht verwendeter Arzneimittel .....	114
Tabelle 8:	Übersicht verwendeter Antikörper .....	114
Tabelle 9:	Übersicht verwendeter Kits .....	115
Tabelle 10:	Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen .....	115
Tabelle 11:	Übersicht verwendeter Primer .....	116
Tabelle 12:	Übersicht verwendeter Software .....	118

## **Gender-Hinweis**

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertationsschrift das generische Maskulinum verwendet. Die männliche Personenbezeichnung repräsentiert – sofern nicht explizit hervorgehoben – stets sowohl das weibliche als auch das männliche Geschlecht.

## **1 Einleitung**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt ein Erkrankungsbild mit potenziell schwerwiegenden individuellen Folgen für Patienten und die Gesellschaft dar. Die angegebenen Inzidenzen variieren. Einigkeit besteht jedoch darin, dass das SHT weltweit eine der Hauptursachen für Tod und Behinderung ist und eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem darstellt. Laut der Weltgesundheitsorganisation führt das SHT zu mehr als 10 Millionen Hospitalisierungen jährlich (1, 2, 3, 4). Weltweit erleiden ca. 69 Millionen Menschen ein SHT jedes Jahr (5), in Europa liegt die Inzidenz bei 235 aus 100.000, mit einer Sterblichkeitsrate von 0,015 Prozent (%) (1, 6). Das Altersspektrum erstreckt sich hauptsächlich vom 25. bis 75. Lebensjahr (1, 7, 8), dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen (1, 6, 9, 10). Unter den jungen Patienten zählen Unfälle zu den Hauptursachen. Bei Kindern und älteren Patienten sind es vor allem Stürze (1). Die Komplexität des Erkrankungsbildes des SHT liegt in der hohen kurzfristigen Sterblichkeit und dem hohen Risiko für schwere neurologische Komplikationen und Einschränkungen im langfristigen Outcome begründet (1).

Vereinfachend lässt sich das SHT als komplexe neuronale und zerebrale Schädigung durch ein externes traumatisches Ereignis beschreiben. Das SHT kann als zweizeitiges Ereignis angesehen werden: Der initiale Primärschaden, der durch direkte mechanische Kräfte des initialen Traumas entsteht, ist nicht reversibel (5, 11). Der sekundäre und potenziell reversible Hirnschaden wird in Folge des verletzten Hirngewebes durch den Primärschaden bereits wenige Minuten (min) danach ausgelöst. Der sekundäre Hirnschaden lässt sich als eine komplexe Abfolge von biochemischen Prozessen zusammenfassen, die die Wiederherstellung der zerebralen Hämostase zum Ziel haben. Die Pathophysiologie ist vielschichtig und beinhaltet inflammatorische Prozesse, Nekrosen und Apoptosen, metabolische und immunologische Dysfunktionen, Ödembildungen sowie Koagulopathien (5, 12, 13).

Bis zum heutigen Tag beschränken sich die Therapiemöglichkeiten auf supportive Maßnahmen zur Wiederherstellung des physiologischen Zustands. Eine kausale Therapie konnte bislang nicht etabliert werden, da trotz vielseitiger Forschungsprojekte die exakten zu Grunde liegenden pathologischen Mechanismen des sekundären Hirnschadens ungeklärt sind. Die potenzielle Reversibilität des sekundären Hirnschadens ist daher anhaltend Gegenstand der Forschung. Eine derangierte

Hämostase stellt einen wichtigen Bestandteil des sekundären Hirnschadens dar. Das SHT kann sowohl zu einer erhöhten Blutungsneigung als auch zu einer vermehrten Thrombenbildung führen. Thrombozytenfunktionsstörungen werden als mögliche Ursache hierfür gehandelt (14, 15). Beide Pathologien haben eine Aggravation des sekundären Hirnschadens zur Folge.

Der Protease-aktivierte Rezeptor 4 (PAR4) wird auf Thrombozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Hämostase bei der Ausbildung stabiler Thromben (16, 17, 18, 19, 20). Angesichts seiner effektiven antithrombotischen Wirkweise sind PAR4-Antagonisten bereits Gegenstand klinischer Studien zur Prävention von thrombotischen Ereignissen (19, 21). Darüber hinaus geriet der PAR4 aufgrund seiner potenziellen neuroprotektiven Wirkung in den Fokus der Forschung. Nach SHT ist PAR4 in der Penumbra hochreguliert und eine Inhibition/ Defizienz zeigt in Schlaganfallmodellen sowie nach SHT verminderte Hirnschäden (22, 23). Der genaue pathophysiologische Mechanismus, der die potenziell neuroprotektive Wirkung einer PAR4-Defizienz erklärt sowie die Rolle von PAR4 als mögliche Konnektionsstelle zwischen Koagulopathie und Neuroinflammation nach SHT, bleibt jedoch bislang ungeklärt.

Diese Forschungsarbeit befasst sich mit der PAR4-Defizienz nach experimentellem SHT im Mausmodell. PAR4-knockout Mäuse (PAR4<sup>-/-</sup>) sowie BL6-Wildtyp-Kontrollmäuse (BL6) werden dem standardisierten Controlled Cortical Impact (CCI)-Modell unterzogen. Die Auswirkungen der PAR4-Defizienz werden im Anschluss mithilfe von verhaltensbiologischen Tests, histologischen Analysen und biochemischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen evaluiert. Ziel dieser Untersuchung war es potenzielle neuroprotektive Effekte und Einflüsse auf die posttraumatische Koagulopathie und Neuroinflammation einer PAR4-Defizienz nach SHT zu detektieren und hierdurch mögliche Therapieansätze für den sekundären Hirnschaden nach SHT ableiten zu können.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)**

#### **2.1.1 Definition des SHT**

Das SHT wird verursacht durch eine äußere mechanische Kraft, die eine Beeinträchtigung der Gehirnfunktion zur Folge hat (24). Schlag, Stoß, Anprall oder eine penetrierende Verletzung können als äußere Kraft fungieren (25). Die Beeinträchtigung der Gehirnfunktion kann akut mit Änderung des Bewusstseinszustandes, langfristig mit eingeschränkter kognitiver Leistungsfähigkeit sowie einer erhöhten Inzidenz für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer einhergehen (26). Anhand der 1974 eingeführten Glasgow-Coma-Scale (GCS) kann das SHT in die drei verschiedene Schweregrade „mild“, „moderat“ und „schwer“ unterteilt werden (27). Ein leichtes SHT entspricht einer GCS von 13-15 Punkten, ein moderates SHT einer Punktzahl von 9-12 und ein schweres SHT liegt zwischen 3-8 Punkten vor (28). Die GCS umfasst hierbei die Bewertung der verbalen Reaktion, der motorischen Funktion sowie des Augenöffnens (29). Aufgrund der limitierten Aussagekraft der GCS über die zugrunde liegende verursachende Pathologie des SHT sowie möglicher Normwerte bei mildem SHT, wird im klinischen Alltag die Diagnostik durch eine Computertomographie des Schädels ergänzt (30, 31).

#### **2.1.2 Epidemiologie des SHT**

Die Inzidenz, Prävalenz und Mortalität des SHT zeigen weltweit große Differenzen. In einer Analyse der Jahre 1990 bis 2001 belief sich die Zahl der neu aufgetretenen Fälle auf etwa 20,85 Millionen. Hierzu addieren sich die bereits bestehenden Fälle, angegeben mit 37,93 Millionen (32). Dewan et al. schätzten die Inzidenz jährlich auf ca. 69 Millionen weltweit (33). Die Inzidenz war in Amerika sowie in Europa am höchsten (33). Für Europa wird die Hospitalisierungsrate mit 1,5 Millionen angegeben, mit einer Mortalität von ca. 12 pro 100.000 Patienten (34, 35). Als häufigste Ursachen für ein SHT werden Stürze gefolgt von Verkehrsunfällen (insbesondere bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen) angegeben (32, 36, 37). Das SHT ist somit die führende Ursache für Tod und Behinderung unter allen traumatisch bedingten Verletzungen weltweit (38). Männer im mittleren Alter sind dreimal häufiger betroffen als Frauen (39). In Anbetracht der immer noch unterschiedlichen, aber auch mangelnden Datenlage, ist es schwierig eine Aussage bezüglich des

Erkrankungsgipfels des SHT anzugeben. In den letzten Jahren hat sich der Erkrankungsgipfel in Richtung älterer Altersgruppen verschoben, 63 Prozent (%) der betroffenen Patienten sind  $\geq 16$  Jahre. Jedoch sind auch Jugendliche bzw. junge Erwachsene, aufgrund ihres gesteigerten Risikoverhaltens, vermehrt betroffen (37, 40, 41, 42). Eine Untersuchung bei Patienten mit stumpfem SHT ergab eine bimodale Verteilung der Altersgipfel mit einem erhöhten Risiko für Patienten  $< 10$  Jahre sowie  $> 65$  Jahre (43). Die weltweiten Gesundheitskosten, verursacht durch das SHT, werden auf ca. 400 Billionen US-Dollar geschätzt. Die Höhe der Kosten steigt mit der Schwere des SHT, vor allem verursacht durch den Krankenhausaufenthalt, gefolgt von Kosten für die Rehabilitation sowie für intrakranielle Operationen (44). Die oben dargestellten Zahlen verdeutlichen die erhebliche Belastung für Gesellschaft und Gesundheitssystem durch das SHT und unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung und Etablierung gezielter Präventions-, aber vor allem auch evidenter kausaler Behandlungsstrategien.

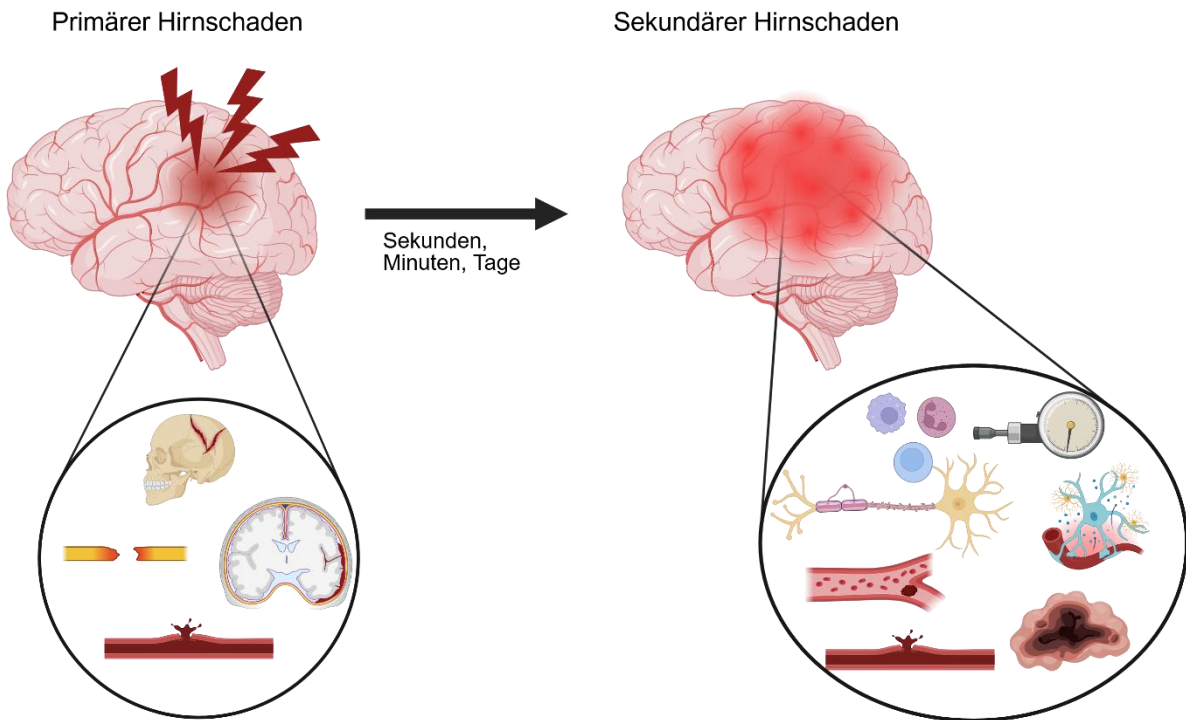
### 2.1.3 Pathophysiologie des SHT

Der Pathomechanismus des SHT lässt sich in einen primären und sekundären Hirnschaden unterteilen. Generell gilt es jedes SHT individuell zu betrachten, da die Pathophysiologie von vielen Faktoren wie Traumamechanismus, Lokalisation der Verletzung, Alter, Geschlecht, Schweregrad und Verletzungsmuster beeinflusst wird (45).

#### 2.1.3.1 Primärer Hirnschaden

Der primäre Hirnschaden entsteht zum Zeitpunkt des Traumas durch die mechanische Einwirkung und kann durch Schutzausrüstung wie Fahrradhelm, Sicherheitsgurt etc. abgemindert werden. Durch die mechanischen Kräfte kommt es zur Bewegung des Gehirns innerhalb des Schädelknochens, zur Kollision des Gehirns mit dem Schädelknochen und hierdurch zu Gewebedeformierungen (45, 46). Hierdurch entsteht eine Kontusion an der Verletzungsstelle (coup). Die Kontusion ist das Resultat aus einer Kombination von Gefäß- und Gewebeschaden (47). Umgeben ist die Kontusion von einem Areal mit nekrotischen Neuronen und glialen Zellen sowie eingeschränkter Blutversorgung mit konsequenter Ischämie. Eine sekundäre Kontusion (contre-coup) kann sich auf der entgegengesetzten Seite der Primärkontusion durch „Wiederanprallen“ des Gehirns auf der entgegengesetzten Seite an die Schädelkalotte ausbilden (48).

Der primäre Hirnschaden ist keinerlei Therapie zugänglich, da er irreversibel ist. Jedoch ist das Outcome des Patienten abhängig von der Ausprägung des initialen Traumas (45, 49). Der primäre Hirnschaden lässt sich unterteilen in eine fokale und diffuse Hirnschädigung (50). Durch schnelle Rotationskräfte, Be- und Entschleunigungskräfte kommt es z.B. durch Dehnung und Zerreißung von Axonen zu diffuser Schwellung und axonaler Diskonnektion resultierend in einer diffusen axonalen Schädigung (51). Die Axone der weißen Substanz sind offenbar besonders empfindlich gegenüber Schäden durch mechanische Einwirkung und das Ausmaß an axonaler Schädigung und neuronalem Untergang ist maßgeblich für den Schweregrad des SHT (50, 52). Die diffuse axonale Schädigung korreliert mit dem Bewusstseinsverlust nach SHT (53). Zu den fokalen Schädigungen zählen intrakranielle Hämatomate, Frakturen des Schädels, Kontusionen und Lacerationen (46). Intrakranielle Druckspitzen sowie die einwirkenden mechanischen Kräfte können zu Rupturen von Blutgefäßen und in Folge zu intrakraniellen Blutungen führen. Zusätzlich kann es aufgrund von Unterbrechungen des Blutflusses durch eine Dysbalance von Vasokonstriktion und -dilatation zu einer Ischämie kommen (54).



**Abbildung 1: Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas**

Dargestellt sind der primäre sowie sekundäre Hirnschaden mit ihren diversen Auswirkungen. Für den primären Hirnschaden hier beispielsweise Schädelfraktur, intrakranielle Blutungen und axonale Schädigung. Für den sekundären Hirnschaden beispielhaft Inflammation, erhöhter intrakranieller Druck, Axonschädigungen, Gefäßverschlüsse, Nekrosen, erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und Blutungen. Created with BioRender.com.

### 2.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden

Die während des primären Hirnschadens stattgefundenen zellulären, physiologischen und biochemischen Ereignisse initiieren den sekundären Hirnschaden, welcher Stunden bis Jahre andauern kann (26). Diverse pathophysiologische, sich gegenseitig beeinflussende, ablaufende Prozesse fügen sich hier zu einem komplexen Bild zusammen, welches in seiner Gesamtheit als sekundärer Hirnschaden bezeichnet wird.

Die neuroinflammatorische Kaskade nach SHT repräsentiert einen sehr wichtigen und großen Anteil am sekundären Hirnschaden. Sie läuft noch einen langen Zeitraum nach dem akuten Ereignis ab und ist Ursache für das sehr heterogene Outcome nach SHT (55). Am Beginn der neuroinflammatorischen Kaskade steht die Freisetzung von „Warnsignalen“ durch die Schädigung von Neuronen und Gewebe. Diese Damage-Associated Molecular Patterns aktivieren die angeborene Immunantwort (55).

Die Mikroglia ist ein Teil des angeborenen Immunsystems des zentralen Nervensystems (ZNS). Ihre Aufgabe ist, unter physiologischen Bedingungen, die konstante Überwachung der zellulären Umgebung auf schädliche Stoffe und infektiöse Prozesse (56). Nach SHT kommt es durch proinflammatorische Stoffe wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Stickstoffmonoxid (NO) aber auch antiinflammatorischen Stoffe (Prostaglandine, Interleukin-4, Interleukin-13) zur Aktivierung der Mikroglia. Hierbei entstehen hauptsächlich zwei Phänotypen an Mikroglia. Der M1-Phänotyp führt zu einer erhöhten Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen, im Sinne einer Immunabwehr, jedoch kann er hierbei auch eine Schädigung des gesunden Gehirngewebes verursachen. Der antiinflammatorische M2-Phänotyp wird im Gegensatz dazu durch antiinflammatorische Substanzen aktiviert und veranlasst neuronales Wachstum, die Ausbildung neuer Gefäße, die Regeneration geschädigten Gewebes und die Suppression einer überschießenden Immunreaktion (56). Im Rahmen des SHT werden beide Phänotypen gleichzeitig aktiviert. Die ablaufenden Prozesse, die einen pro- oder antiinflammatorischen Weg begünstigen sind weiterhin Gegenstand der Forschung (56).

Neben der Mikroglia können proinflammatorische Moleküle wie Interleukine oder Tumornekrosefaktoren auch von anderen Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Hierzu zählen Neutrophile, dendritische Zellen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, welche angelockt durch Chemokine in das Gehirn einwandern (55). Zusätzlich werden Mastzellen aktiviert und mobilisiert, welche wiederum weitere Immunzellen aus der Peripherie anlocken (57, 58, 59).

Durch die bereits oben genannten Signalsubstanzen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , aber auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden nach SHT Matrixmetalloproteinasen (MMP) aktiviert. Ihre primäre Aufgabe ist der Abbau der Extrazellulärmatrix. Nach SHT werden vor allem die Subtypen MMP-2, MMP-3 und MMP-9 ausgeschüttet. Als sezernierende Zellen fungieren hierbei Astrozyten, Endothelzellen, Mikroglia oder Neurone. Die Aktivierung von MMPs führt schlussendlich zu einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und zur Zellapoptose (56).

Durch die mechanischen Kräfte während des Traumas kommt es zur Dehnung von Neuronen. Dies verursacht eine übermäßige Aktivierung und Erregung dieser Zellen. Einer der Haupttransmitter des ZNS, Glutamat, spielt eine wichtige Rolle für die

Exzitotoxizität. Glutamat wird durch Lyse von Neuronen sowie die mechanische Dehnung dieser freigesetzt. Konsekutiv kommt es zur Überaktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren. Dies führt zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Neuronen und in Folge zu neuronaler Schädigung und Apoptose (13, 55). Die ausgeprägte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren induziert zudem die Expression inflammatorischer Gene (55). Die durch Exzitotoxizität induzierte neuronale Apoptose sowie die proinflammatorischen Prozesse tragen zur Aggravation der Neuroinflammation und des sekundären Hirnschadens bei (55).

Oxidativer Stress bedeutet, dass das antioxidative System aufgrund von vermehrt anfallenden freien (Sauerstoff-) Radikalen überlastet ist (55). Wie zuvor erwähnt kommt es nach SHT zur Freisetzung von ROS. Dies geschieht durch Ischämie, zelluläre Azidose wie auch durch Sezernierung durch Mikroglia, Makrophagen und Neutrophile (55, 60). Ein weiterer wichtiger Auslöser der massiven ROS-Produktion nach SHT ist die Exzitotoxizität. Sie führt zur intrazellulären Kalziumakkumulation und durch Aufnahme des Kalziums in die Mitochondrien kommt es zur ROS-Bildung (60). Im Rahmen eines circulus vitiosus schädigen die ROS wiederum die Mitochondrien und vermindern die ATP-Synthese. Durch eine Kalziumüberladung in den Mitochondrien im ZNS kommt es zur mitochondrialen Funktionseinschränkung und wiederum zur Freisetzung von freien Radikalen (55). Zu den ROS zählen z.B. Superoxidradikale oder NO. Superoxidradikale beeinträchtigen die Funktion der BHS. NO zählt zu den vasodilatierenden Faktoren und führt durch Reaktion mit Superoxiden zur Freisetzung weiterer freier Radikale. Das ZNS ist sehr anfällig für diese freie Radikale aufgrund seiner für Peroxidation anfälligen Membranlipide und der geringen Anzahl an antioxidativen Faktoren. Durch Schädigung der Zellmembran kommt es zur neuronalen Zellschädigung und somit zum Zelltod (56, 60).

Die BHS besteht aus den Endothelzellen der kleinen Blutgefäße im Gehirn. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Regulation des Stoffaustausches zwischen Gehirn und Blut. Hierbei können essenzielle Nährstoffe und andere wichtige Moleküle die BHS passieren, während Schadstoffe abgehalten werden. Dadurch trägt die BHS einen wichtigen Teil zur Hämostase des Gehirns bei (57, 61, 62). Während eines SHT wird ein so großer mechanischer Stress auf die Endothelzellen ausgeübt, dass es zu einer Ruptur der BHS kommt, resultierend im Zusammenbrechen der tight junctions (57).

Eine präklinische Studie zeigte im SHT-Modell in der Maus eine verminderte Expression von Claudin 5 (ein tight junction assoziiertes Protein) nach SHT (59). Durch das Zusammenbrechen dieser physischen Barriere kommt es zur Infiltration von peripheren Immunzellen wie Neutrophilen in das Gehirnparenchym und dadurch zu einer Aggravation der Inflammationsprozesse, welche wiederum die BHS bis zu 12 Monate nach SHT beeinträchtigen können (57, 63). Zudem kommt es vermehrt zu einem transzellulären Transport von größeren Molekülen, wie Albumin, welche normalerweise die BHS nicht passieren können. Dies hat einen erhöhten Nachstrom von Wasser ins Hirngewebe zur Folge und resultiert in einem Hirnödem mit möglicherweise erhöhtem intrakraniell Druck (56, 63). Als Marker für das Zusammenbrechen der BHS gelten Fibrinogen und Immunglobulin G (IgG). Diese konnten bei Patienten, die in der akuten Phasen nach SHT verstarben, sowie auch bei Patienten, die mindestens ein Jahr nach SHT überlebten, nachgewiesen werden (63, 64). Neben den oben genannten Substanzen können zudem auch schädliche Substanzen wie Hämoglobin durch die zerstörte BHS ins Gehirnparenchym eindringen und den oxidativen Stress und die Neuroinflammation verstärken (50, 65).

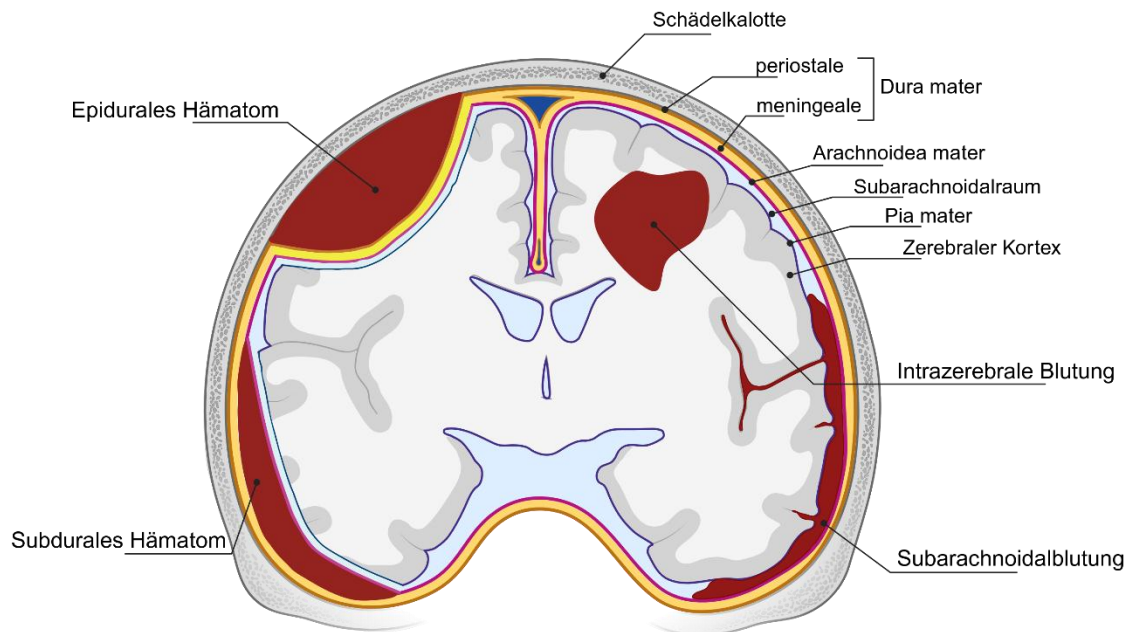
Durch die Störung der Permeabilität der BHS kommt es konsekutiv zu Hirnödemen nach SHT. Hirnödeme lassen sich in zwei Subtypen unterteilen: vasogen und zytotoxisch. Ein vasogenes Hirnödem entsteht, wenn Wasser sich im perivaskulären Raum ansammelt, nachdem die BHS beschädigt wurde. Dies führt zu Veränderungen im zerebralen Blutfluss und einem Anstieg des intrakraniellen Drucks. Ein zytotoxisches Hirnödem hingegen wird durch das Eindringen von Wasser in den intrazellulären Raum verursacht, was durch die Aktivierung von Ionenkanälen herbeigeführt wird (63). Beide Formen des Hirnödems haben eine Beeinträchtigung des zerebralen Blutflusses und der Oxygenierung zur Folge und können im schlimmsten Fall lebensbedrohlich werden, wenn sie eine Kompression und Einklemmung des Gehirns auslösen (55).

Die neuroinflammatorischen Prozesse sowie die Aktivierung der Gerinnung führen nach SHT zu mikrozirkulatorischen Störungen, die eine Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff bewirken kann. Aufgrund der Ödembildung ist die Sauerstoffdiffusion ins Gewebe erschwert und inflammatorische Prozesse beeinträchtigen die Endothelfunktion. Der Sauerstoffmangel wiederum mündet in neuronalem Untergang, wodurch die neuroinflammatorische Kaskade verstärkt wird (55).

Aufgrund der Tatsache, dass bei einem SHT nur der sekundäre Hirnschaden therapeutisch beeinflusst werden kann, ist es von besonderer Bedeutung die zu Grunde liegenden Pathomechanismen im Detail zu verstehen, um Therapiestrategien entwickeln zu können, die eine Eindämmung des sekundären Hirnschadens ermöglichen.

#### 2.1.4 Blutungskomplikationen nach SHT

Der Hauptgrund für Mortalität oder Verschlechterung des Patientenzustandes nach SHT ist eine intrakranielle Blutung. Die intrakranielle Blutung als Folge eines traumatischen Ereignisses geht auf eine Ruptur der intrakraniellen Gefäße zurück (66). Intrakranielle Blutungen treten häufig nach SHT auf. Die Inzidenz reicht von 15,3 % bis zu 44 % in unterschiedlichen Patientengruppen (67, 68). Junge, männliche Patienten weisen ein erhöhtes Risiko für intrakranielle Blutung auf, ebenso wie Patienten nach Verkehrsunfällen (67, 68). Patienten unter bestehender Antikoagulation zeigten in einer Analyse ein leicht erhöhtes Risiko für intrakranielle Blutung mit einer breiten Inzidenz von 3,6 % bis 29,4 %, jedoch ohne Unterschied im Mortalitätsrisiko (69). Weitere Risikofaktoren für intrakranielle Blutungen sind Alter, Dauer der Bewusstlosigkeit, Verletzungsmuster und neurologische Defizite (70). Die Entstehung von intrakraniellen Blutungen kann auch noch 24-48 Stunden (h) nach SHT stattfinden. Eine Vergrößerung einer bereits bei initialer Computertomographie diagnostizierter intrakranieller Blutung findet vor allem in den ersten 24 h nach SHT statt (71). Patienten, die eine große intrakranielle Blutung aufweisen, haben ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Patienten ohne bzw. mit nur gering ausgeprägter intrakranieller Blutung (72). Im Nachfolgenden werden die unterschiedlichen Subtypen der intrakraniellen Blutung beschrieben, welche auch simultan auftreten können (73).



**Abbildung 2: Übersicht intrakranielle Blutungen**

Created with BioRender.com.

#### 2.1.4.1.1 Epidurales Hämatom (EDH)

Das EDH macht ca. 30 % aller intrakraniellen Blutungen aus (74, 75). Das EDH ist meistens mit einem SHT assoziiert und wird verursacht durch eine Ruptur der A. meningea media oder durch eine Ruptur der Diploevenen. In 85-95 % der Fälle liegt eine Schädelfraktur zugrunde (76). Hieraus ergibt sich die Lokalisation des EDH zwischen Dura mater und innerem Schädelknochen (s. Abbildung 2) (46, 76, 77). In 20-30 % weisen die Patienten direkt nach Trauma einen Bewusstseinsverlust auf, gefolgt von einem Intervall mit unauffälligem Bewusstsein, wiederum gefolgt von einem Intervall mit neurologischer Verschlechterung (76, 77, 78). Das EDH macht ca. 8,2 % aller Blutungen nach traumatischen Kopfverletzungen aus (79). Dabei ist das EDH mit einem günstigen Outcome behaftet und weist eine Mortalität von < 10 % bei optimaler Therapie auf (77, 79, 80). Abhängig von intrakraniellm Druck, Mittellinienverlagerung und Hämatomvolumen stellt die sofortige Therapie eine operative Versorgung mit Entlastung des Hämatoms dar. Bei gering ausgeprägten Befunden kann vorerst ein konservatives Prozedere mit kontinuierlichem Monitoring verfolgt werden (75, 76).

#### 2.1.4.1.2 Subdurales Hämatom (SDH)

Das SDH befindet sich anatomisch im Subduralraum zwischen Dura mater und Arachnoidea mater (s. Abbildung 2) (81). Die Blutung erfolgt aus den Brückenvenen, welche vom Gehirn zum Schädelknochen verlaufen (76). Die Inzidenz des SDH variiert zwischen 5-25 % bei ausgeprägtem SHT, die Gesamtinzidenz aller Patienten mit SHT wird mit 11 % angegeben (76, 82, 83). Männer sind häufiger betroffen als Frauen und die Inzidenz steigt mit dem Alter (76, 84). Das traumatische SDH kann sich noch Wochen und Monaten nach SHT erneut vergrößern bzw. es kann eine Rezidivblutung auftreten (82, 85). SDHs werden in drei Kategorien unterteilt: Das akute SDH entsteht direkt als Folge eines schweren SHT innerhalb von drei Tagen nach Trauma (81, 84), das subakute SDH innerhalb von 4-20 Tagen nach Traumaereignis und das chronische SDH nach mehr als 20 Tagen nach initialer Blutung (84). Das chronische SDH kann sich hierbei auch erst innerhalb von sechs Monaten nach stattgehabtem Trauma entwickeln, ist nicht zwangsläufig traumatischen Ursprungs und kann sich ebenso aus einem akuten SDH entwickeln (86). Asymptomatische und milde Verläufe können konservativ behandelt werden, bei moderaten bis schweren Verläufen bzw. bei klinischer Verschlechterung erfolgt auch hier eine chirurgische Intervention im Sinne einer Entlastung und Hämatomausräumung (84).

#### 2.1.4.1.3 Subarachnoidalblutung (SAB)

Die SAB ist definiert als Blutung in den Subarachnoidalraum (s. Abbildung 2). Die Einblutung erfolgt hier in den liquorgefüllten Raum zwischen Arachnoidea mater und Pia mater (87). Sie kann in zwei Kategorien unterteilt werden: traumatisch und nicht-traumatisch sowie aneurysmatisch und nicht-aneurysmatisch. Die aneurysmatische Blutung entsteht spontan aufgrund Ruptur eines vorbestehenden Aneurysmas, die nicht-aneurysmatische Blutung häufig nach Trauma aufgrund von Verletzung kortikaler Gefäße (76). Das SHT stellt die häufigste Ursache für die traumatische SAB dar (88). Die Inzidenz der traumatischen SAB wird mit 11-40 % angegeben (89, 90, 91). Die traumatische SAB ist assoziiert mit einem schlechten Outcome (89). Eine typische Symptomatik der SAB ist der von den Patienten als „schlimmster Kopfschmerz in meinen Leben“ bezeichnete Kopfschmerz. Diesen geben ca. 80 % der Patienten an (92). Die Therapie besteht je nach Lokalisation der Blutung und Klinik aus chirurgischem Clipping oder endovaskulärem Coiling (93). Bei konservativer Therapie

erfolgen ein engmaschiges Monitoring sowie ggf. eine invasive Überwachung des intrakraniellen Drucks (76).

#### 2.1.4.1.4 Intrazerebrale Blutung (ICB)

Die ICB stellt eine Blutung direkt ins Hirngewebe dar (s. Abbildung 2). Mögliche Ursachen sind Trauma, Ruptur eines Aneurysmas, Angiopathien oder arteriovenöse Malformationen (76). Die spontane ICB macht in etwa 10-15 % aller Schlaganfälle aus (94) und weist eine sehr hohe Mortalitätsrate von 40-50 % auf (95, 96). Die traumatische ICB tritt in ca. 22 % der Fälle auf (73). In ca. 40 % zeigt die ICB eine Größenprogredienz innerhalb der ersten Tage nach Trauma. Diese Verschlechterung ist assoziiert mit einem Auftreten von SABs und SDHs (73). Die Lokalisation der ICB ist hauptsächlich in den frontalen und temporalen Hirnregionen (73). Kleinere Blutungen können durch konservatives Prozedere therapiert werden, bei größeren bzw. fortschreitenden Blutungen mit erhöhtem Hirndruck ist eine chirurgische Intervention zur Druckentlastung notwendig (73).

## 2.2 Das Gerinnungssystem

### 2.2.1 Physiologie der Blutgerinnung

Die primäre Funktion der Hämostase besteht darin, einen angemessenen Blutfluss sicherzustellen, ohne dass es zu einer übermäßigen Gerinnung kommt, und gleichzeitig übermäßigen Blutverlust nach Verletzungen zu verhindern. Eine funktionierende Hämostase wird hierbei durch ein komplexes Gleichgewicht aus pro- und antikoagulatorischen Faktoren erreicht (97). Die Bildung von Thromben muss bezüglich Lokalisation und Dauer exakt reguliert werden, um thrombotische Komplikationen zu vermeiden (98). Unter physiologischen Bedingungen wird das Endothel von einer antikoagulatorischen Oberflächenschicht überzogen. Im Falle eines Endothelschadens wird die darunterliegende subendotheliale Matrix freigelegt und infolgedessen die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt (99). Die ablaufenden Prozesse der Blutgerinnung können in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilt werden (97).

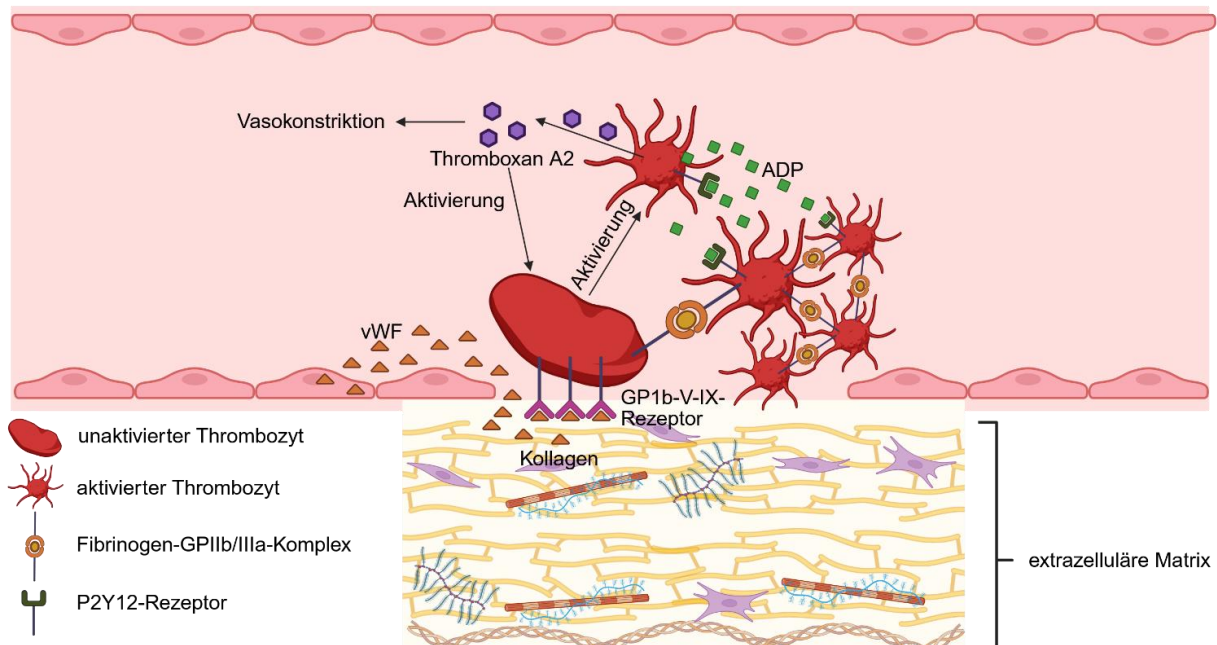
#### 2.2.1.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase und die „Startphase“ der Blutgerinnung wird als sofortige Reaktion auf einen Endothelschaden eingeleitet. Ziel ist die Minimierung des Blutverlustes durch eine rasche Formation eines initialen Thrombus durch Aggregation von Thrombozyten (100). Die komplexe Interaktion zwischen Thrombozyten, dem Gefäßendothel und adhäsiven Proteinen spielt hierbei die Hauptrolle (97, 101, 102). Die Beschädigung des Gefäßendothels löst einen reflexartigen Vasospasmus aus und verursacht die Freilegung der subendothelialen Gewebematrix. Diese ist hoch thrombogen und enthält Kollagen, Von-Willebrand-Faktor (vWF), Thrombospondin und weitere an der Thrombozytenaggregation beteiligte Proteine (102, 103). vWF ist zusätzlich löslich im Plasma vorhanden (99).

Infolgedessen binden Thrombozyten über ihre Glykoproteinrezeptoren GP1b-V-IX und GPVI über vWF an das Kollagen des Subendothels (97, 100, 103). Zelladhäsionsmoleküle wie vWF und Thrombospondin verstärken die Vernetzung zwischen Thrombozyten und subendotheliale Kollagen (103). vWF sorgt maßgeblich über die Untereinheit GP1b des GP1b-V-IX-Rezeptors für die Thrombozyteninteraktion (103).

Dies ist der wichtigste Schritt für die Thrombozytenaktivierung. Nach Aktivierung sezernieren die Thrombozyten verschiedene Botenstoffe wie Thromboxan A<sub>2</sub>, Thrombin, Kalzium, Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin, welche über ihre korrespondierende Rezeptoren auf den Thrombozyten weitere Thrombozyten aktivieren (100). ADP bindet beispielsweise an den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor, wodurch die Thrombozytenaktivierung und die Ausbildung eines stabilen Thrombus gefördert werden (104, 105). Kalzium bindet an Phospholipide, welche durch die Thrombozytenaktivierung auf der Zellmembran exponiert werden und formen eine Oberfläche, an welcher sich weitere Gerinnungsfaktoren anlagern können (102).

Für die Thrombozytenaggregation spielt außerdem die Aktivierung der Glykoproteinrezeptoren IIb und IIIa eine wichtige Rolle (103). Durch Bindung von ADP durchlaufen sie eine Konformationsänderung, welche die Anlagerung von Fibrinmolekülen und damit die Vernetzung der Thrombozyten zu einem ersten Thrombus ermöglicht (100, 102). Der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor bewirkt zusätzlich über das Zytoskelett der Thrombozyten eine Kontraktion des Thrombus (103). Darüber hinaus führt die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Änderung ihrer Form hin zu einer sphärischen Variante, welche die Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion verstärkt, aber auch die Aggregation sowie Sezernierung von Botenstoffe fördert (103). Zusätzlich konvertieren die Thrombozyten ihre Phospholipidmembran in einen negativ geladenen Zustand, um die Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase zu unterstützen (97). Hierdurch bieten sie die perfekte Oberfläche für den Ablauf der sekundären Gerinnungskaskade (102).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der primären Hämostase**

Durch eine Gefäßverletzung kommt es zur Freilegung des subendothelialen Kollagens. Von den Endothelzellen sezernierter Von-Willebrand-Faktor (vWF) ermöglicht die Thrombozytenadhäsion über den GP1b-V-IX-Rezeptor an das Kollagen. Es kommt zur Aktivierung weiterer Thrombozyten, die Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 freisetzen. ADP fördert die weitere Thrombozytenaktivierung. Schlussendlich erfolgt die Aggregation der Thrombozyten über den Fibrinogen-GPIIb/IIIa-Komplex und es kommt zur Ausbildung des initialen Thrombus. Graphik modifiziert nach Amboss „Primäre Hämostase – Teil 2 - Physiologie und Medikamente – Amboss Auditor“ [Youtube] (106). Created with BioRender.com.

### 2.2.1.2 Sekundäre Hämostase

Die Hauptfunktion der sekundären Hämostase ist, im Anschluss an die primäre Hämostase einen stabilen Thrombus auszubilden. Dies geschieht durch die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Dieser Schritt steht am Ende einer Reihe von enzymatischen Reaktionen (100, 107). Die plasmatische Gerinnungskaskade wird in ein extrinsisches und intrinsisches System unterteilt und läuft parallel zur Thrombozytenaggregation ab (99). Die beiden Systeme münden in eine gemeinsame Endstrecke, die aus der Aktivierung von Thrombin besteht. Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen zu Fibrin und die Fibrinmoleküle bilden ein Netz an der Schadenstelle (99). Die Mehrheit der Gerinnungsfaktoren liegt als inaktive Form im Plasma vor (102).

Der extrinsische Weg wird aktiviert durch den aus zerstörtem Endothel freigesetzten Tissue factor (TF). Dieser bindet an Faktor VII und aktiviert (a) diesen. Der Komplex von TF, Faktor VIIa, Phospholipiden und Kalzium aktiviert Faktor X und Faktor IX. Faktor Xa führt folglich gemeinsam mit seinem Kofaktor Va und Kalzium zur Bildung

des Prothrombinasekomplexes auf der Thrombozytenoberfläche, infolgedessen entsteht aus Prothrombin (Faktor II) Thrombin (Faktor IIa) (99, 100, 102).

Startpunkt des intrinsischen Weges ist Faktor XII. Er kommt in Kontakt mit Oberflächenstrukturen und wird hierdurch *in vitro* aktiviert. *In vivo* findet dieser Aktivierungsschritt nicht statt. Faktor XII ist hiermit für die Gerinnungskaskade *in vivo* nicht relevant. *In vivo* aktiviert Thrombin Faktor XI, hierauf folgt eine Kaskade in der Faktor XIa Faktor IX aktiviert. Als Komplex bestehend aus Faktor IXa und seinem Kofaktor VIIIa wird Faktor X aktiviert. Danach endet der intrinsische Weg gemeinsam mit dem extrinsischen Weg in der gemeinsamen Endstrecke. Gemeinsam mit Phospholipiden, Kalzium und seinem Kofaktor Va bewirkt Faktor Xa einen Anstieg an Prothrombinasekomplexen und schlussendlich eine Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin (100, 102). Hierdurch entstehen in kürzester Zeit hohe Mengen an Thrombin, welche die Umwandlung von Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin (Faktor Ia) umsetzen. Die Fibrinmonomere bilden gemeinsam ein instabiles Fibrinpolymer, welches durch Faktor XIIIa (aktiviert durch Thrombin) quervernetzt und stabilisiert wird (100, 102).

Thrombin stellt die zentrale Serinprotease in der Gerinnungskaskade dar und moderiert mehrere kritische Reaktionen. Es führt zu Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, aktiviert Thrombozyten über die Spaltung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) 1 und 4 und aktiviert im Sinne eines positiven Feedback-Loops Faktor XI (99).

### 2.2.1.3 Antikoagulatorisches System

Um eine überschießende Thrombenbildung im gesamten Gefäßsystem zu vermeiden, enthält das Gerinnungssystem mehrere Sicherheitsmechanismen.

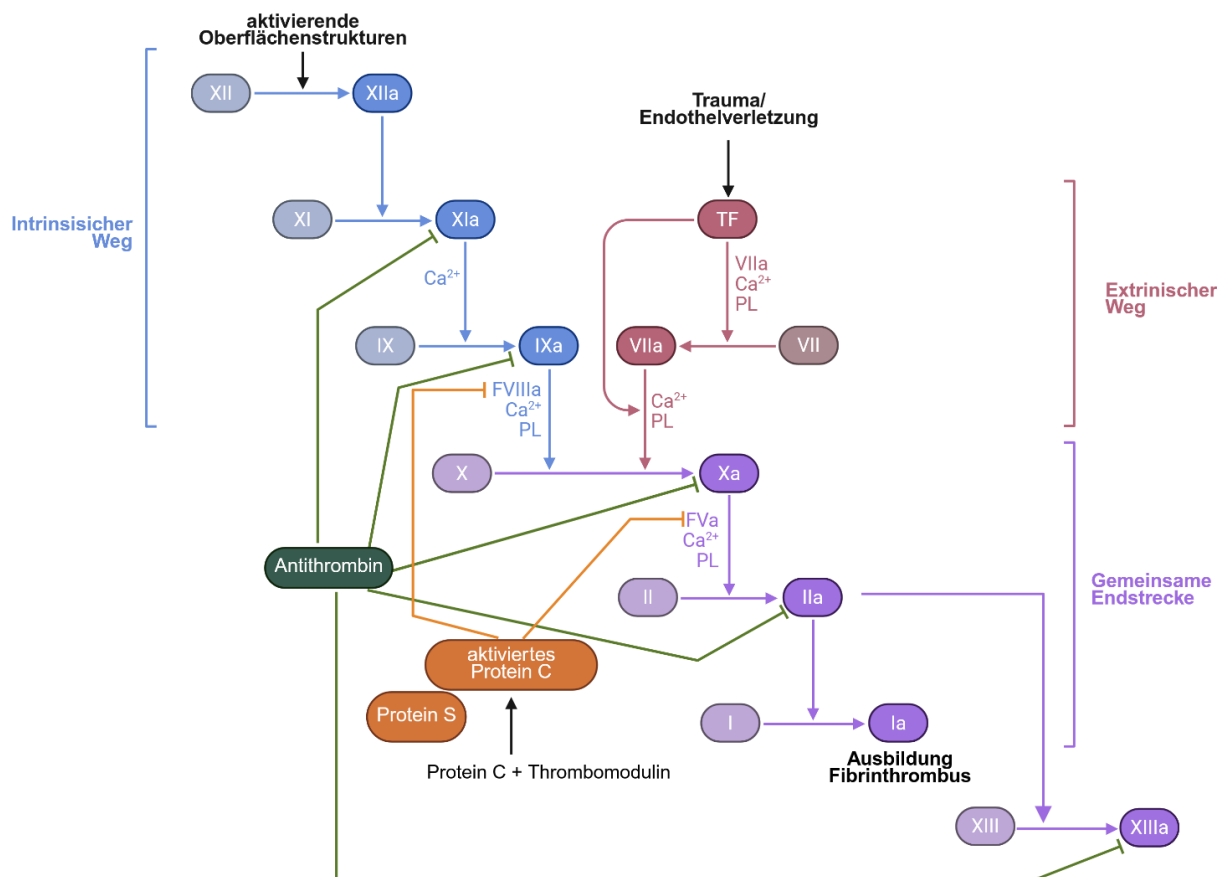
Die plasmatische Gerinnungskaskade wird initial durch TF in Gang gesetzt. Durch den Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor wird verhindert, dass TF am intakten Gefäßendothel aktiviert wird und die ablaufende Gerinnungskaskade lediglich auf das verletzte Endothel begrenzt bleibt (100).

Des Weiteren wird die Thrombinbildung durch das Protein C-System limitiert. Thrombin bindet an der intakten Gefäßendothelzelle an Thrombomodulin und aktiviert hierdurch Protein C. Das aktivierte Protein C spaltet als Komplex mit seinem Kofaktor Protein S sowohl Faktor Va als auch Faktor VIIIa, als Folge wird die Thrombinbildung

verlangsamt. Umso mehr Thrombin produziert wird, umso mehr Protein-C wird aktiviert (100, 102).

Eine wichtige Rolle im Rahmen der Kontrolle der Thrombinbildung spielt die Serinprotease Antithrombin. Antithrombin ist der Hauptinhibitor von Thrombin und inaktiviert ebenso die Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIIa (100, 102). Antithrombin wird durch die Bindung von Heparinsulfat auf der Endothelzelloberfläche aktiviert (102).

In physiologischer Umgebung herrscht ein funktionierendes Gleichgewicht zwischen prokoagulatorischem und antikoagulatorischem System. Hierdurch wird gewährleistet, dass im Rahmen einer Verletzung eine suffiziente Blutgerinnung abläuft ohne Gefahr einer Thrombose des Gefäßes (100).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase**  
 PL = Phospholipid, Created with BioRender.com.

#### 2.2.1.4 Fibrinolyse

Die Aufgabe der Fibrinolyse ist es während des Heilungsprozesses den Thrombus abzubauen und die Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses im Gefäß zu gewährleisten. Eine übermäßige Thrombenbildung mit Gefäßverschluss soll vermieden werden (99, 100). Das Fibrinpolymer wird durch Plasmin gespalten. Die Vorstufe von Plasmin ist Plasminogen und ist im Blutplasma vorhanden. Für die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin wird entweder Gewebstreptase (t-PA) oder Urokinase (u-PA) benötigt. u-PA ist vor allem in der extravasalen Fibrinolyse relevant, während t-PA für die intravasale Fibrinolyse benötigt wird. Die Sekretion von t-PA erfolgt durch das Gefäßendothel. Wie bei der Gerinnungskaskade gibt es auch hier einen Sicherheitsmechanismus, um eine übermäßige und generalisierte Thrombusauflösung zu verhindern: Plasmin wird durch  $\alpha$ -2-Antiplasmin und t-PA sowie u-PA durch den Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 und Typ 2 (PAI-1/-2) inhibiert (99, 100).

#### 2.2.2 Hämostase nach SHT

Das SHT beeinflusst die Hämostase nachhaltig und hat eine Koagulopathie sowohl mit Thromboseneigung als auch Blutungsneigung zur Folge. Initial nach SHT besteht eine hypokoagulatorische Phase, gefolgt von einer hyperkoagulatorischen Phase. Diese Dysbalance kann den primären Hirnschaden verstärken und das klinische Outcome verschlechtern. Die Pathophysiologie der SHT-induzierten-Koagulopathie ist ein komplexes Zusammenspiel aus Gerinnung, Entzündung und dem Gefäßendothel und soll im Folgenden genauer beleuchtet werden (14, 15, 108).

Während der initialen hypokoagulatorischen Phase kommt es zu einer Dysfunktion der Gerinnungskaskade. Die Ausbildung von Thromben ist eingeschränkt, eine vermehrte Blutungsneigung und eine Verschlimmerung der initialen Läsion sind mögliche Folgen (14, 15, 108). Die Dysfunktion der Gerinnungskaskade tritt vorrangig in den ersten Stunden nach SHT auf. Ihre Ursache liegt am ehesten in der erhöhten Thrombinproduktion nach SHT und in einer dysregulierten Freisetzung von TF, vWF und weiteren Mikropartikeln aus dem Hirngewebe begründet (15, 108, 109). Durch die vermehrte Freisetzung von TF aus beschädigtem Hirngewebe kommt es zur systemischen Aktivierung der Gerinnung und zu einem gesteigerten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren (110). D-Dimer, ein Spaltprodukt von Fibrin, zeigt einen Peak 6 h

nach SHT, hinweisend auf eine erhöhte Fibrinolyse (15). Als Ursache hierfür kommt eine vermehrte Freisetzung von t-PA und/oder u-PA in Frage (109). Studien ergaben, dass ein früher Einsatz von Tranexamsäure, welche die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin hemmt, das Outcome nach SHT verbessern kann (110, 111). In aktuellen klinischen Studien konnte dies für das isolierte SHT nicht pauschal bestätigt werden und ein klinischer Nutzen vor allem in Hinblick auf die Mortalität ist nicht sicher belegt (111, 112, 113, 114, 115).

Zusätzlich lässt sich in der akuten Phase, ca. 1-5 Tage nach SHT, ein Thrombozytenabfall durch den Verbrauch in Fibrin-Thrombozyten-Clots sowie Einschränkungen der Thrombozytenfunktion feststellen (15). Aufgrund zuvor genannter Mechanismen kommt es hauptsächlich in den ersten Stunden nach SHT mit initialer Hämorrhagie zu Folgeblutungen (15).

Der genaue Zeitpunkt des Wechsels von der initialen hypokoaguablen Phase zur subakuten hyperkoaguablen Phase ist schwer zu definieren. Die Hämostasestörung nach SHT ist gekennzeichnet durch eine biphasische Dynamik mit überlappenden Intervallen von Blutungs- und Thromboseneigung (14, 109, 116, 117, 118). Die zweite, hyperkoaguable Phase präsentiert eine prothrombotische Phase, verursacht durch einen Shutdown der Fibrinolyse, gefolgt von einer Hyperaktivität der Thrombozyten. Es kommt zur Ausbildung von kapillären Mikrothromben und folglich zu einem erhöhten Risiko für thromboembolische Komplikationen wie beispielsweise eines Schlaganfalles (14, 15, 108).

Grundsätzlich ist das Gleichgewicht der Hämostase nach SHT sehr fragil. Eine prospektive Studie zeigte zum einen, dass das SHT mit systemischer Hyperfibrinolyse assoziiert ist, jedoch auch mit erhöhter Thromboseneigung (14). Die Freisetzung von zahlreichen prokoagulatorischen Faktoren aus dem Gehirngewebe kann initial zu einem hyperkoagulatorischen Zustand führen, im Verlauf jedoch durch den systemischen Verbrauch der Gerinnungsfaktoren in einen hypokoagulatorischen Zustand übergehen (14, 108). Eine Koagulopathie entsteht primär bei schwerem oder penetrierendem SHT. Maegele et al. stellten die Hypothese auf, dass die Koagulopathie allein nicht zu einer parenchymatösen Blutung führt, sondern dass eine mikro- oder makrovaskuläre Verletzung zu Grunde liegen muss (110). Bei SHT ist eine ausbalancierte Hämostase von besonderer Wichtigkeit, da eine exzessive Blutung aufgrund der starren Schädelkalotte die Gefahr einer zerebralen Hypertension birgt

(108). Eine Dysbalance der Gerinnung kann noch bis zu 72 h nach SHT auftreten (110). Des Weiteren sind Inflammationsreaktion und Koagulopathie nach SHT eng miteinander verknüpft (108).

Das Zusammenspiel zwischen Inflammation und Hämostase nach SHT ist sehr komplex und dynamisch und zählt zu den zentralen Mechanismen des sekundären Hirnschadens. Ein detailliertes Verständnis über die Interaktion zwischen Inflammation und Hämostase ist zum aktuellen Zeitpunkt noch ausstehend, wenngleich essenziell, um neue und zielgerichtete Therapiestrategien zu etablieren.

Das Komplementsystem des angeborenen Immunsystems wird ebenso nach SHT aktiviert. Über diverse Faktoren und Mechanismen hat es Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten, des vWF und des TF (119). Im Gegensatz dazu kann das Komplementsystem auch inhibierend auf den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade einwirken. Jedoch sind Studien, die die genaue Beeinflussung des Komplementsystems auf die Gerinnung nach SHT untersuchen, noch offenstehend (119).

Nach der Schädigung von Gehirngewebe kommt es zur Einwanderung von Leukozyten ins Hirngewebe. Stoll et al. demonstrierten, dass nach einem zerebralen, ischämischen Ereignis die Migration von T-Zellen ins Hirngewebe von der direkten Interaktion mit Thrombozyten abhängt (120). Im Mausmodell wurde belegt, dass die Aktivierung von Thrombozyten mit einer proinflammatorischen Antwort (nachgewiesen durch eine Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen) einhergeht (121). Ebenso gibt eine weitere Mausmodellstudie mit moderatem SHT-Modell Hinweise drauf, dass die antifibrinolytische Substanz Tranexamsäure auch einen antiinflammatorischen Effekt nach SHT haben könnte (122).

Durch den Verlust der BHS nach SHT können im Blut enthaltene Proteine, wie Fibrin, ins Hirngewebe gelangen. Durch Immunhistochemie im menschlichen aber auch im murinen Gehirn waren Fibrinablagerungen assoziiert mit einem aktivierten angeborenen Immunsystem. Ferner wurde durch Ausschaltung der Fibrin-CD11b-Interaktion die Rekrutierung von Monozyten und die Aktivierung von inflammatorischen und reaktiven Sauerstoffspezies Gen-Pathways in Mikroglia und Makrophagen reduziert (123).

Einer der Schlüsselfaktoren der Hämostase nach SHT, TF, wird neben der Freisetzung aus dem subendothelialen Gewebe, ebenso durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Interleukine in Endothel und Blutzellen vermehrt exprimiert (124). Darüber hinaus aktiviert der TF-VIIa-Komplex über PARs die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (124).

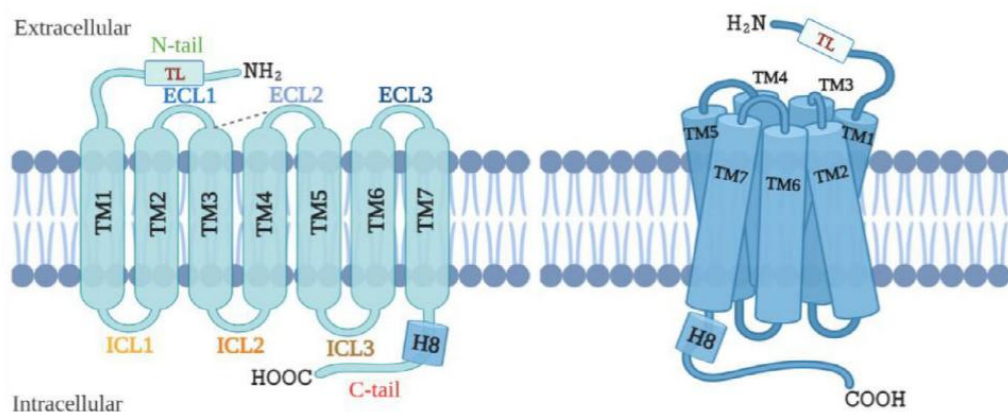
Wie TF, stellt auch Thrombin eine direkte und vielfältige Verknüpfungsstelle zwischen Hämostase und Inflammation dar. Einige Beispiele sollen hierfür im Folgenden aufgeführt werden. Prothrombin kann durch neuronale Zellen synthetisiert und im Anschluss in Thrombin umgewandelt werden. Thrombin führt zu einer direkten Aktivierung von Interleukin-1 $\alpha$ , einem zentralen Entzündungsmediator. Über PARs, die z.B. von Mikroglia exprimiert werden, ermöglicht Thrombin die Freisetzung von Interleukinen, TNF- $\alpha$  oder Cyclooxygenase-2 und fördert demzufolge die Neuroinflammation. Hohe Dosen an Thrombin können über den PAR1-Subtyp Apoptose von Neuronen und Astrozyten bewirken (125).

Es ist offensichtlich, dass das SHT einen großen Einfluss auf die Hämostase hat. Die exakten zu Grunde liegenden Mechanismen bleiben weiterhin nur unvollständig verstanden und benötigen weiterer Forschung. Hierbei sollte der Fokus auf dem Zusammenspiel zwischen Gerinnung, Inflammation und sekundärem Hirnschaden liegen auch hinsichtlich möglicher Therapieansätze.

## 2.3 PAR4

### 2.3.1 Grundlagen

Die PARs bilden eine vierköpfige Untergruppe der Rhodopsin-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, encodiert durch die Gene F2R, F2RL1, F2RL2 und F2RL3. Sie teilen die Hauptcharakteristika der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit einer sieben-transmembran-Domäne, drei extrazellulären Loops und drei intrazellulären Loops, einer extrazellulären NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne sowie einer intrazellulären COOH-terminalen Domäne. Ihre Aktivierung erfolgt über proteolytische Enzyme (126, 127, 128, 129, 130, 131). PAR1 wurde im Jahre 1991 als erster Subtyp während des Versuchs herauszufinden, wie Thrombin Thrombozyten und andere Zellen aktivieren kann, entdeckt (126, 132). Danach folgte die Entdeckung der anderen PARs, der aus 300 Aminosäuren bestehende PAR4 wurde schließlich im Jahre 1998 entdeckt (130, 133). Die erste PAR4-knockout-Maus (PAR4<sup>-/-</sup>) entstand im Jahr 2001 (134).



**Abbildung 5: Aufbau und Struktur der Protease-aktivierten Rezeptoren modifiziert nach Chandrabalan et al. (135)**

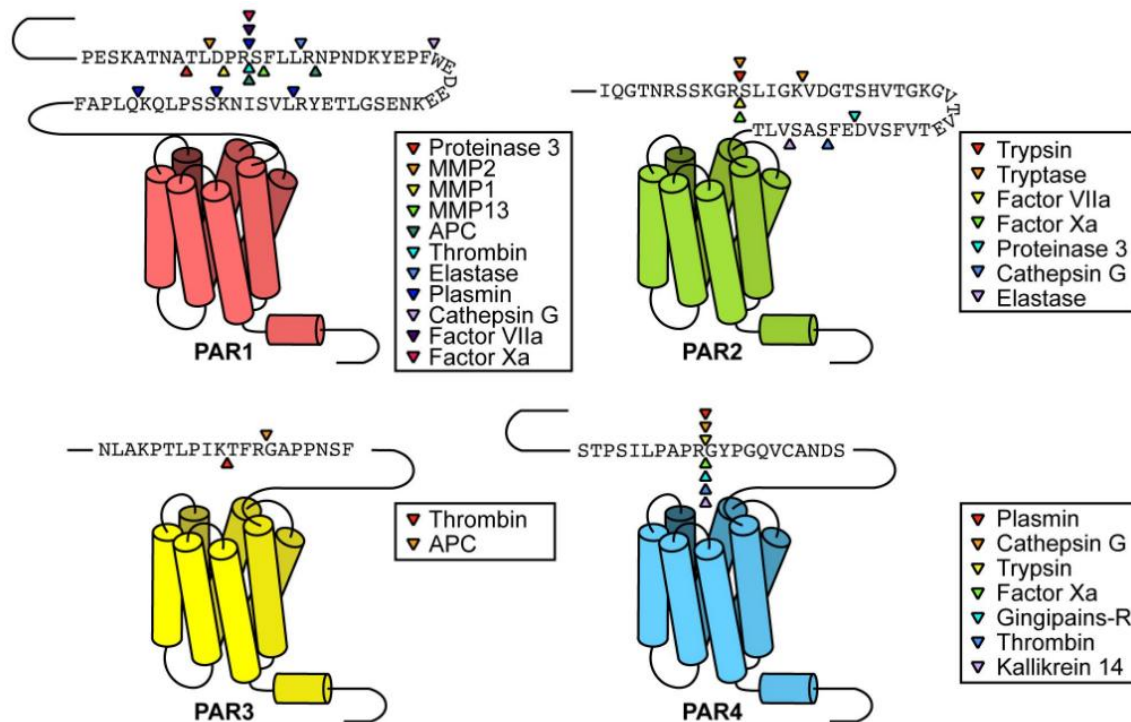
TL = „tethered ligand“ (angebundener Ligand), ECL = extrazelluläre Schleife, ICL = intrazelluläre Schleife, TM = Transmembrandomäne.

PARs werden im Menschen in verschiedensten Organsystemen exprimiert, wie z.B. im ZNS, dem kardiovaskulären und respiratorischem System, dem Gastrointestinaltrakt oder in Muskeln (135, 136, 137). Speziell im Gehirn konnte mittlerweile bestätigt werden, dass PAR4 in kortikalen Neuronen im Mausgehirn exprimiert wird. In Immunoblots konnte PAR4 ebenfalls in den somatosensorischen und motorischen Kortexregionen identifiziert werden. Nur geringe Mengen wurden in Lysaten des Hippocampus, der Basalganglien und des Kleinhirns festgestellt (138). Es bestehen jedoch wichtige Unterschiede zwischen den Spezies hinsichtlich der Expression der PARs. Auf humanen Thrombozyten werden beispielsweise PAR1 und

PAR4 exprimiert (17, 130), wohingegen auf murinen Thrombozyten PAR3 und PAR4 exprimiert werden (133, 139, 140).

Alle vier PAR haben die gleiche, einzigartige Funktionsweise: Im ersten Schritt binden entsprechende Proteasen wie Thrombin und Trypsin an das extrazelluläre N-terminale Ende des PAR. Hier befindet sich eine spezifische Protease-Schnittstelle. Durch die Spaltung des N-terminalen Endes durch die Proteasen entsteht ein neues N-terminales Peptid, welches als „tethered ligand“ (angebundener Ligand) agiert. Dies bedeutet, dass er wie als „eingebauter“ Agonist wirkt und durch intramolekulare Bindung an den zweiten extrazellulären Loop den gespaltenen PAR aktiviert. Infolgedessen wird der PAR „irreversibel“ aktiviert, es kommt zu Konformationsänderungen und über Aktivierung der G-Proteine kommt es intrazellulär zur Inangsetzung verschiedener Signalkaskaden. Der Rezeptor bleibt nach Spaltung durch die Proteasen bis zu dessen Abbau dauerhaft aktiviert (16, 131, 141, 142).

Je nach Subtyp des PAR erfolgt die Aktivierung durch unterschiedliche Proteasen: Thrombin aktiviert sowohl PAR1 als auch PAR4, wobei PAR4 höhere Thrombinkonzentrationen für die Aktivierung benötigt als PAR1, da ihm die Domäne mit hoher Affinität zu Thrombin, wie sie bei PAR1 und PAR3 vorkommt, fehlt (127, 128, 129, 130, 132, 133, 143, 144, 145). Trypsin kann in niedrigen Konzentrationen PAR2 und PAR4 aktivieren (128, 130, 144, 145). PAR3 kann ebenso durch Thrombin aktiviert werden, fungiert jedoch vor allem als Kofaktor für PAR4 in der Maus und hat beim Menschen eine geringere Bedeutung (144, 145). Ergänzend können weitere Proteasen des Immun- und Gerinnungssystems die PARs aktivieren, einen Überblick hierüber gibt Abbildung 6.



**Abbildung 6: Übersicht über Proteasen, die Protease-aktivierte Rezeptoren spalten, mit korrespondierender Spaltungsstelle, modifiziert nach Han et al.(136, 146, 147)**

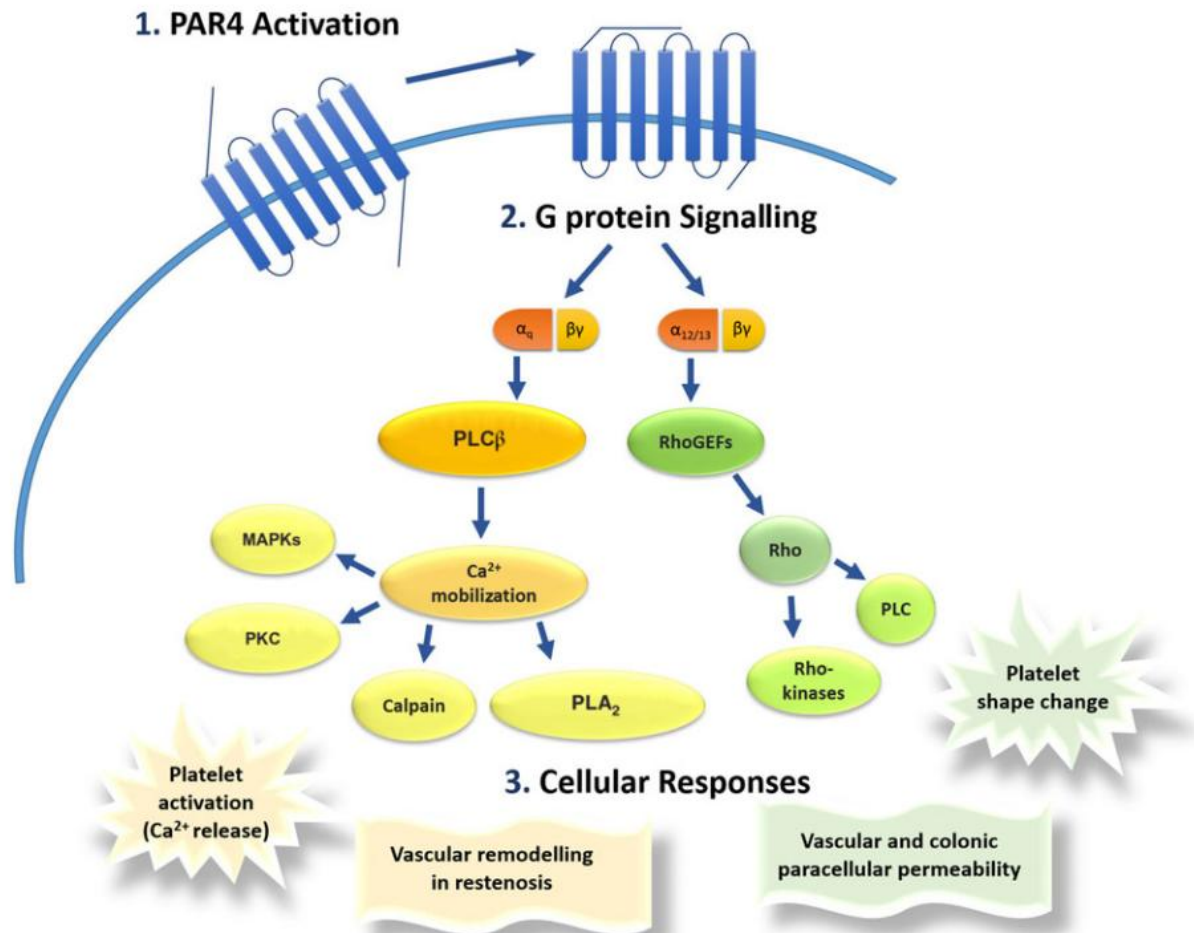
PAR = Protease-aktivierter Rezeptor.

### 2.3.2 Rolle des PAR4 in der Blutgerinnung

In der Hämostase kommt PAR4 eine wichtige Bedeutung bei der Aktivierung der Thrombozyten zu, indem er als Thrombinrezeptor bei hohen Thrombinkonzentrationen die Thrombozyten im Zusammenspiel mit PAR1 aktiviert und somit zur Stabilisierung des Thrombus beiträgt (133, 148). Die beiden Rezeptoren werden biphasisch aktiviert. PAR1 vermittelt eine schnelle und kurzzeitige Signalantwort, während PAR4 eine verzögerte, aber langanhaltendere Antwort hervorruft (149). Ursache hierfür ist, dass PAR1 im Vergleich zu PAR4 viel schneller in die Zelle internalisiert und abgebaut wird. Durch die langsamere Internalisierung von PAR4 bleibt dieser länger an der Zelloberfläche aktiv, gibt länger nach intrazellulär Signale weiter mit konsekutiver langanhaltenderen Signalantwort (150, 151).

Neben Thrombin können jedoch auch andere Gerinnungsfaktoren wie z.B. FXa eine Aktivierung des PAR4 hervorrufen, spielen aber eher eine untergeordnete Rolle (130, 132, 133, 134, 152). Die Aktivierung des PAR4 durch Thrombin führt vermittelt über den G12/13-Signalweg zur Rho-Aktivierung und folglich zu einer Zytoskelettantwort, wodurch die Thrombozyten ihre Form ändern und eine suffiziente und stabile Thrombusbildung ermöglichen (16, 132, 153, 154). Des Weiteren wird über die Gq-

PLC $\beta$ -Signalachse intrazelluläres Kalzium mobilisiert, wodurch Kalzium-regulierte Kinase aktiviert werden. Diese bewirken die Sekretion von Granula und die Aktivierung von Integrin, beides wichtige Faktoren für eine effektive Thrombozytenaggregation (16, 132, 155). In Zusammenarbeit mit dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor trägt PAR4 durch die ADP-Freisetzung und die Produktion von Thromboxan A<sub>2</sub> zusätzlich zur Thrombozytenaktivierung und -aggregation bei (132, 156).



**Abbildung 7:** Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von Protease-aktiviertem Rezeptor 4 (PAR4) modifiziert nach French et al. (132)

### 2.3.3 Rolle des PAR4 in der Hämostase nach SHT

Es liegen nur wenige Studien vor, die explizit die Rolle von PAR4 in der Hämostase nach SHT untersuchen. Nach SHT steigt die extravasale Thrombinkonzentration aufgrund von BHS-Störungen sowie Blutungsereignissen an (157). Eine verstärkt vorhandene Freisetzung von TF steigert die Thrombingeneration (158). Durch das vermehrt anfallende Thrombin kommt es zur Aktivierung von PAR4. Im Rahmen der Hämostase spielt hier überwiegend die Aktivierung des PAR4 auf den Thrombozyten eine Rolle. Ob die Aktivierung von PAR4 nach stattgehabtem SHT protektiv im Sinne einer suffizienten Thrombusbildung und folglich einer suffizienten Blutstillung ist oder ob eine „Überaktivierung“ von PAR4 zu einer vermehrten Thrombenbildung mit konsekutiven Gefäßverschlüssen und ggf. Ischämie führt, kann aufgrund der aktuellen Studienlage nicht beantwortet werden. Mehrere Studien außerhalb des SHT-Settings haben nachgewiesen, dass die Aktivierung von PAR4 durch Thrombin essenziell ist für die prokoagulatorische Funktion und Thrombusbildung (159, 160, 161). Durch Inhibition oder Knockout von PAR4 kam es zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung sowie zu einem verminderten Thrombuswachstum (160). Dies lässt vermuten, dass nach SHT PAR4 für eine suffiziente Hämostase notwendig ist und eine Defizienz an PAR4 vermutlich mit erhöhter Häufigkeit auftretenden Blutungsereignissen nach sich ziehen könnte.

Schlussendlich bedarf es weiterer Studien, um im Detail die Einflüsse von PAR4 und einer möglichen PAR4-Antagonisierung auf die Hämostase nach SHT in ihrer Gesamtheit untersuchen.

### 2.3.4 Rolle des PAR4 in der Neuroinflammation

Thrombin spielt neben seiner wichtigen Rolle in der Blutgerinnung ebenso eine wichtige Rolle in der Neuroinflammation (162). Nach SHT ist es dem zirkulierenden Thrombin aufgrund der Störung der BHS möglich das Gefäßsystem zu verlassen und im Hirngewebe proinflammatorische Prozesse durch die Aktivierung von PAR4 zu initiieren. PAR4 wird im ZNS auf diversen Zelltypen wie Mikroglia (163), Astrozyten und Neuronen (162, 164, 165) exprimiert. Eine Studie von Luo et al. demonstrierte, dass ein selektiver und reversibler PAR4-Antagonist (BMS-986120) nach SHT die Thrombin-induzierte Inflammationsreaktion von Astrozyten reduzierte. Es kam zu einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Mediatoren und dementsprechend

zu einer Reduktion des sekundären Hirnschadens. Als möglicher zu Grunde liegender Pathomechanismus dieses Prozesses vermuten die Forscher den Tab2/ERK/NF- $\kappa$ B-Signalweg (22). Zudem gibt es Hinweise, dass PAR4 auch über Mikroglia Einfluss auf die Neuroinflammation ausüben kann (163), jedoch sind weitere bestätigende sowie detailreichere Studien noch ausstehend, welche die exakten zellulären und molekularen Zusammenhänge offenlegen. Untersuchungen im murinen transienten Verschluss der mittleren Hirnarterie (tMCAO) bei PAR4-defizienten Mäusen ergaben ein reduziertes Infarktvolumen, verminderten neuronalen Zelluntergang und ein besseres motorisches Outcome der Mäuse. Zusätzlich wurde durch die PAR4-Defizienz die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten signifikant herabgesetzt und die Studie legt nahe, dass PAR4 zusätzlich eine Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen nach SHT spielen könnte (23). Fleischer et al. bestätigen die proinflammatorischen Auswirkungen von PAR4 im tMCAO-Modell, denn nach Gabe des selektiven PAR4-Antagonisten ML354 wiesen die Mäuse ein verkleinertes Infarktareal, geringere Makrophagenansammlungen sowie eine reduzierte Interleukin-1 $\beta$ -Expression auf. Durch Applikation eines Thrombozyten-depletierenden Antikörpers (AK) konnte nachgewiesen werden, dass dieser neuroprotektive Effekt thrombozytenunabhängig ist (138). Ferner wurde auch für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer demonstriert, dass die Expression von PARs erhöht ist (166). Speziell für PAR4 wurde nachgewiesen, dass die Expression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) des PAR4 Genes F2RL3 im menschlichen Gehirn bei Morbus Alzheimer erhöht war und retrospektiv mit einer schlechteren kognitiven Performance einherging. Ergänzend korrelierte die Expression von F2RL3 mit der Transkription von proinflammatorischen Makern (167). Weiterhin lieferte eine Studie zur Behandlung von Hirnblutungen bei Frühgeborenen Hinweise, dass eine frühzeitige Blockade von PAR4 sowohl die neuroinflammatorische als auch die degenerativen Kaskaden im Rattengehirn deutlich reduzierte und als Konsequenz den Rückgang der akuten Hirnschädigung beschleunigte (168).

### 2.3.5 PAR4 als potenzieller Therapieansatz in der Klinik

Atherothrombose und deren klinische Hauptmanifestationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit zählen zu den weltweit führenden Todesursachen (169). Patienten mit einer Historie an atherothrombotischen

Ereignisse sind durch ein erhöhtes Rezidivrisiko für ischämische Zwischenfälle gekennzeichnet und eine effektive und nebenwirkungsarme Sekundärprävention ist daher von immenser Bedeutung (170, 171). Da Thrombozyten und deren Aktivierung eine der Hauptrollen in der Entwicklung von Atherothrombose spielen, gehört die Thrombozytenaggregationshemmung zur wichtigsten Sekundärprophylaxe (170, 172, 173). Es finden bereits diverse Thrombozytenaggregationshemmer ihre klinische Anwendung, wie beispielsweise Aspirin, Clopidogrel oder Ticagrelor (174). Jedoch kann es trotz (dualer) Thrombozytenaggregationshemmung zu wiederkehrenden, ischämischen Ereignissen kommen. Darüber hinaus stellen Blutungsereignisse eine nicht zu vernachlässigende Nebenwirkung der thrombozytenaggregationshemmenden Therapie dar (175, 176). Daher rückten Thrombinrezeptorantagonisten als eine neue mögliche Medikamentenklasse in den Fokus der Forschung. Vorapaxar wurde als erster PAR1-Antagonist entwickelt und 2014 erstmals durch die Food and Drug Administration in den USA für den klinischen Einsatz als Sekundärprophylaxe bei arterieller Thrombose freigegeben (170, 177). Nichtsdestotrotz zeigte sich bei der Anwendung von Vorapaxar ein erhöhtes Risiko für intrazerebrale Blutungen, weshalb nur Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt oder chronischer koronarer Herzerkrankung ohne Schlaganfall oder transitorischer ischämischer Attacke in der Vorgeschichte für die Applikation von Vorapaxar vorgesehen sind (177, 178, 179). Aufgrund dieses Nebenwirkungsprofils konzentrierte sich die Forschung zunehmend auf den zweiten auf Thrombozyten exprimierten und durch Thrombin aktivierten PAR, PAR4.

Forscher waren vorerst zurückhaltend PAR4 als möglichen Thrombozytenaggregationshemmer zu erforschen, da im Vergleich zu PAR1 eine 10-fach höhere Thrombinmenge benötigt wird, um diesen zu aktivieren (180). In weiteren Untersuchungen wurde jedoch ersichtlich, dass das PAR-Rezeptorsystem die Möglichkeit bieten könnte, die Thrombinaktivierung der Thrombozyten pharmakologisch durch spezifische Ansteuerung von PAR1 oder PAR4 fein abzustimmen (180, 181). Die Hypothese war, dass eine Antagonisierung von PAR4 die Thrombusbildung limitieren kann, wenngleich parallel über PAR1 weiterhin die Blutgerinnung aktiviert werden kann und übermäßige Blutungen verhindert werden können (180). Inzwischen befinden sich klinische Studien mit hochselektiven PAR4-Antagonisten in der Durchführung, die den Einfluss auf die Thrombozytenaggregation

untersuchen. In einer Kohorte gesunder Patienten bewirkte der PAR4-Antagonist BMS-986120 ex vivo eine Reduktion der Bildung plättchenreicher Thromben unter hohen Scherkräften. Eine verlängerte Blutungszeit oder andere unerwünschte Nebenwirkungen wurden nicht registriert (182). Merali et al. untersuchten ebenso den PAR4-Antagonisten BMS-986120 an gesunden Probanden und bestätigten eine gute Verträglichkeit bei hoher Therapiebreite (19). BMS-986141, ein hoch potenter und selektiver PAR4-Antagonist, präsentierte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zusätzlich antithrombotische Effekte in Kombination mit den Thrombozytenaggregationshemmern Aspirin und/oder Ticagrelor (21). Auch in Kombination mit dem FXa-Inhibitor Apixaban zeigte BMS-986141 eine additive Thrombusreduktion, vornehmlich unter erhöhten Scherkräften (183). Neben den am besten klinisch untersuchten PAR4-Antagonisten BMS-986120 und BMS-986141, erfolgt parallel die Entwicklung eines neuen möglichen PAR4-Antagonisten auf der Basis von Quinazolin-Benzothiazol-Derivaten. Im Mausmodell zeigen diese keine verlängerte Blutungszeit, eine hohe Selektivität für PAR4 sowie Aktivität auf humanen Thrombozyten (184). Damit demonstrieren Quinazolin-Benzothiazol-Derivate ein großes Potential für eine Thrombozytenaggregationshemmung.

Neben der sicheren und effektiven Thrombozytenhemmung der PAR4-Antagonisten, erweitert sich das Forschungsspektrum zudem auf neuroinflammatorische Erkrankungen. Die neuronale PAR4-Expression ist nach Schlaganfall hochreguliert und der Einsatz des PAR4-Inhibitors ML354 führte zu einer reduzierten Entzündungsreaktion und Infarktgröße (138). Ein weiterer PAR4-Antagonist BMS-986120 bewirkte nach SHT die Reduktion der Astrozyten-vermittelten Entzündungsreaktion (22). Hervorzuheben ist, dass die zuvor genannten Forschungsergebnisse auf Untersuchungen im Mausmodell basieren und die Translation sowie die klinische Anwendbarkeit auf menschliche Patienten muss in Zukunft noch nachgewiesen werden.

## 2.4 Das SHT im Mausmodell

Die Untersuchung des SHT im Tiermodell dient dazu nach einem primären physikalischen Schaden die darauffolgenden pathophysiologischen Veränderungen besser zu verstehen. Dem SHT unterliegen vielfältige Pathomechanismen, welche es besonders schwer machen ein geeignetes, klinisch relevantes Tiermodell zu entwickeln (185). Daher sind unterschiedliche experimentelle Ansätze notwendig, um die heterogene Pathophysiologie des SHT zu verstehen (186). In der Vergangenheit wurden bereits diverse SHT-Modelle im Tiermodell entwickelt. In diesem Abschnitt soll der Fokus aufgrund des Kontexts dieser Forschungsarbeit auf das mechanische Modell des SHT in der Maus gelegt werden. Die Maus eignet sich als Tierspezies als SHT-Modell in Anbetracht ihrer Ökonomie, Reproduzierbarkeit und der gut untersuchten Neuroanatomie (187). Zumeist werden Mäuse des Wildtyp-Stammes C57BL/6 J verwendet, die auch in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen (188).

Die vier Hauptmodelle des SHT in der Maus sind die folgenden (186, 187, 189, 190):

1. Controlled Cortical Impact (CCI)
2. Fluid percussion injury (FPI)
3. Weight drop/ Impact Acceleration models
4. Blast injury models

Diese vier Modelle unterscheiden sich in ihren jeweiligen Traumamechanismen, weshalb kein einzelnes Modell in der Lage ist, die Gesamtheit und Komplexität des (menschlichen) SHT vollständig abzubilden. Das CCI-Modell spiegelt hervorragend fokale Kontusionen wider (191), das FPI bietet den Vorteil, dass es ein Mischbild an Verletzungsmustern reproduziert und sich vor allem für die Untersuchung von kognitiven Defiziten und chronischen Langzeitfolgen eignet (192, 193). Das weight drop model hingegen ist repräsentativ für ein geschlossenes SHT und eignet sich für die Untersuchung des diffusen axonalen Hirnschadens (194). Blast injury models decken die SHTs im Rahmen von Militäreinsätzen mit wiederholten Gehirnerschütterungen ab (188, 195). Trotz der Vielfalt der Modelle und ihrer jahrelangen (standardisierten) Durchführung sind sie in ihrer Übertragbarkeit auf das menschliche SHT limitiert. Dem zu Grunde liegen zum einen die unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten (z.B. die Größe und die Organisation der weißen Substanz oder die gyrale Komplexität), zum anderen wie oben bereits erwähnt die

Spezialisierung auf entweder einen fokale oder diffusen Hirnschaden. Das SHT beim Menschen dahingegen umfasst beide Verletzungsmuster (186, 196). Hierdurch ergeben sich Einschränkungen der Übertragbarkeit von möglichen therapeutischen Ansätzen.

Das CCI, welches in dieser Studie verwendet wird, bietet einige Vorteile: Es ist eine hoch standardisierte Methode, bei der von den Forschenden Parameter wie Aufprallgeschwindigkeit, Eindringtiefe, Kontaktdauer, Aufprallort sowie Größe und Geometrie des Impaktors bestimmt und modifiziert werden können (197, 198, 199). Dies ermöglicht eine hohe Genauigkeit des Modells und die Simulation von milden bis schweren SHTs (197, 199, 200). Pathophysiologisch deckt das CCI-Modell mit axonalen Störungen, Hirnödemen, Inflammation, Störungen der BHS und des zerebralen Blutfluss eine hohe Bandbreite ab (198). Folglich erweist sich das CCI-Modell dadurch als eine wertvolle Grundlage zur Erforschung neuroprotektiver Therapien.

### **3 Methoden**

#### 3.1 Tierexperiment

##### 3.1.1 Tierversuchsantrag

Der Tierversuchsantrag mit dem Aktenkennzeichen G 16-1-079 wurde am 16.12.2016 durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Studie erfolgte gemäß den geltenden Vorschriften des Tierschutzgesetzes §8: Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes.

##### 3.1.2 Versuchstiere

Die Ausführung der Studie erfolgte mit insgesamt 44 männlichen Mäusen (*Mus musculus*; ca. 25 Gramm (g) Körpergewicht). Es kamen 15-16 Wochen alte männliche Mäuse mit einem Gen-Knockout für PAR4 (PAR4<sup>-/-</sup>; B6(Cg)-F2rl3tm1.1 Cgh/Tarc, Herkunft: AG Prof. Dr. Wolfram Ruf, Zentrum für Thrombose und Hämostase; Universitätsmedizin Mainz) und männliche Wildtyp-Kontrollmäuse (BL6; C57BL/6, Herkunft: Janvier, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) mit vergleichbarem genetischem Hintergrund zum Einsatz. Die beiden Studiengruppen bestanden aus jeweils 22 Mäusen. Um den richtigen Genotyp zu verifizieren sowie Verwechslungen während der Experimente auszuschließen erfolgte sowohl beim Absetzen der Mäuse (ca. drei Wochen nach Geburt) als auch nach Euthanasie, mittels Schwanzbiopsie, eine Genotypisierung.

##### 3.1.3 Haltung der Versuchstiere

Die Haltung der Mäuse entsprach den institutionellen Richtlinien der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Gemäß den Vorschriften erfolgte die Unterbringung der Versuchstiere 24 h vor Experimentbeginn in Einzelkäfigen ausgestattet mit entkeimten Holzspänen als Einlage. Für die Nahrungsaufnahme enthielt jeder Käfig eine wassergefüllte Trinkflasche und getrocknete Futterpellets. Die Versuchstiere hatten ständigen Zugang zu Trinkflasche und Futterpellets (= Nahrungsaufnahme ad libitum). Die Umgebungstemperatur betrug 22 Grad Celsius (°C) und die Luftfeuchtigkeit 55 %. Die Aufrechterhaltung einer konstanten 12-h-Tag-Nacht-Rhythmik erfolgte durch künstliche Beleuchtung.

#### 3.1.4 Abbruchkriterien

Die Überwachung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere fand täglich durch einen Veterinärmediziner statt. Bei einem ausgeprägten Gewichtsverlust von > 15 % in Kombination mit ausgeprägter Schmerzsymptomatik und Verhaltensdefiziten (Krämpfe, Stupor, reduzierte Lokomotion) wurden die Tiere unmittelbar in tiefer Narkose durch Isofluran mittels Dekapitation euthanasiert.

#### 3.1.5 Studiendesign

Für das durchgeführte Experiment wurden jeweils beide Studiengruppen eines operativen Eingriffs mit kontrolliertem SHT unterzogen. Daran schloss sich eine Beobachtungszeit von 24 h an. Nach dieser Beobachtungszeit erfolgte die Euthanasie der Tiere.

### 3.2 Invasive Verfahren

Als Basis des Experimentes und der zu analysierenden Daten wurde den narkotisierten Tieren in einer Operation (OP) ein kontrollierter Schaden im Sinne eines simulierten SHT zugefügt.

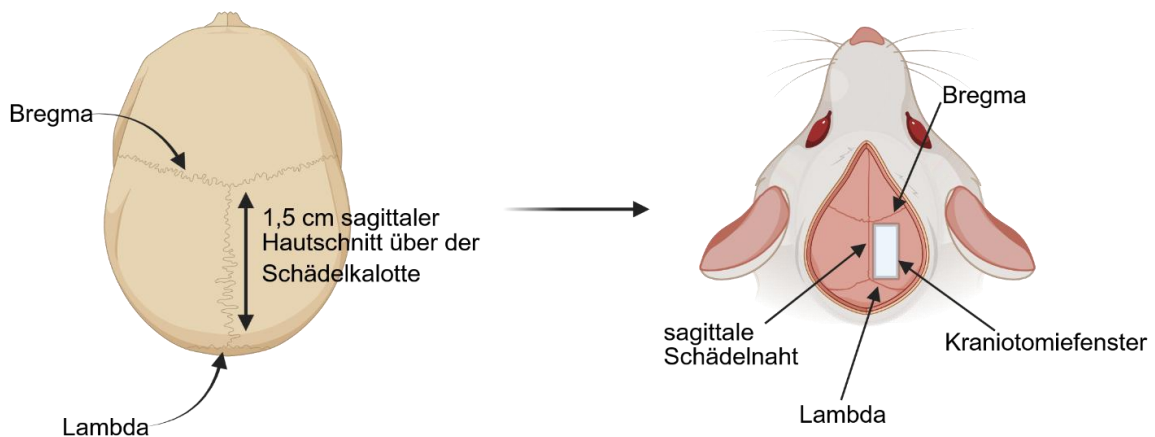
#### 3.2.1 Präoperative Phase

Vor Beginn des operativen Eingriffes wurde das Körpergewicht jedes Tieres erfasst sowie jedes Tier auf Hinweise einer Erkrankung hinsichtlich einer Nicht-Eignung für den Eingriff untersucht. Die Maus wurde unter einen Trichter in einem Glaskasten gesetzt. Mithilfe des aus dem Trichter austretenden Gasgemisches, bestehend aus dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Piramal Critical Care B.V., TR Voorschoten, NL) in 4 %iger Konzentration und Sauerstoff, wurde die Narkose eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte bei erhaltener Spontanatmung durch eine Gesichtsmaske. Das Tier wurde auf einer Wärmeplatte (Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) platziert, welche eine konstante Temperatur von 37 °C abgab. Hierdurch sollte ein unerwünschter und unkontrollierter Abfall der Körpertemperatur vermieden werden. Die kontinuierliche Überwachung der Körpertemperatur während der OP fand durch eine rektal eingeführte Temperatursonde (Physitemp, New Jersey, USA) statt. Um eine Positionsänderung während der invasiven Maßnahme zu

verhindern, wurde der Kopf der Maus in einem stereotaktischen Rahmen (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) im Operationsbereich fixiert (s. Abbildung 9). Im nächsten Schritt wurde das Erlöschen des Zwischenzehreflexes der hinteren Gliedmaßen überprüft, um über die gesamte Dauer der OP eine ausreichende Narkosetiefe zu garantieren. Durch Aufbringen einer Augensalbe (Bayer Vital, Leverkusen, DE) wurde das Austrocknen der geöffneten Augen verhindert.

### 3.2.2 Induktion des SHT durch das CCI-Modell

Den ersten Schritt der OP stellte ein ca. 1,5 Zentimeter (cm) langer und sagittaler Hautschnitt über der Schädelkalotte von der vorderen (Bregma) bis zur hinteren (Lambda) koronaren Schädelnaht (s. Abbildung 8) dar. Daraufhin erfolgte die Präparierung der Schädelkalotte rechts paramedian der Schnittführung. Unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens (WIROS Wilfried Rosbach GmbH, Willich, DE) wurde das nun freigelegte Periost vom Knochen mobilisiert und an den Rand des Operationsbereiches verschoben.



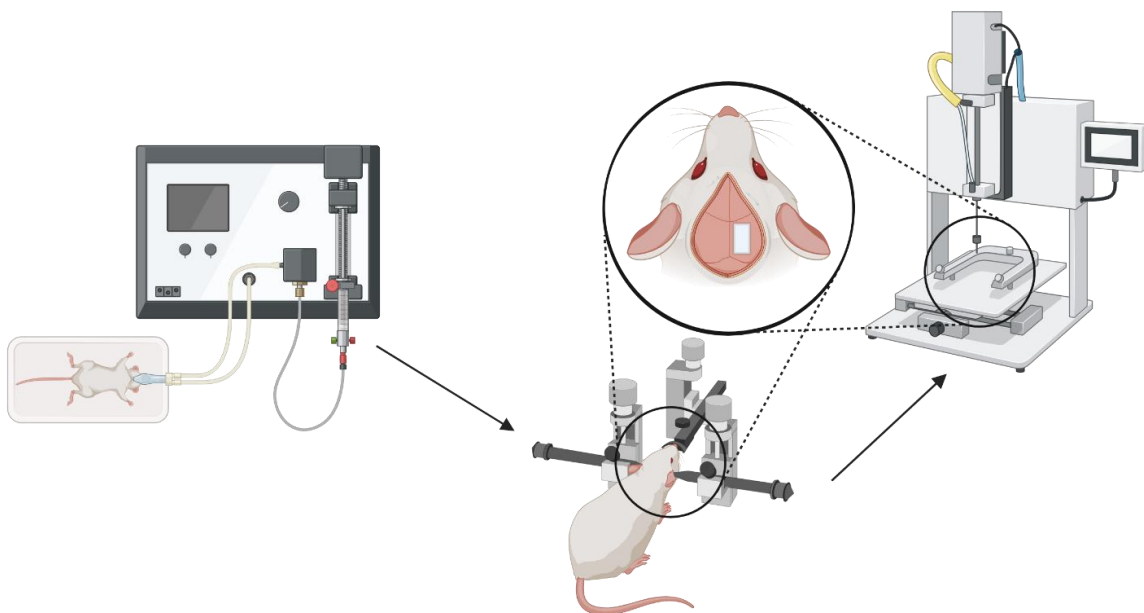
**Abbildung 8: Schnittführung Hautschnitt sowie Kraniotomie während des Controlled Cortical Impact-Modells**

Created with BioRender.com.

Die Kraniotomie wurde mittels Mikrobohrer (Paggen, Starnberg, DE) durchgeführt, entlang an drei von vier Seitenlinien des Rechtecks begrenzt nach rostral durch die anteriore Schädelnaht Bregma, lateral durch den Arcus zygomaticus und kaudal durch die posteriore Naht Lambda (s. Abbildung 8). Die vierte und nach medial begrenzte Linie entsprechend der sagittalen Schädelnaht blieb unberührt. Dadurch diente diese beim Hochklappen der Kalotte als Scharnier. Durch sorgfältige Präparation blieb die

unter der Kalotte liegende harte Hirnhaut (Dura mater) sowie weitere darunterliegende Strukturen unversehrt.

Das kontrollierte SHT wurde mithilfe des CCI-Impaktors (Leica; Richmond, USA) induziert. Dieser wurde senkrecht über der exponierten Hirnoberfläche platziert und auf den freigelegten Kortex ausgerichtet. Durch Betätigen eines elektromagnetisch betriebenen Bolzens mit einem Durchmesser von 3 Millimeter (mm), prallte dieser stumpf auf das Gehirngewebe. Der Aufprall wurde mit einer Geschwindigkeit von 6 Metern pro Sekunde (m/s), einer Tiefe von 1,5 mm und einer Kontaktzeit von 200 Millisekunden (ms) durchgeführt.



**Abbildung 9: Ablauf des Controlled Cortical Impact-Modells**

Zuerst erfolgte die Narkoseinduktion. Nach Erlöschen des Zwischenzehreflexes der Maus wurde diese in den stereotaktischen Rahmen eingespannt und die Haut über der Schädelkalotte eröffnet. Nach Eröffnung der Schädelkalotte wurde das mechanische Schädel-Hirn-Trauma durch den Impaktor appliziert. Created with BioRender.com.

Nach erfolgreich induziertem Schaden wurde der CCI-Impaktor entfernt, die aufgeklappte Kalotte wieder repositioniert und das Operationsfeld mit Histoacryl Gewebekleber (Braun, Melsungen, DE) verschlossen. Die Hautnaht wurde mit Einzelknopfnähten (Prolene 6-0, Ethicon, San Lorenzo, USA) verschlossen. Im Anschluss wurde die Maus aus dem stereotaktischen Rahmen gelöst, die Gesichtsmaske und die rektale Temperatursonde entfernt und die Maus für die postoperative Überwachung zurück in einen Inkubator (Dräger, Lübeck, DE) gesetzt.

Der Ablauf des operativen Eingriffs erfolgte für alle Versuchstiere, sowohl BL6- als auch PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere standardisiert und für den Operateur verblindet nach dem gleichen OP-Protokoll.

### 3.2.3 Postoperative Phase

Nach Abschluss der invasiven Maßnahmen und Beendigung der Narkose wurde die Maus in einen Inkubator zur postoperativen Überwachung gesetzt. In einer Umgebung mit einer Temperatur von 33 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 35 % wurden die Tiere für eine Stunde überwacht. Im Anschluss wurde das Tier wieder in den Einzelkäfig zurückgesetzt. Es schloss sich eine engmaschige Überwachung der Tiere hinsichtlich Verhaltensauffälligkeiten, Gewichtsverlust und Schmerzen an.

## 3.3 Erfassung des Körpergewichts

Der postoperative Allgemeinzustand der Mäuse konnte anhand der Nahrungsaufnahme abgeschätzt werden. Dies geschah indirekt über das Körpergewicht der Mäuse. Hierfür wurden alle Tiere erneut postoperativ zum selben Zeitpunkt gewogen.

## 3.4 Verhaltensbiologische Untersuchungen

### 3.4.1 Neurological Severity Score (NSS)

Eine weltweit standardisierte Methode, um den neurologisch-motorischen Zustand der Mäuse objektiv zu beurteilen, ist der NSS. Der NSS ist in die folgenden sechs Kategorien unterteilt: Verlassen des Kreises, Schreckreflex, Suchverhalten, Gangverhalten mit Koordination sowie Gleichgewicht und motorische Lähmungserscheinungen. Die Tiere werden hierbei anhand eines Punktesystems beurteilt. Die Endsumme gibt Aufschluss über den aktuellen Status des Tieres. Die Tiere können eine Punktzahl zwischen 0 und 16 Punkten erreichen, wobei 0 Punkte keinem und 16 Punkte dem größten Defizit entsprechen (201, 202).

Die Erfassung des NSS wurde in diesem Forschungsprojekt einen Tag präoperativ und am ersten Tag postoperativ durchgeführt. Die Erhebung der Daten fand stets zu

denselben Tageszeitpunkten statt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Studiengruppen sicherzustellen.

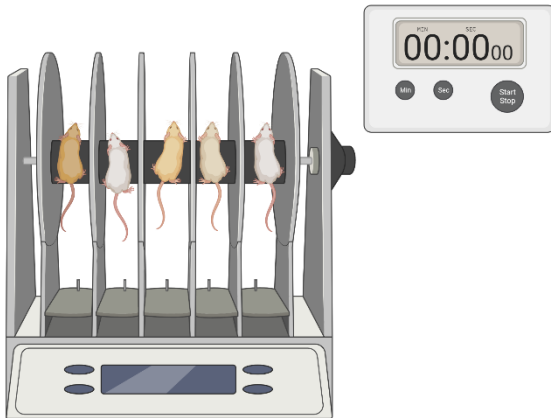
**Tabelle 1:** *Modifizierter Neurological Severity Score nach Chen et al. (202)*

<b>Kategorie</b>	<b>Punkte</b>
Exit from circle (= Verlassen des Kreises)	0-3
Reflexes (= Reflexe)	0-1
Seeking behavior (= Suchverhalten)	0-1
Walk straight (= Geradeaus gehen)	0-1
Coordination (= Koordination)	0-6
Balance (= Gleichgewicht)	0-2
Motor deficit (= Motorisches Defizit)	0-2
<b>Summe</b>	<b>0-16</b>

### 3.4.2 Rotarod-Test (RR)

Der RR-Test (Panlab Harvard Apparatus; Cornella, ES) ist ein verlässliches Untersuchungsverfahren, um die Ausdauerfähigkeit, Greifkraft und motorische Fähigkeit der Mäuse zu beurteilen. Hierbei werden die Tiere auf einen geriffelten, rotierenden Zylinder von 3 cm Durchmesser positioniert (s. Abbildung 10). Der Zylinder beschleunigt nun konstant innerhalb von 5 min von 4 Umdrehungen pro Minute (U/min) auf 40 U/min. Erhoben werden die Zeit und Rotationsgeschwindigkeit, bei der sich die Maus nicht mehr auf dem Zylinder halten kann und herunterfällt.

Da diese Übung für die Mäuse unnatürlich ist, wurden diese zunächst durch zwei unbewertete Trainingsdurchläufe mit der Methode vertraut gemacht. Dies ermöglicht später die valide Einschätzung der Leistung. Die in die Studie eingeschlossenen und ausgewerteten Durchläufe wurden sowohl ein Tag präoperativ als auch ein Tag postoperativ durchgeführt.



**Abbildung 10: Rotarod-Test**

Created with BioRender.com.

### 3.5 Euthanasie und Gehirnentnahme

24 h nach der OP und der durchgeführten verhaltensbiologischen Tests wurden die Tiere euthanasiert. Im Anschluss wurden die Gehirne für die weitere histologische Aufarbeitung und Analyse entnommen.

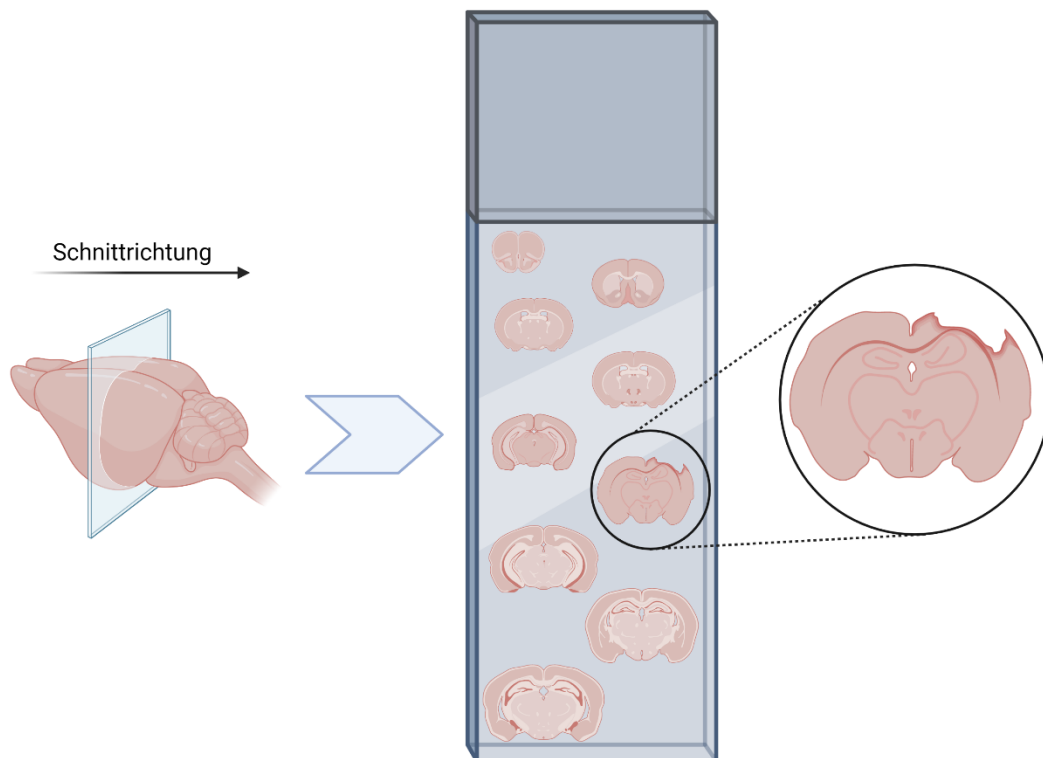
Um einen Status tiefer Hypnose und Analgesie sicherzustellen wurden die Tiere für die Euthanasie mit 4 %igem Isofluran Gasgemisch für 1 min narkotisiert. Im nächsten Schritt wurde mit einer Schere die Dekapitation durchgeführt. Für die Hirnentnahme wurde zuerst die Kopfhaut sagittal aufgetrennt, danach erfolgte die vorsichtige und seitliche Eröffnung der Schädeldecke beginnend am Foramen magnum von occipital nach rostral seitlich, bis das Gehirn vollständig exponiert war. Anschließend wurden die ventralen Hirnnerven durchtrennt, das Gehirn entnommen und auf pulverisiertem Trockeneis für 1 min schockgefroren. Die Aufbewahrung der Gehirne erfolgte, verpackt in ein Plastiktütchen, in einem Gefrierschrank bei -20 °C, bis zur weiteren Prozessierung.

### 3.6 Histologische Datenerhebung

#### 3.6.1 Kryosektion und Probengewinnung

Zur Herstellung von Hirnschnitten für weitere histologische Untersuchungen wurden die Gehirne im Kryostat (CryoStar™ NX70, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE) bei -20 °C in koronarer Schnitfführung unterteilt. Für optimale Schnitte wurden die Gehirne hierfür in einem Gefrierschnittmedium (Neg-50™, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) eingebettet und mittig auf einem Objektisch befestigt. Die Positionierung der Schneideklinge erfolgte parallel zur Koronarebene des Gehirns. Während des gesamten Prozesses wurde auf die korrekte Ausrichtung der Gehirne geachtet, um eine vergleichbare Qualität der Schnitte zu gewährleisten. Im Kryostat wurde das Präparat beginnend bei Bregma +3,14 mm von rostral nach kaudal in 16 Ebenen im Intervall von 500 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) geschnitten. Pro Ebene wurden jeweils drei 12  $\mu\text{m}$  feine koronare Schnitte „als Kopie“ angefertigt und auf Objektträger (OT) (Superfrost® Plus, Thermo Scientific; Braunschweig, DE) aufgenommen. Somit standen nach der Kryosektion pro Gehirn und pro Ebene jeweils drei Kopien und somit insgesamt 48 Schnitte á 12  $\mu\text{m}$  zu Verfügung (s. Abbildung 11). Nach Trocknung der OT wurden diese in Kästen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Anfertigung der Hirnschnitte sowie exemplarischer Hirnschnitt mit Läsion, verursacht durch das Controlled Cortical Impact-Modell**  
Created with BioRender.com.

Um das Schadensareal des CCI auch mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Analyse untersuchen zu können, wurden von den Ebenen 6 (Bregma +0,64mm) bis Ebene 13 (Bregma -2,86mm) 6 Trimmschnitte á 40  $\mu\text{m}$  geschnitten. Die Trimmschnitte wurden nun deckungsgleich und in Schnittreihenfolge aufeinandergelegt, damit ergab sich ein

koronarer Schnitt mit insgesamt 240 µm Dicke. Im Anschluss wurde das untere Drittel des Schnitts entfernt, um eine gezielte Analyse des Schadensbereichs zu ermöglichen. Danach wurde der Schnitt entlang der Mittellinie in die ipsiläsionale und kontraläsionale Hälfte unterteilt und jeweils in ein Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE) überführt. Es folgten die Trimmschnitte der restlichen Ebenen. Am Ende lagen pro Gehirn vier Kryoröhrchen (zwei pro Hemisphäre) mit Hirngewebe der Schadensebenen vor. Diese wurden bis zur weiteren Analyse auf gefrorenem Stickstoff (Air Liquide, Düsseldorf, DE) bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.6.2 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine etablierte Methode zur Darstellung von neuronalen Zellkernen. Die Färbung erfolgt durch Farbstoffe wie beispielsweise Kresylviolett, Thionin oder Toulidinblau. In dieser Studie wurde der Farbstoff Kresylviolett angewendet. Allen Farbstoffen ist gemeinsam, dass sie vornehmlich basophile Strukturen, wie RNA oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden und diese blau bzw. violett anfärben. Die Bindung entsteht durch in RNA bzw. Ribosomen und in DNA enthaltenen negativ geladenen basophilen Phosphatgruppen. Da sich in Neuronen das raue endoplasmatische Retikulum mit Ribosomen (als „Nissl-Schollen“ nach Anfärbung erkennbar), RNA und DNA hauptsächlich im Zellkörper befinden, wird dieser im Vergleich zu Axon und Dendrit stark angefärbt. Axone und Dendriten lassen sich kaum anfärben.

Zur Durchführung der Nissl-Färbung wurden die OT aus dem Gefrierschrank entnommen und nach standardisiertem Laborprotokoll angefärbt. Zunächst musste am Tag der Färbung der benötigte Farbstoff hergestellt werden. Es wurden 5 g Kresylviolett (Merck, Darmstadt, DE) in 100 Milliliter (ml) reinen Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE) gelöst. Um eine Homogenisierung und gute Qualität des Farbstoffs zu erreichen, musste dieser auf 50 °C erwärmt und dabei ständig durchmischt werden. Danach wurde die Suspension mit Aqua destillata (Braun, Melsungen, DE) auf ein Volumen von insgesamt 500 ml verdünnt und abfiltriert. Nachdem die OT für eine Stunde getrocknet wurden, wurden nun jeweils 10 OT in ein Färbekästchen einsortiert, um den Färbeprozess zu erleichtern. Diese konnten nun die bereits vorbereiteten Tauchbäder in folgender Reihenfolge durchlaufen:

- 1) 2 min 70 % Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE)
- 2) 10 min Kresylviolett-Lösung
- 3) 2-mal kurz Aqua destillata
- 4) 2-mal kurz 70 % Ethanol
- 5) 2-mal kurz 96 % Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE)
- 6) 5 min Roti<sup>®</sup>Histol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE)
- 7) 2 min Roti<sup>®</sup>Histol

Für die Aufbewahrung wurden die Gehirnschnitte zuletzt in Roti<sup>®</sup>Histokitt (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) eingebettet und mit Deckgläsern (Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE) versiegelt. Es erfolgte die Trocknung über Nacht. Es wurden jeweils alle 16 Schnitte einer Ebene pro Gehirn gefärbt.

### 3.6.3 Quantifizierung des Läsionsvolumens

Durch die Kresylviolett-Färbung lässt sich das beschädigte Gewebe gut von gesundem Gewebe differenzieren, da im Gegensatz zum beschädigten Gewebe das gesunde Gewebe mit seinen intakten Zellorganellen angefärbt wird. Für die Bestimmung des Läsionsvolumens wurden die einzelnen Schnitte unter einem Lichtmikroskop (Stereomikroskop Stemi 305, Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE) betrachtet, mithilfe der Kamera AxioCam (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE) fotografiert und mithilfe der Software Zen 2.0 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, DE) vermessen. Hierbei wurde zuerst die Gesamtfläche der kontraläsionalen, unbeschädigten Hemisphäre ausgemessen und als Näherungswert für die Gesamtfläche der ipsiläsionalen Hemisphäre vor SHT angenommen. Durch Ausmessen der Fläche des unversehrten Gewebes in der ipsiläsionalen, beschädigten Hemisphäre konnte die Fläche des untergegangenen Nervengewebes pro Schnittebene wie folgt errechnet werden:

$$A_{1-16(\text{kontraläsional})} - A_{1-16(\text{ipsiläsional})} = A_{1-16(\text{Läsion})} \text{ mm}^2$$

Im Folgeschritt wurde nun das Läsionsvolumen unter zu Hilfenahme des Abstands der Schnitte (500  $\mu\text{m}$  = 0,5 mm) berechnet:

$$V_{(\text{Läsion})} = (A1 + A2 + A3 + A4 + \dots + A16) \times 0,5\text{mm} = \text{mm}^3$$

### 3.6.4 Quantifizierung des Körnerzellbandes im Gyrus dentatus

Die Vermessung des Körnerzellbandes (engl. Granular cell layer, GCL) ist ein weiterer verlässlicher Marker in der Neuropathologie, der einen Rückschluss auf den Schaden des Gehirns fernab der direkten Traumalokalisation zulässt (203, 204). Das Erfassen der Dicke der GCL im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus ermöglicht eine Quantifizierung des Schadens im Bereich des Hippocampus und wurde in den Ebenen 13 und 14 (Bregma -2,0 mm bis Bregma -2,1 mm) analysiert. Hierfür wurden drei vordefinierte Bereiche (innen, mittig, außen) der GCL in der ipsiläsionalen und der kontraläsionalen Hemisphäre in  $\mu\text{m}$  vermessen. Aus diesen drei Messbereichen wurde ein Mittelwert pro Ebene und Hemisphäre errechnet und diese ins Verhältnis zueinander gesetzt. Für die Datenanalyse wurde schlussendlich das Verhältnis der Mittelwerte aus beiden Ebenen von ipsiläsionaler zu kontraläsionaler Hemisphäre sowie die Dicke der GCL verwendet.

### 3.6.5 Immunhistochemische Färbung auf Immunglobulin G (IgG)

Der Nachweis von Extravasation von IgG ins Hirngewebe stellt ein Marker für die Integrität der BHS dar. Die intakte BHS ermöglicht den Transfer von Immunglobulinen in einer konstanten Rate. Bei Schädigung der BHS wird diese permeabler für Proteine im Allgemeinen und damit auch für Immunglobuline. In der vorliegenden Studie soll der Einfluss der PAR4-Defizienz nach kontrolliertem SHT auf die Integrität der BHS untersucht werden. Die immunhistochemische Färbung für IgG ermöglicht die Detektion von extravasalem IgG im Hirngewebe und lässt somit Rückschlüsse auf die Intaktheit der BHS im Vergleich zwischen BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Tieren zu. Das Grundprinzip immunhistochemischer Färbungen beruht auf der Darstellung der nachzuweisenden Proteine auf (sub-)zellulärer Ebene durch indirekte Markierung mit einem Farbstoff. Zuerst wird dem zu untersuchende Gewebe ein primärer AK hinzugefügt, welcher antigenspezifisch an das Zielprotein bindet. Im Falle der immunhistochemischen Färbung auf IgG wird laborintern ein primärer AK verwendet

der an die biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (*englisch: horseradish peroxidase = HRP*) gekoppelt wird. Der sekundäre AK ist im VECTASTAIN® ABC-Kit (ABC = Avidin-Biotin-Komplex) enthalten. Es handelt sich hierbei um einen biotinylierten universellen sekundären AK, welcher verschiedene primäre AK von Maus, Hase und Ziege erkennen kann. Für eine Signalverstärkung wird die ausgesprochen starke Bindung zwischen Avidin und Biotin ausgenutzt. Avidin bildet gemeinsam mit dem biotinylierten Enzym HRP große dreidimensionale Komplexe, welche wiederum über Avidin den biotinylierten sekundären AK binden können. Hierdurch werden pro primärem AK sehr viele Enzyme gekoppelt. Um nun eine Farbreaktion zu erhalten, wird das Chromogen 3-3' Diaminobenzidine (DAB) hinzugegeben, welches durch das gebundene HRP oxidiert wird und als braunes Präzipitat ausfällt. Somit können mit IgG angereicherte Areale sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurden wieder die vorbereiteten Hirnschnitte auf den OT aus dem Gefrierschrank entnommen und an der Luft getrocknet. Es wurden die Ebenen 11 und 12 der Hirnschnitte untersucht. Diese werden auf dem OT mit einem hydrophobischen Dako-Pen (Dako North America, Inc.; Carpinteria, CA, USA) umrandet, zum einen, um AK zu sparen, aber auch um eine vollständige Bedeckung der Hirnschnitte mit AK-Lösung zu gewährleisten. Die OT wurden für die nachfolgenden zwei Schritte in eine Küvette einsortiert und auf dem Schüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE) platziert. Zu Beginn erfolgte die Fixierung für 10 min mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA, Merck, Darmstadt, DE) unter dem Abzug und das anschließende Waschen für 3 x 5 min in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Dulbecco Trockensubstanz, Biochrom, Berlin, DE). Die OT wurden nun aus der Küvette herausgenommen und nach leichtem Abklopfen der PBS auf einem Tuch in eine Feuchtkammer überführt. Die Feuchtkammer dient der Verhinderung der Austrocknung der Schnitte. Danach wurde zur Blockierung der Schnitte ca. 100 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) pro OT (ca. 50  $\mu\text{l}$  pro Schnitt) 3 %iges Wasserstoffperoxid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) auf die OT pipettiert. Das Blocken der Schnitte verhindert eine unspezifische Bindung des primären AK. Nach 3 min wurden die Schnitte erneut für 5 min mit PBS in der Küvette auf dem Schüttler gewaschen. Währenddessen wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1:500 die Lösung des primären AK angesetzt. Als primärer AK kam hierbei der Goat-anti-mouse-HRP-linked-AK (SC-2031, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) zum Einsatz. Dieser ist, wie

der Name beschreibt an die HRP gekoppelt, welche später für die Farbreaktion essenziell ist. Als Lösungsmittel wurde PBST (PBS versetzt mit 0,1 %igem Triton X (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE)) verwendet. Es wurden wieder ca. 50 µl/Schnitt auf die OT pipettiert, so dass sichergestellt war, dass die gesamte markierte Fläche mit AK-Lösung bedeckt war. Es erfolgte die Inkubation für 1,5 h. Im Anschluss wurden die OT wieder zurück in die Küvetten gestellt und für 3 x 5 min in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Über einen Zeitraum von 30 min wurde in der Feuchtkammer die ABC-Lösung (VECTASTAIN® ABC-Kit, Vector Laboratories, Inc., CA, USA) zugegeben. Es schloss sich ein erneutes Waschen für 2 x 5 min in der Küvette auf dem Schüttler an. Nach erneuter Aufreihung in der Feuchtkammer wurde das Chromogen DAB (Verhältnis DAB:Puffer = 1:1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) für 75 Sekunden (s) auf die OT gegeben. Die nachfolgenden Schritte erfolgten erneut in Küvetten auf dem Schüttler. Zuerst wurden die OT für 3 x 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die OT für je 2 min in aufsteigender Alkoholreihe mit 70 %, 80 % und 100 % Isopropanolol (Sigma, St. Louis, MO, USA) geschwenkt. Die Durchführung der abschließenden 3 Schritte fand unter dem Abzug statt. Hierfür wurden die Schnitte einmal für 5 min und danach für 3 min in Roti®Histol entwacht. Am Ende wurden die Schnitte mit Roti®Histokitt und einem Deckglas eingedeckelt. Die Schnitte verblieben bis zum nächsten Tag unter dem Abzug, um abzutrocknen.

### 3.6.6 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung

Analog zur Quantifizierung des Schadensvolumens, können die durch die immunhistochemische Färbung entstanden bräunlichen Areale vermessen werden. Bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop wurden die Hirnschnitte fotografiert und mit der Software Zen 2.0 blue edition vermessen. Es wurde sowohl die linke als auch die rechte Hemisphäre vermessen. Nach Ausmessung des gesamten Areals einer Hemisphäre, wurde im nächsten Schritt hiervon das nicht angefärbte Gewebeareal subtrahiert. Die Differenz entspricht dem Areal, welches von der IgG-Extravasation betroffen ist. Im Anschluss wurde die Summe aus den Arealen der beiden Hemisphären sowie den angefärbten Arealen beider Hemisphären gebildet und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Das Ergebnis hieraus repräsentierte den prozentualen Anteil des von der Extravasation betroffenen Hirngewebes.

### 3.6.7 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine etablierte histologische Färbemethode. Sie ermöglicht einen guten Überblick über unterschiedliche Gewebestrukturen. Hierbei werden Zellkerne im sauren Milieu mit Hämalaun blau angefärbt. Für die Aufrechterhaltung der Färbung wird ein pH-Wert über 3 benötigt. Dies wird durch intensive Spülung in fließendem Wasser gewährleistet („Bläuen“). Ein positiver Nebeneffekt ist hierbei die Verbesserung der Haltbarkeit der Färbung, da Hämalaun im alkalischen Bereich schlecht löslich ist.

Der Fluoreszenzfarbstoff Eosin hat eine rot-gelbe Farbe und ist leicht sauer. Nach der Hämalaunfärbung erfolgt die Gegenfärbung mit Eosin. Durch Eosin werden Strukturen wie Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten in unterschiedlicher Intensität rot angefärbt (205).

Für die HE-Färbung wurden die Kryoschnitte 7, 8, 9 und 10 verwendet. Die Schnitte wurden aus dem Gefrierschrank entnommen und für ca. 10 min zum Trocknen ausgelegt. Es wurde das Färbekit Hämatoxylin & Eosin von Morphisto GmbH (Offenbach am Main, DE) verwendet. Danach wurden je zehn OT in ein Färbekästchen einsortiert, um den Färbevorgang zu vereinfachen. Nun konnten die OT folgende bereits vorbereitete Tauchbäder nacheinander durchlaufen:

- 1) 10 min in 100 % Ethanol
- 2) 1 min in 96 % Ethanol
- 3) 1 min in 70 % Ethanol
- 4) 2 x kurzes Waschen in Aqua destillata
- 5) 1 min in Hämalaun
- 6) 10 min Waschen in fließendem Hahnenwasser
- 7) 2 x kurzes Waschen in Aqua destillata
- 8) 1,15 min in Eosin (200 ml + 80 µl 100 % acetic acid [2 Tropfen])
- 9) 2 x kurzes Waschen in Aqua destillata
- 10) 5 min in 70 % Ethanol
- 11) 2,5 min in 80 % Ethanol (Applichem, Darmstadt, DE)
- 12) 1 min in 96 % Ethanol
- 13) 1 min in 100 % Ethanol
- 14) 2 min Roti®Histol

15) 5 min Roti®Histol

16) Fixierung mit Roti®Histokitt (ca. 3 Tropfen)

Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte in einem OT-Kasten bis zur Vermessung aufbewahrt.

### 3.6.8 Quantifizierung des Hämatomareals

Zur Quantifizierung des Hämatomareals wurden die jeweiligen Hirnschnitte mit einem Lichtmikroskop beurteilt und unter Zuhilfenahme der Kamera AxioCam und der Software Zen 2.0 blue edition fotografiert. Für die Ausmessung des Hämatomareals kam das Programm ImageJ (Version 1.53a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) zum Einsatz. Hierbei konnten aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten der Eosinfärbung die Bereiche des Hämatoms gut von dem restlichen Gewebe abgegrenzt, markiert und vermessen werden. Nach Festlegen des optimalen Schwellenwerts, war eine genaue Abgrenzung und Markierung des Hämatomareals möglich. Anschließend konnte die ausgewählte Fläche durch das „Vermessungs“-Plugin analysiert werden. Es wurden die Hämatomareale der ipsiläsionalen Hemisphäre für die Hirnschnitte 7, 8, 9 und 10 bestimmt und der arithmetische Mittelwert daraus berechnet.

## 3.7 Molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 Analyse der exprimierten mRNA

Der Nachweis und die Quantifizierung von exprimierter mRNA im Gewebe ermöglicht Rückschlüsse auf die Expression von Proteinen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. In dieser Studie wurden im Rahmen der Kryotomie Trimmschnitte im Bereich der Gewebeläsion in Kryoröhrchen gesammelt, welche nun zum Einsatz kamen. Es wurde jeweils das Gewebe der ipsiläsionalen Hemisphäre verwendet.

### 3.7.2 Extraktion der mRNA

Die Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene wurde anhand der Trimmschnitte, die während der Kryosektion gewonnen wurden, durchgeführt. Es wurde das RNeasy Plus Universal Kit von Qiagen (Hilden, DE) für die Extraktion der RNA eingesetzt. Das

Kit enthält Substanzen, die für den Zellaufschluss, die DNA-Eliminierung und die mRNA-Extraktion benötigt werden. Das Verfahren wurde gemäß des Qiagen Handbuchs (Qiagen GmbH 2014, Hilden DE) abgearbeitet. Im ersten Schritt, der Zelllyse wurde dem Gewebe 0,9 ml Qiazol Lyse-Reagens (Qiagen GmbH, Hilden, DE) zugesetzt. Das Gemisch wurde gemeinsam mit einer Edelstahlkugel bei 20 Hertz (Hz) im Mastermill (MM 300, Retsch Technology GmbH, Haan, DE) für 2 min homogenisiert. Im Anschluss folgte eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) für 5 min. Danach wurde dem Gemisch 100 µl genomische DNA (gDNA)-Eliminator beigemischt und mit einem Vortexer (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE) für 15 s gemischt. Nach Zugabe von 180 µl Chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde das Lysat im Vortexer erneut durchmischt. Nach 3 min Inkubationszeit bei RT schloss sich die Phasenaufftrennung an. Hierfür wurde das Gemisch für 15 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Danach ließen sich die folgenden drei Phasen festmachen: Die untere rötliche Phase entspricht lysierten Proteinen, die mittlere und milchige Phase enthält DNA und die obere, farblose Phase besteht aus RNA. Die ca. 600 µl fassende obere Phase mit RNA wurde abpipettiert und mit weiteren 600 µl 70 % Ethanol in einem frischen Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, DE) vermengt. Für die Trennung der RNA von der überschüssigen flüssigen Phase wurde das Gemisch nun in eine Trennsäule (Qiagen GmbH, Hilden, DE) mit einer Silicamembran überführt. Durch Zentrifugation (Zentrifuge Eppendorf 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, DE) bei 15 s und 8000 x g heftete sich die RNA selektiv an die Silicamembran und wurde somit von der restlichen Flüssigkeit getrennt. Es erfolgte die weitere Aufreinigung der RNA in drei Schritten mittels RWT und RPE-Puffer (Universal Kit, Qiagen, Hilden, DE) mit sich jeweils anschließender Zentrifugation nach laborinternen Standards. Anschließend wurde die Säule zum Nachrocknen in ein frisches Tube (Eppendorf AG, Hamburg, DE) gestellt und für 1 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der letzte Schritt, die Eluierung der RNA, wurde durch das Auftragen von 30-50 µl RNA-freies Wasser mittig auf die Silicamembran mit nachfolgender Zentrifugation für 1 min mit 8000 x g bewerkstelligt. Die isolierte RNA befindet sich nun im Eluat des Auffangröhrchens und wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei - 80 °C aufbewahrt.

### 3.7.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Es liegen nun 2 µl reine RNA vor. Für die weitere Verwendung musste die genaue mRNA-Konzentration sowie deren Reinheitsgrad mittels Spektralphotometer NanoVue System (GE Healthcare, Illinois, USA) bestimmt werden. Hierfür wurde 1 µl des Eluats auf ein Photometer gegeben. Bei einer Wellenlänge von 260 Nanometern (nm), welche dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, wurde die Extinktion der RNA gemessen. Hierdurch kann das Photometer die Konzentration der mRNA in µg/ml berechnen. Für die Überprüfung des Reinheitsgrades wurde erneut die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Durch Bildung des Quotienten der gemessenen Werte bei 260 nm und 280 nm ergibt sich der Reinheitsgrad wie folgt:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{\text{Wert } 260 \text{ nm}}{\text{Wert } 280 \text{ nm}}$$

Der Normbereich des Reinheitsgrads liegt bei 1,8-2,0. Werte, die kleiner als 1,8 sind weisen auf eine Verunreinigung z.B. durch Proteine hin (206). Ist der Reinheitsgrad der vorliegenden RNA-Probe normwertig, kann die RNA zur Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) verwendet werden.

### 3.7.4 Herstellung der cDNA

Für die im vorherigen Arbeitsschritt gewonnenen RNA soll nun eine quantitative Analyse durchgeführt werden. Diese erfolgte durch die quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR). Für diesen Prozess musste die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Das Enzym reverse Transkriptase schreibt die dabei als Leitstruktur dienende RNA in cDNA um. Bei der Synthese der cDNA kam das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen (Hilden, DE) zur Verwendung. Die einzelnen Schritte wurden nach Herstellerangaben ausgeführt. Um einer Denaturierung der RNA vorzubeugen, erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis.

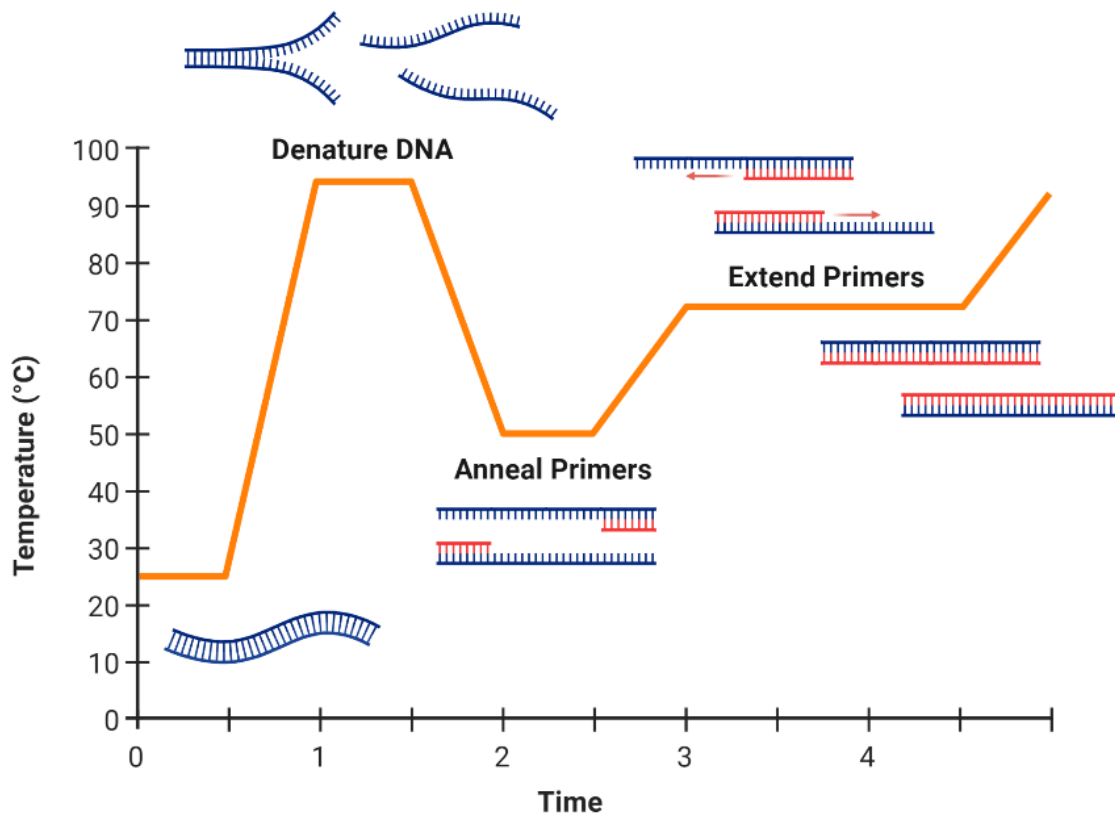
Zu Beginn wurde die im RNA-Gemisch noch enthaltene gDNA unter Zuhilfenahme eines Puffers destruiert und eliminiert. Für jede Probe wurde zu 0,5 µg RNA jeweils 2 µl gDNA Wipeout Puffer (Qiagen, Hilden, DE) gegeben und das Gemisch mit RNase-

freiem Wasser (Fermentas, St. Leon Rot, DE) auf ein Volumen von 14 µl ergänzt. Im Anschluss erfolgte das Erhitzen auf 42 °C für 8 min. Nun wurde die cDNA unter Einsatz der reversen Transkriptase synthetisiert. Hierfür wurde dem Gemisch ein Mastermix (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach, DE), welcher reverse Transkriptase, Primer, Nukleotide sowie Pufferlösung enthält, zugesetzt. Während der Inkubation für 30 min bei 42 °C konnte nun die cDNA erzeugt werden. Am Schluss wurde die Reaktion durch Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Erhitzen für 3 min auf 95 °C gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt und bei - 80 °C aufbewahrt. Es lag nun ausreichend cDNA für mehrere qRT-PCR-Ansätze vor.

### 3.7.5 qRT-PCR

Die qRT-PCR ist das Verfahren der Wahl zur quantitativen Bestimmung von cDNA in einer vorliegenden Probe. Da die Menge der vorliegenden cDNA mit der Menge der gewonnen mRNA korreliert, können mit dieser Methode Rückschlüsse auf die Genaktivität einzelner Proteine zum Todeszeitpunkt der Maus gezogen werden. Das Grundprinzip der qRT-PCR ist die Polymerasekettenreaktion, bei der in ca. 20-40 Zyklen die cDNA vervielfältigt wird (= Amplifikation). Ein Zyklus setzt sich aus drei Phasen bei unterschiedlichen Temperaturen zusammen, die durch Thermocycler automatisch durchlaufen werden (s. Abbildung 12). Startpunkt stellt die Denaturierungsphase dar: Bei 95 °C werden die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelstränge aufgetrennt, sodass nun zwei Einzelstränge vorliegen. Durch rasches Abkühlen auf 65 °C wird ein erneutes Aneinanderlagern der Einzelstränge verhindert. Während der zweiten Phase findet die Bindung der Primer an spezifische Bindungsstellen, den Targets, statt. Durch diese Primerspezifität wird erreicht, dass nur die zum gewünschten Gen zugehörige DNA-Sequenz amplifiziert wird. Die benötigte Temperatur ist Primerabhängig und liegt meist zwischen 55 °C und 65 °C. Die Vervollständigung der Einzelstränge zur DNA findet in der dritten und letzten Phase, der Elongationsphase, statt. Die DNA-Polymerase bindet an die Primer und komplementiert den Doppelstrang durch Einbau der korrespondierenden Basenpaare. Die Nukleotide dATP, dCTP, dTTP, und dGTP sind im Kit-spezifischen Mastermix für die qRT-PCR enthalten. Die Temperatur dieses Schrittes entspricht der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase von ca. 68 °C-72 °C. Schlussendlich liegen

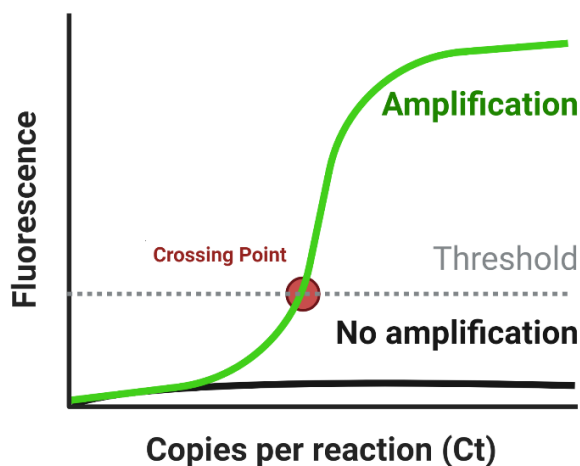
nun doppelt so viele DNA-Stränge vor, welche nun als Ausgangssubstrate für den nächsten Zyklus dienen.



**Abbildung 12: Exemplarischer Ablauf einer quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion**  
Created with BioRender.com.

Die Quantifizierung der multiplizierten DNA wird bei der Methode der qRT-PCR durch das Messen von Lichtemissionen ermöglicht. Es wird ein mit DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff oder eine an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Hybridisierungssonde (Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE) dem PCR-Ansatz beigemischt. Diese Substrate binden unspezifisch Doppelstrang-DNA und emittieren infolgedessen Licht. Diese Signalemission kann nun erfasst werden. Die Signalintensität korreliert mit dem Gehalt an Doppelstrang-DNA, da umso mehr vorliegende Kopien an Doppelstrang-DNA, umso mehr gebundener und aktiver Fluoreszenzfarbstoff. Das System Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE) fährt automatisch Temperaturzyklen für die qRT-PCR und misst zudem in Echtzeit das von dem Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht einer spezifischen Wellenlänge. Die Signalemission wird zur besseren

Interpretation graphisch gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Man erhält eine typische Kurve (s. Abbildung 13), die in drei Abschnitte gegliedert ist. Der initial flache Verlauf repräsentiert eine langsame DNA-Amplifikation, gefolgt von der Phase des exponentiellen Wachstums mit maximaler Multiplikationsrate. Der dritte Abschnitt in Form einer Plateauphase repräsentiert die Stagnation der Amplifikation. Der Light Cycler (LC 480, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE) errechnet in der Phase des exponentiellen Wachstums den Crossingpoint (CP).



**Abbildung 13: Amplifikationskurve mit Crossing Point**

Threshold = Schwellenwert. Created with BioRender.com.

Der CP markiert diejenige Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Er markiert somit gleichzeitig auch den Beginn der exponentiellen Phase. Zum Abgleich und Berechnung der vorliegenden DNA-Menge wird durch selbiges Verfahren eine Standardkurve aufgezeichnet. Durch Analyse einer Standardlösung mit bekannter DNA-Konzentration wird die Standardkurve erstellt. Mithilfe der Standardkurve errechnet die Software aus dem CP die vorliegende DNA-Menge. Die ursprüngliche cDNA-Konzentration der untersuchten Probe kann hieraus indirekt bestimmt werden. Pro Proben wurden nach zuvor beschriebenem Ablauf jeweils zwei qRT-PCR-Durchläufe gestartet und daraus der arithmetische Mittelwert bestimmt. Die relative Quantifizierung der Zielgene erfolgte per Normalisierung und Abgleich der Expressionswerte anhand eines Housekeeping-Gens. In dieser Studie wurde das in unserem Labor etablierte Housekeeping-Gen Peptidylprolyl Isoomerase A (*Ppia*) verwendet. Vorteil dieses Gens ist seine unabhängige und konstante Expression im

Zusammenhang mit dem in dieser Studie durchgeführtem SHT. *Ppia* wurde für jede Probe respektive jedes Mausgehirn bestimmt. Gemeinsam mit den doppelt angelegten Proben, drei positiv und drei Negativkontrollen wurde *Ppia* auf eine 96-well-Platte pipettiert und im Light Cycler gemessen.

Für dieses Experiment wurden die folgenden Gene untersucht: *Aif1*, *Gfap*, *Il6*, *Il1β*, *Serpine1*, *Tnfa*, *Fcgr1*, *Plau*, *Plat*, *Hck*, *Cd68*, *Mmp9*, *Mpo*, *Lcn2* und *Ppia*.

Für den Probenansatz wurden wie nachfolgend aufgelistet die gewonnene cDNA, spezifische Primer und ein Mastermix verwendet. Der Mastermix setzt sich aus Pufferlösung, Nukleotiden, einer hitzestabilen Polymerase, sowie dem interkalierenden Farbstoff (SYBR Green I) zusammen.

**Tabelle 2: Pipettierschema für die quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion**

<b>SYBR-Green</b>	<b>Hybridisierungssonde</b>
5 µl SYBR-Green	5 µl Kit-spezifischer Mastermix
0,25 µl Primer F bzw. S	0,25 µl Primer F bzw. S
0,25 µl Primer R bzw. A	0,25 µl Primer R bzw. A
3,5 µl H <sub>2</sub> O	0,5 µl FL-Sonde
1 µl Target DNA	0,5 µl Cy5-Sonde
	2,5 µl H <sub>2</sub> O
	1 µl Target DNA

### 3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme und Graphiken wurde die Software GraphPad Prism (Version 9, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Datensortierung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Zu Beginn der Auswertung wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt. In den graphischen Darstellungen der Ergebnisse ist das Signifikanzniveau wie folgt markiert:

**Tabelle 3: Signifikanzniveaus**

<b>p &lt; 0,05</b>	*
<b>p &lt; 0,01</b>	**
<b>p &lt; 0,001</b>	***
<b>p &lt; 0,0001</b>	****

Ergibt die Analyse keine Signifikanz, jedoch einen p-Wert  $< 0,1$ , so wird von einem statistischen Trend gesprochen.

Die Daten wurden, sofern nicht anders aufgeführt, nach folgendem Ablauf ausgewertet:

- 1) Die Daten werden mithilfe des Rout-Tests auf Ausreißer untersucht und gefundene Ausreißer exkludiert. Für jeden durchgeführten Test wird aufgrund dessen individuell die Anzahl der ausgewerteten Daten (n) angegeben.
- 2) Es erfolgt die Untersuchung auf Normalverteilung der verbliebenen Werte durch den Shapiro-Wilk-Test.
- 3) Bei vorliegenden parametrischen Datensätze erfolgt für den Vergleich der beiden Genotypen zum selben Zeitpunkt die Analyse mit dem ungepaarten, zweiseitigen „Student´s-unpaired-t-Test“. Nicht parametrisch verteilte Datensätze werden für den Vergleich der Genotypen eines gemeinsamen Zeitpunktes durch den „Mann-Whitney-U-Test“ ausgewertet.
- 4) Für den Vergleich zwischen präoperativen und postoperativen Werten ein und derselben Studiengruppe wurde bei parametrischer Datenverteilung ein „paired-t-Test“ und für eine nicht parametrische Datenverteilung der „Wilcoxon-signed-rank-Test“ angewendet.

Die graphische Darstellung der Datensätze erfolgt in Form von Säulendiagrammen mit Rauten und Kreisen, jeweils den Mittelwert (MW) eines Individualtier plus/minus

(+/-) und Standardfehler (SEM = standard error of the mean) präsentierend. Für eine bessere Lesbarkeit wird bei großen Zahlen ein Tausenderpunkt verwendet.

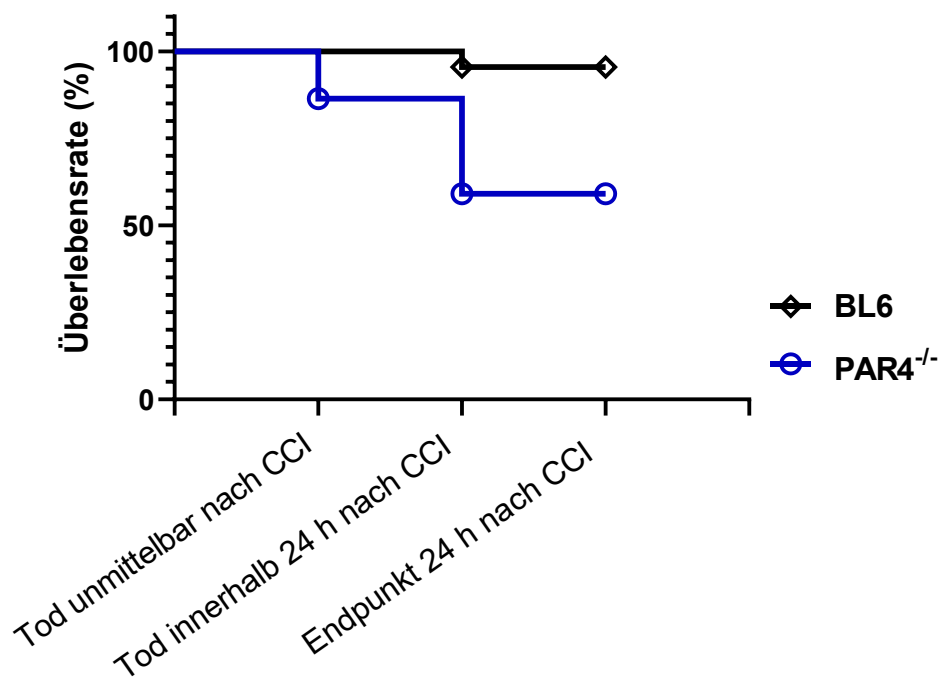
## **4 Ergebnisse**

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Vergleich zwischen der BL6- und der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe.

Für die BL6-Gruppe als auch für die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe waren je 22 Versuchstiere geplant. Aufgrund frühzeitigen Versterbens vor Ende des Beobachtungszeitraums können insgesamt zehn Tiere nicht in die endgültige Auswertung miteingeschlossen werden. In der BL6-Gruppe ist ein Versuchstier, in der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe neun Versuchstiere vorzeitig verstorben bzw. mussten im Rahmen der Abbruchkriterien euthanasiert werden (beides jedoch jeweils nach erfolgtem CCI). Somit werden für die BL6-Gruppe insgesamt 21 und für die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe insgesamt 13 Tiere ausgewertet. Werden andere als die hier aufgeführten Stichprobengrößen verwendet, wird dies explizit erwähnt.

#### 4.1 Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Die Kaplan-Meier-Analyse ist ein gängiges Verfahren, um die Überlebenszeiten- und Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Tiere innerhalb der Studie zu beschreiben. Durch Anwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens wird die Überlebenswahrscheinlichkeit berechnet und durch die Kaplan-Meier-Überlebenskurve graphisch dargestellt (207, 208, 209).



#### Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Die Graphik zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve beider Studiengruppen. BL6 n = 22, PAR4<sup>-/-</sup> n = 22. Unterschieden werden drei Todeszeitpunkte: 1. Eintreten des Todes unmittelbar nach Controlled Cortical Impact (CCI), 2. Eintreten des Todes innerhalb der 24 h nach CCI, 3. Eintreten des Todes am Endpunkt der Studie 24 h nach CCI.

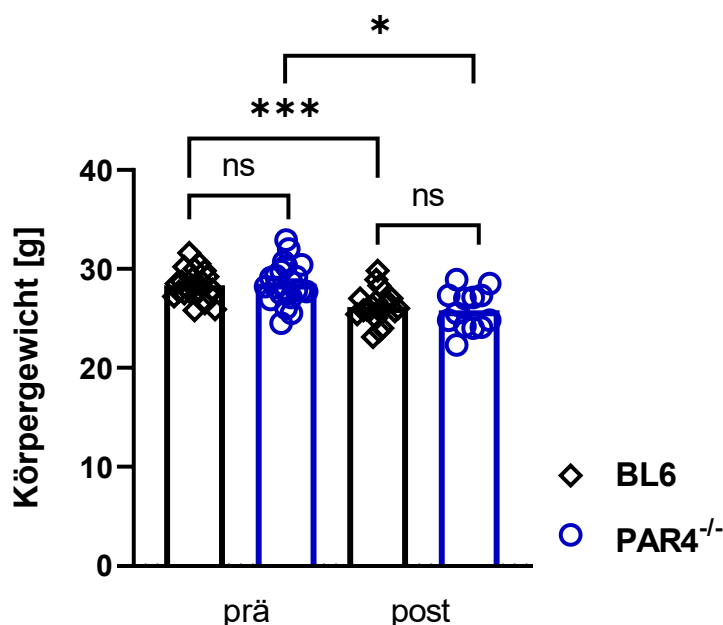
Die Überlebenswahrscheinlichkeit der PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere war im Vergleich zu den BL6-Tieren stark vermindert. Insgesamt betrug die Überlebenswahrscheinlichkeit am Endpunkt der Studie für die BL6-Gruppe 95,5 %, während sie für die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe bei 59,1 % lag. Unmittelbar nach CCI belief sich die Überlebenswahrscheinlichkeit für die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere auf 86,4 %. Die Mortalität der gleichnamigen Gruppe betrug am Studienendpunkt 41 %.

## 4.2 Körpergewicht und Verhaltensuntersuchungen

### 4.2.1 Körpergewicht

Die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht können als Indikator für den Allgemeinzustand der Tiere herangezogen werden. Gesunde Tiere zeigen eine physiologische Nahrungsaufnahme, was sich in einem konstanten Körpergewicht oder einer Zunahme des Körpergewichts widerspiegelt. Im Gegensatz dazu können erkrankte Tiere durch eine pathologische Nahrungsaufnahme respektive eines Gewichtsverlusts auffallen.

Die Erhebung des Körpergewichts erfolgte ein Tag präoperativ (prä) und am ersten Tag postoperativ (post).

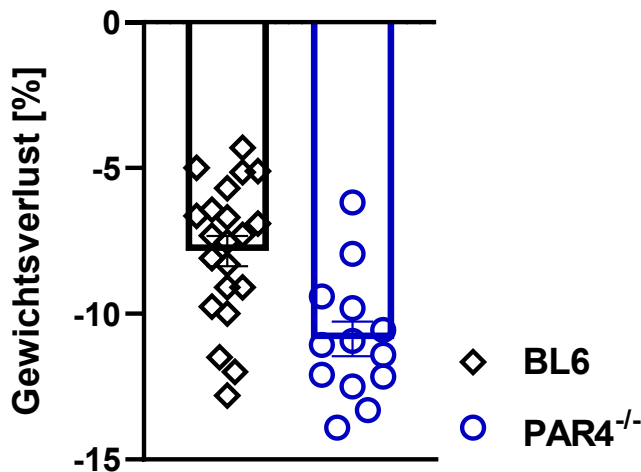


**Abbildung 15: Vergleich präoperatives und postoperatives Körpergewicht**

Das Säulendiagramm zeigt das präoperative (prä) Körpergewicht der Mäuse und das postoperative (post) Gewicht respektive 24 Stunden nach Schädel-Hirn-Trauma in Gramm (g). BL6 (prä) n = 22, PAR4<sup>-/-</sup> (prä) n = 22. BL6 (post) n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> (prä) n = 13. Es wird das individuelle Körpergewicht der Tiere sowie der MW +/- SEM dargestellt. Paired-t-Test, Student's-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Präoperativ lag das Körpergewicht der BL6-Tiere im Mittel bei 28,34 g ± 0,312 g, das Körpergewicht der PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere bei 28,51 g ± 0,431 g. Hier konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden (p = 0,747). Ebenso bestand in der postoperativen Analyse des Körpergewichts kein signifikanter Unterschied zwischen der BL6-Gruppe (MW 26,14 g ± 0,345 g) und der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe (MW 25,83 g ± 0,552 g, p = 0,616).

Im Vergleich zwischen präoperativem und postoperativem Körpergewicht konnte sowohl in der BL6-Gruppe als auch der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (BL6 prä vs. BL6 post  $p = 0,001$ , PAR4<sup>-/-</sup> prä vs. PAR4<sup>-/-</sup> post  $p = 0,023$ ).



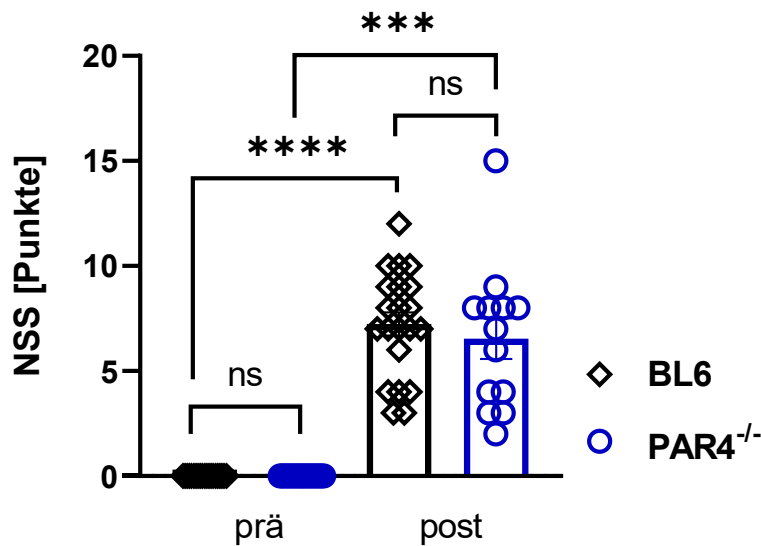
**Abbildung 16: Postoperativer Gewichtsverlust in Prozent**

Das Säulendiagramm zeigt den Gewichtsverlust zwischen dem präoperativ und postoperativ erhobenen Körpergewicht in Prozent (%). BL6  $n = 21$ , PAR4<sup>-/-</sup>  $n = 13$ . Es wird die Differenz des Körpergewichts in % der einzelnen Tiere sowie der MW  $\pm$  SEM dargestellt. Student's-unpaired-t-Test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns = nicht signifikant.

Bei der Analyse des Gewichtsverlusts von präoperativem zu postoperativem Körpergewicht in % fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen ( $p = 0,001$ ). Der mittlere Gewichtsverlust betrug für die BL6-Gruppe  $-7,844 \pm 0,519$  % und für die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe  $-10,87 \pm 0,595$  %.

## 4.2.2 NSS

Der NSS dient zur Evaluation der neuromotorischen Fähigkeiten und deren Defizite. Durch Erhebung des NSS sowohl präoperativ als auch postoperativ lassen sich Rückschlüsse auf den Einfluss des CCI auf die neuromotorischen Fähigkeiten der beiden Studiengruppen ziehen. Die Tiere können hierbei eine Punktzahl zwischen 0 und 16 Punkten erreichen, 0 entspricht keinem vorhanden neuromotorischen Defizit und 16 dem maximal erreichbaren neuromotorischen Defizit. Die Erfassung der Daten erfolgte zu denselben Zeitpunkten wie die Erhebung des Körpergewichts.



**Abbildung 17: Ergebnisse des Neurological Severity Score**

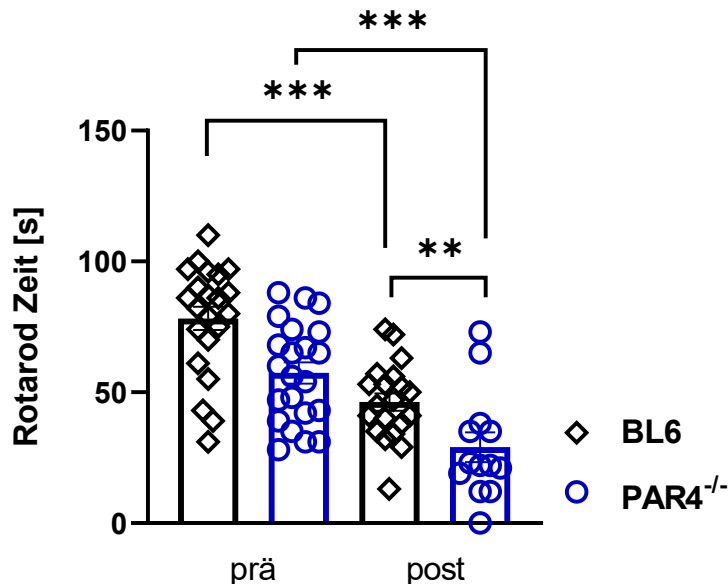
Das Säulendiagramm stellt den Neurological Severity Score (NSS) im Vergleich zwischen den Studiengruppen präoperativ (prä) als auch postoperativ (post) sowie den Vergleich innerhalb der Studiengruppen prä- und postoperativ in Punkten dar. Durch den Rout-Test wurden vier Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen: BL6 (prä) n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> (prä) n = 19, BL6 (post) n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> (post) n = 13. Es wird die Anzahl der erreichten Punkte der Tiere sowie der MW  $\pm$  SEM dargestellt. Wilcoxon-signed-rank-Test, Student's-unpaired-t-Test, Mann-Whitney-U-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

In der präoperativen Erhebung des NSS erreichten die Tiere beider Studiengruppen übergreifend maximal eine Punktzahl von 1 ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p > 0,999). Postoperativ lag der Mittelwert des NSS der BL6-Tiere bei  $7,238 \pm 0,547$ , bei den PAR4<sup>-/-</sup>-Tieren bei  $6,538 \pm 0,965$ . Der NSS war nach CCI in beiden Studiengruppen signifikant höher im Vergleich zur präoperativ erhobenen Punktzahl (BL6 p < 0,0001, PAR4<sup>-/-</sup> p = 0,001). Die Auswertung der postoperativen Scores ergab keinen signifikanten Unterschied der Studiengruppen (p = 0,501).

## 4.2.3 RR-Test

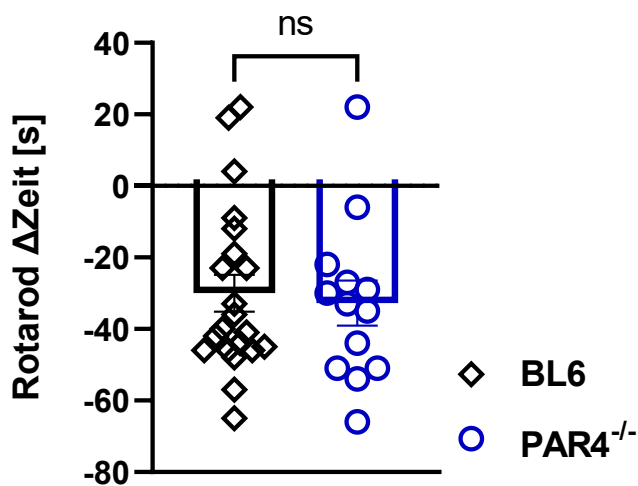
Der RR-Test ist ein etabliertes Messinstrument, um die motorische Koordinationsfähigkeit, die Lernfähigkeit und die Ausdauer der Tiere zu erfassen. Es wird die Verweildauer der Tiere in s auf dem Zylinder gemessen (210, 211, 212).

Für die Auswertung wurden standardisiert jeweils die besten Werte des präoperativen und postoperativen Tages verwendet.

**Abbildung 18: Ergebnisse Rotarod**

Das Säulendiagramm zeigt die Gegenüberstellung der erreichten Werte im Rotarod beider Studiengruppen präoperativ (prä) und postoperativ (post). Durch den Rout-Test wurde ein Ausreißer detektiert und exkludiert. BL6 (prä) n = 22, PAR4<sup>-/-</sup> (prä) n = 22, BL6 (post) n = 20, PAR4<sup>-/-</sup> (post) n = 13. Es werden die gemessenen Sekunden mit MW +/- SEM dargestellt. Paired-t-Test, Student's-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Präoperativ erreichten die BL6-Tiere im Mittel eine Dauer von  $78,23 \pm 4,457$  s auf dem Rotameter. Für die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere wurde ein Mittelwert von  $57,41 \pm 4,036$  s erhoben. Auffällig war, dass bereits präoperativ ein signifikanter Unterschied zwischen BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Tieren im RR-Test bestand ( $p = 0,001$ ). In der postoperativen Analyse erreichten die BL6-Tiere im Durchschnitt einen Wert von  $46,25 \pm 3,289$  s und die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere von  $29,00 \pm 5,719$  s. Der bereits präoperativ bestehende signifikante Unterschied blieb auch postoperativ bestehen ( $p = 0,009$ ).



**Abbildung 19: Differenz Rotarodwerte präoperativ vs. postoperativ**

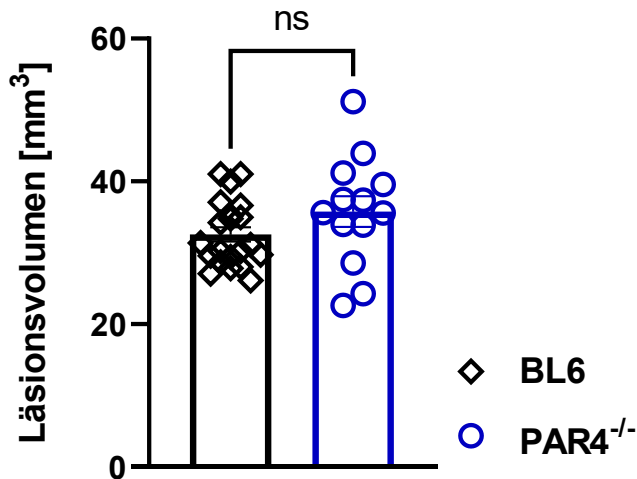
Das Säulendiagramm zeigt die Differenz zwischen den präoperativ und postoperativ erhobenen Zeitwerten im Rotarod für die BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe. BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Es wird die Differenz gemessen in Sekunden mit MW +/- SEM dargestellt. Mann-Whitney-U-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Aufgrund des bereits präoperativen signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Studiengruppen, wurde die Differenz der erreichten präoperativen und postoperativen Zeiten auf dem Rotameter analysiert. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p = 0,841). Die Zeitdifferenz belief sich in der BL6-Gruppe auf  $30,00 \pm 5,146$  s und in der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe auf  $32,77 \pm 6,324$  s.

### 4.3 Histologische Untersuchungen

#### 4.3.1 Auswertung des Läsionsvolumen

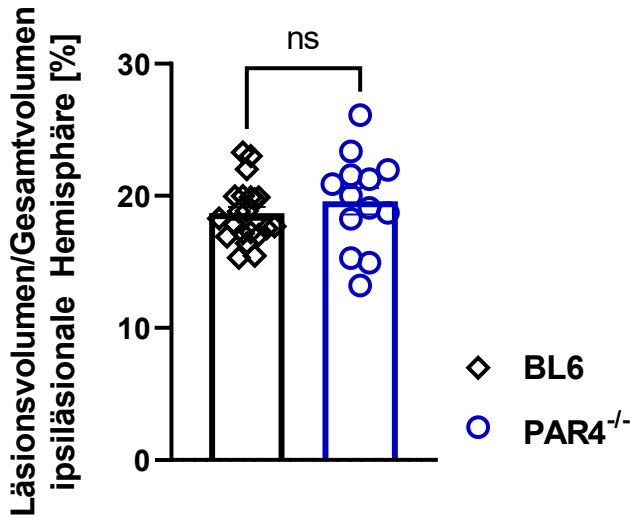
Zur Quantifizierung des histopathologischen Hirnschadens werden die mittels Kresylviolett angefärbte Hirnschnitte (s. Abbildung 23) mikroskopisch vermessen. Es wurde das absolute Läsionsvolumen sowie das Verhältnis des Läsionsvolumens zur ipsi- und kontraläsionalen Hemisphäre der beiden Gruppen erfasst und verglichen.



**Abbildung 20: Absolutes Läsionsvolumen**

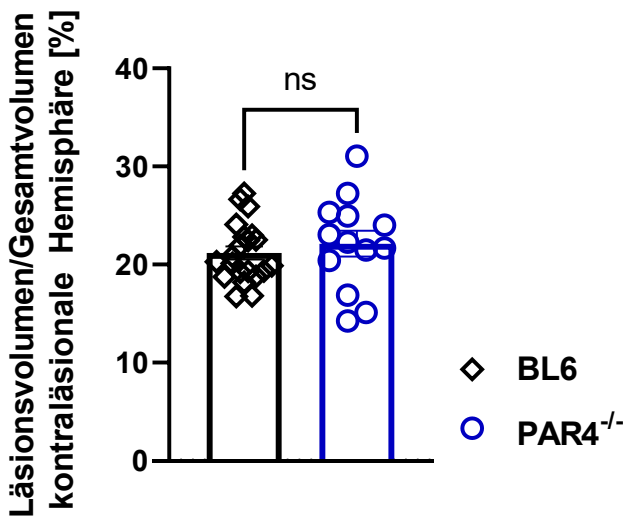
Das Säulendiagramm zeigt das absolute Läsionsvolumen der BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe in Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Es ist das Läsionsvolumen mit MW +/- SEM dargestellt. Student's-unpaired-T-test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied des Läsionsvolumens zwischen der BL6-Gruppe und der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe feststellen (p = 0,138). Der Mittelwert lag für die BL6-Gruppe bei 32,58 ± 1,007 mm<sup>3</sup> und für die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe bei 35,78 ± 2,141 mm<sup>3</sup>.



**Abbildung 21: Läsionsvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der ipsiläsionalen Hemisphäre**

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis des Läsionsvolumens zum Gesamtvolumen der ipsiläsionalen Hemisphäre in Prozent (%). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Student´s-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

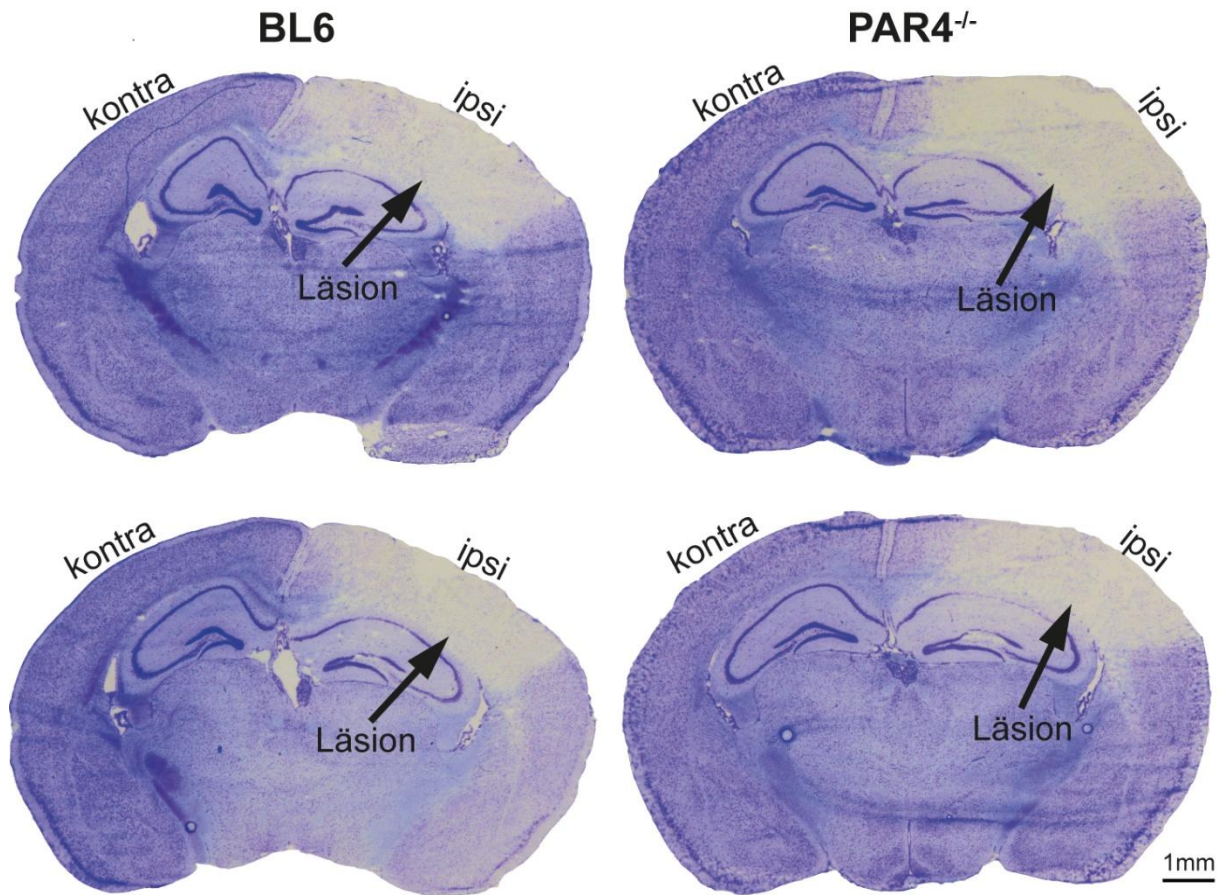


**Abbildung 22: Läsionsvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der kontraläsionalen Hemisphäre**

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis des Läsionsvolumens zum Gesamtvolumen der kontraläsionalen Hemisphäre in Prozent (%). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Student´s-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Neben der Analyse des absoluten Läsionsvolumen ergaben auch die Auswertungen des Läsionsvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der ipsiläsionalen und

kontraläsionalen Hemisphäre keinen signifikanten Unterschied (Läsionsvolumen % ipsiläsional BL6: MW  $18,68 \pm 0,485$  %; Läsionsvolumen % ipsiläsional PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $19,59 \pm 3,585$  %,  $p = 0,367$ ; Läsionsvolumen % kontraläsional BL6: MW  $21,18 \pm 0,658$  %, Läsionsvolumen % kontraläsional PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $22,13 \pm 1,318$  %,  $p = 0,480$ ).

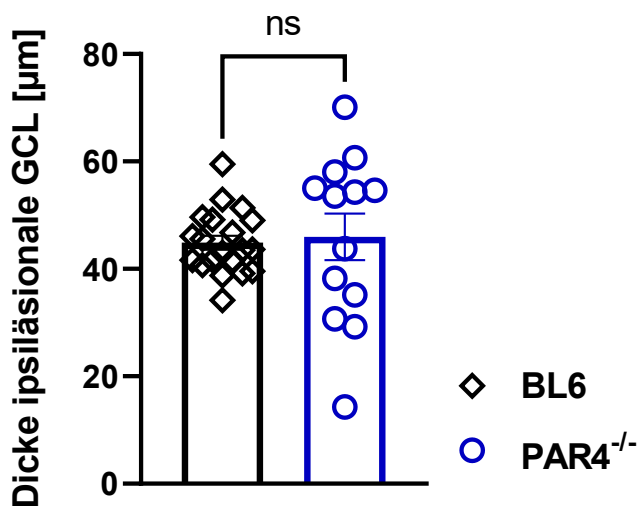


**Abbildung 23: Mikroskopie-Bilder der Kresylviolettffärbung**

Es werden exemplarische Schnitte der Kresylviolettffärbung der Schnittebenen 11 (oben) und 12 (unten) gezeigt.

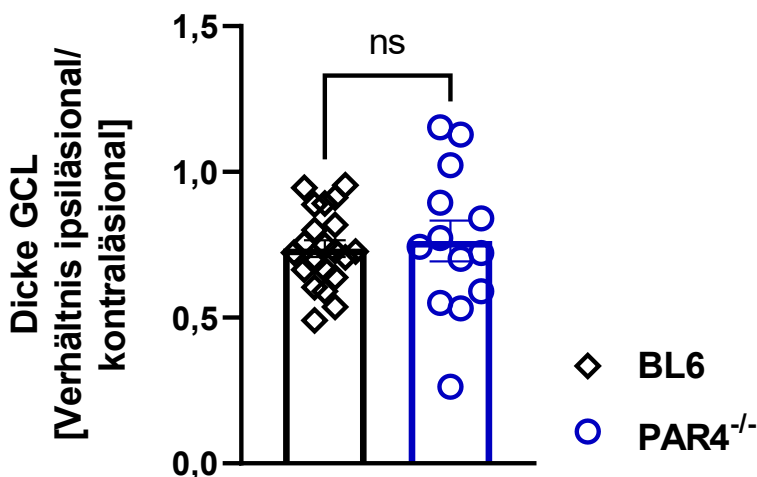
#### 4.3.2 Auswertung der Körnerzellbandmessung

Als zusätzliche Quantifizierung des entstandenen Schadens nach SHT diente die Bestimmung der Dicke der GCL (s. Abbildung 26). Neben der Analyse der Dicke der ipsiläsionalen GCL wurde zudem das Verhältnis der Dicke der ipsiläsionalen zur kontraläsionalen Hemisphäre ausgewertet (s. Abschnitt 3.6.4.). Je dünner die ipsiläsionale GCL, desto größer der Quotient und desto stärker die Affektion durch das SHT.



**Abbildung 24: Dicke des ipsiläsionalen Körnerzellbandes**

Das Säulendiagramm zeigt den Vergleich der Dicke der ipsiläsionalen „granular cell layer“ (GCL) in Mikrometern ( $\mu\text{m}$ ). Ein Ausreißer wurde durch den Rout-Test identifiziert und exkludiert. BL6  $n = 20$ , PAR4<sup>-/-</sup>  $n = 13$ . Die Darstellung erfolgt als MW  $\pm$  SEM. Student's-unpaired-t-Test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns = nicht signifikant.

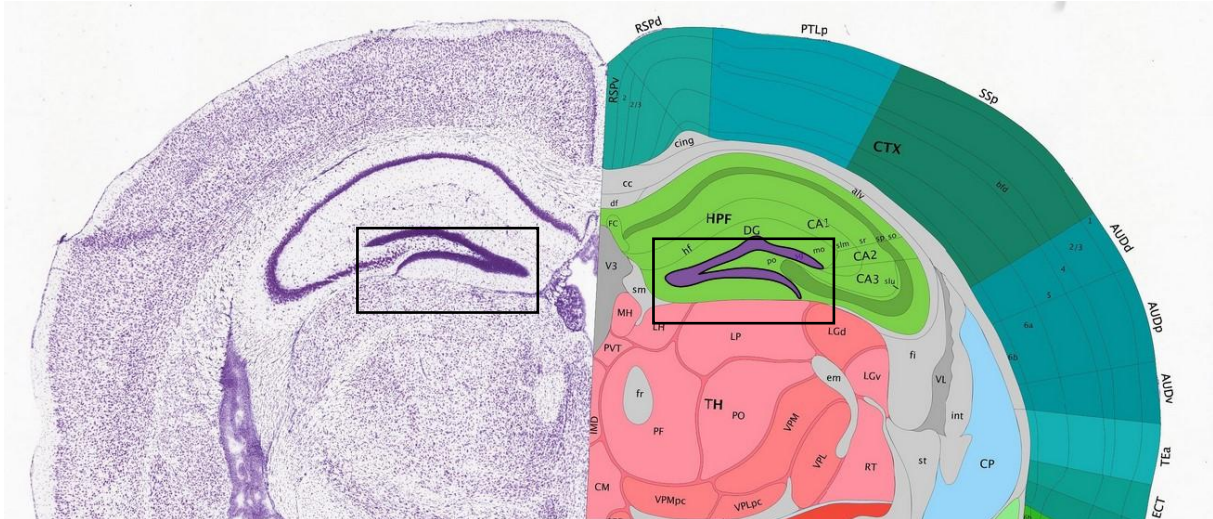


**Abbildung 25: Verhältnis der Dicke der GCL zwischen ipsiläsionaler und kontraläsionaler Hemisphäre**

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis der Dicke der ipsiläsionalen „granular cell layer“ (GCL) zur kontraläsionalen GCL. BL6  $n = 21$ , PAR4<sup>-/-</sup>  $n = 13$ . Die Darstellung erfolgt als MW  $\pm$  SEM. Student's-unpaired-t-Test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns = nicht signifikant.

Abbildung 24 zeigt, dass die Auswertung für die Dicke der ipsiläsionalen GCL keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen ergab ( $p = 0,773$ ). Die mittlere Dicke betrug bei den BL6-Tieren  $44,87 \pm 1,309 \mu\text{m}$  und bei den PAR4<sup>-/-</sup>-Tieren  $45,99 \pm 4,329 \mu\text{m}$ . Überdies ließ sich für das Verhältnis der Dicke der GCL kein signifikanter

Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen ( $p = 0,700$ ). Das Verhältnis lag im Mittel für die BL6-Tiere bei  $0,737 \pm 0,029$  und für die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere bei  $0,763 \pm 0,070$ . Dementsprechend weist die PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe keinen erhöhten Zellverlust im Bereich der GCL auf. Eine PAR4-Defizienz hat folglich im Gesamten keinen Einfluss auf die hier gemessenen Läsionsparameter.

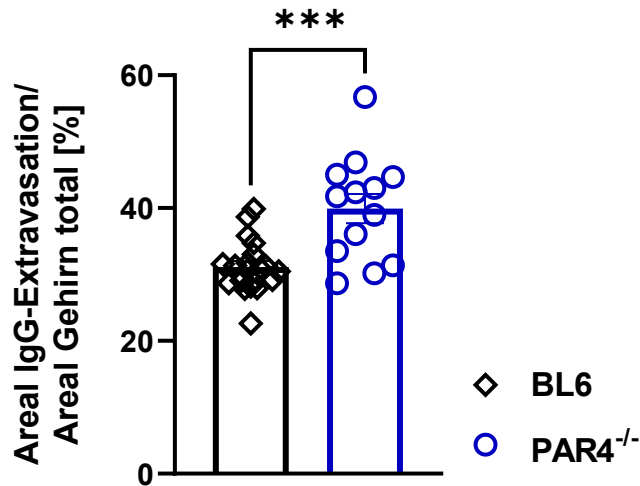


**Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der granular cell layer (GCL) in koronarer Schnittführung**

In der linken Bildhälfte ist die GCL in einer Kresylviolettgefärbung zu sehen (linkes schwarzes Rechteck). In der rechten Bildhälfte ist die GCL schematisch im Mausatlas dargestellt (rechtes schwarzes Rechteck) (Allen Mouse Brain Atlas, [mouse.brain-map.org](http://mouse.brain-map.org) und [atlas.brain-map.org](http://atlas.brain-map.org), Abruf 18.02.2025 um 19:00 Uhr).

### 4.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf IgG

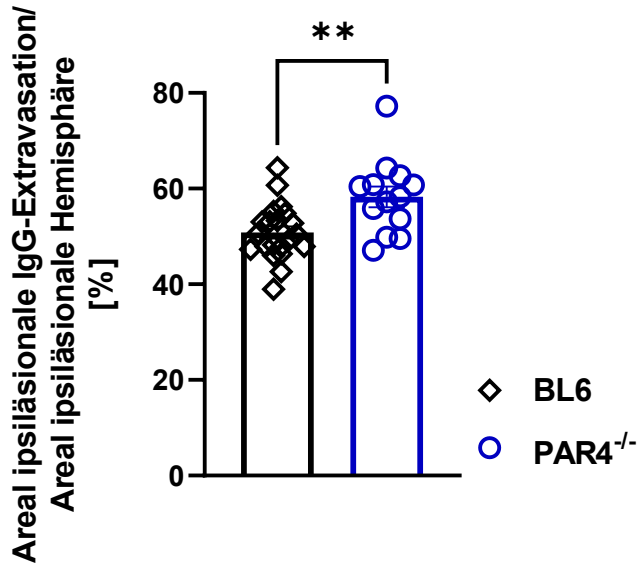
Durch Bestimmung des mit IgG immunhistochemisch angefärbten Areal der Hirnschnitte kann indirekt auf eine Schädigung der BHS geschlossen werden. Die intakte BHS ist nicht durchlässig für IgG. Nach (induziertem) SHT kann jedoch die Integrität der BHS gestört sein, resultierend und erkennbar in einer IgG-Extravasation (213, 214, 215).



**Abbildung 27: Areal Immunglobulin G (IgG)-Extravasation im Verhältnis zum totalen Gehirnaven**

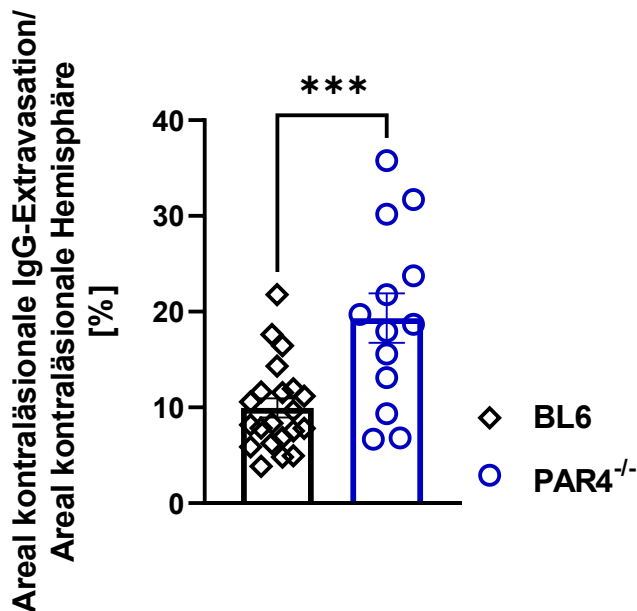
Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis der im Gesamten gemessenen IgG-Fläche zur Gesamtfläche des Gehirns in Prozent (%). Ein Ausreißer wurde durch den Rout-Test identifiziert und exkludiert. BL6 n = 20, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Student's-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere präsentierten im Vergleich zu den BL6-Tieren ein signifikant größeres Extravasationsareal beider Hemisphären (p = 0,001). Die mittlere Extravasationsfläche des gesamten Gehirns lag für die BL6-Tiere bei 31,13 ± 0,880 % und für die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere bei 39,94 ± 2,192 %.



**Abbildung 28: Areal Immunglobulin G (IgG)-Extravasation ipsiläsional im Verhältnis zur ipsiläsionalen Hemisphäre**

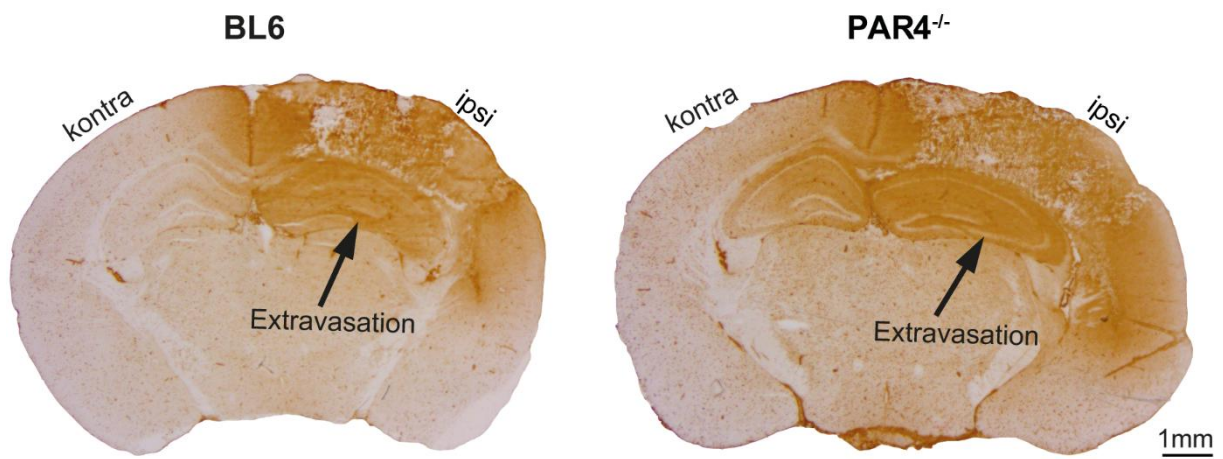
Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis des IgG-Areals der ipsiläsionalen Hemisphäre zur Gesamtfläche der ipsiläsionalen Hemisphäre in Prozent (%). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Student's-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.



**Abbildung 29: Areal Immunglobulin G (IgG)-Extravasation kontraläsional im Verhältnis zur kontraläsionalen Hemisphäre**

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis des IgG-Areals der kontraläsionalen Hemisphäre zur Gesamtfläche der kontraläsionalen Hemisphäre in Prozent (%). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Student's-unpaired-t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

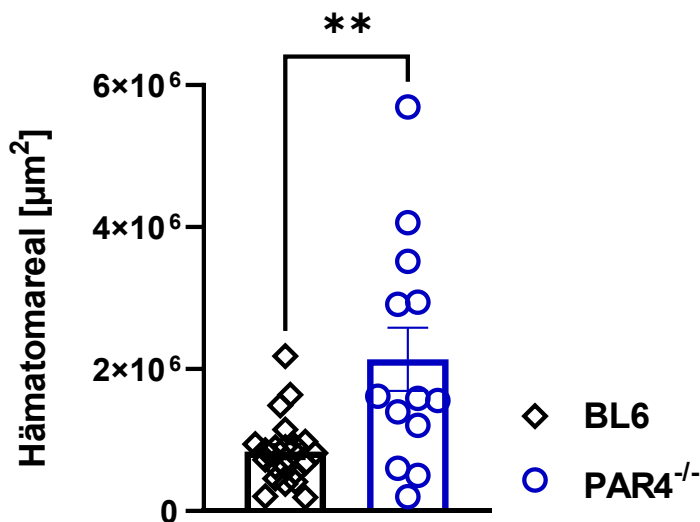
Dieses Resultat wurde durch einen signifikanten Unterschied der durch IgG angefärbten Flächen jeweils in Relation zur ipsiläsionalen und kontraläsionalen Hemisphäre zwischen den Studiengruppen bestärkt (IgG% ipsiläsional BL6: MW 50,82 ± 1,257 %; IgG% ipsiläsional PAR4<sup>-/-</sup>: MW 58,28 ± 2,169 %, p = 0,003; IgG% kontraläsional BL6: MW 9,953 ± 1,001 %, IgG% kontraläsional PAR4<sup>-/-</sup>: MW 19,32 ± 2,581 %, p = 0,0004). Folglich wird durch eine PAR4-Defizienz die BHS in ihrer Funktion stark beeinträchtigt, da auch die kontraläsionale Hemisphäre von der IgG-Extravasation betroffen ist.



**Abbildung 30: Mikroskopie-Bilder der Immunglobulin-G (IgG)-Immunohistochemiefärbung**  
Es werden exemplarische Schnitte der IgG-Immunohistochemiefärbung der Schnittebene 12 gezeigt.

#### 4.3.4 Auswertung der HE-Färbung

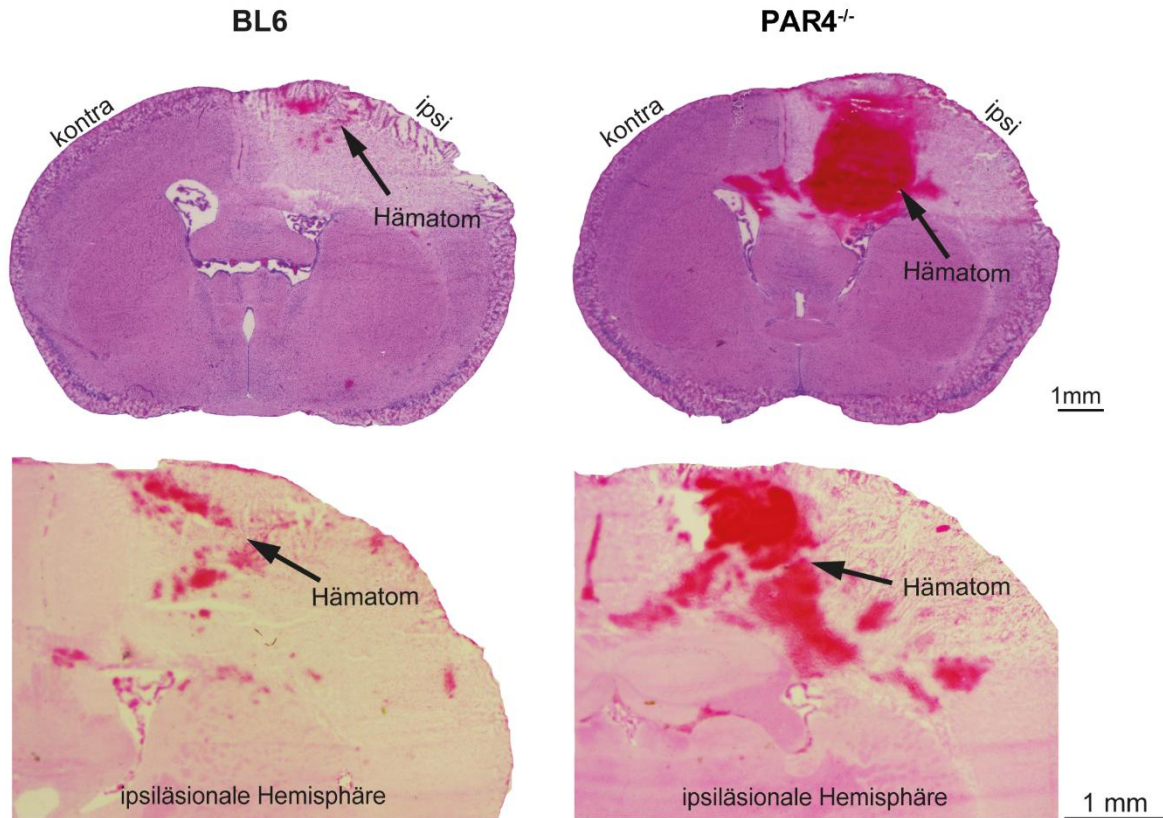
Die HE-Färbung dient der Detektion von Hämatomarealen. Da der PAR4 eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung spielt, ist die Auswertung von Hämatomarealen bei dieser Studie von besonderem Interesse. Für die Analyse der Hämatomareale werden die ermittelten Mittelwerte aus den Schnittebenen 7, 8, 9 und 10 verwendet.



**Abbildung 31: Ergebnis Hämatomareal**

Das Säulendiagramm zeigt die Größe des Hämatomareals in Quadratmikrometer ( $\mu\text{m}^2$ ). BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die Darstellung erfolgt als MW +/- SEM. Mann-Whitney-U-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Für die BL6-Tiere lag die Größe des Hämatomareals im Mittel bei  $838.113 \pm 104.399 \mu\text{m}^2$ . Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert für die PAR4<sup>-/-</sup>-Tiere  $2.137.786 \pm 442.871 \mu\text{m}^2$  und war somit signifikant größer (p = 0,008). Dies deutet auf einen relevanten Einfluss von PAR4 auf die Blutgerinnung nach SHT hin.

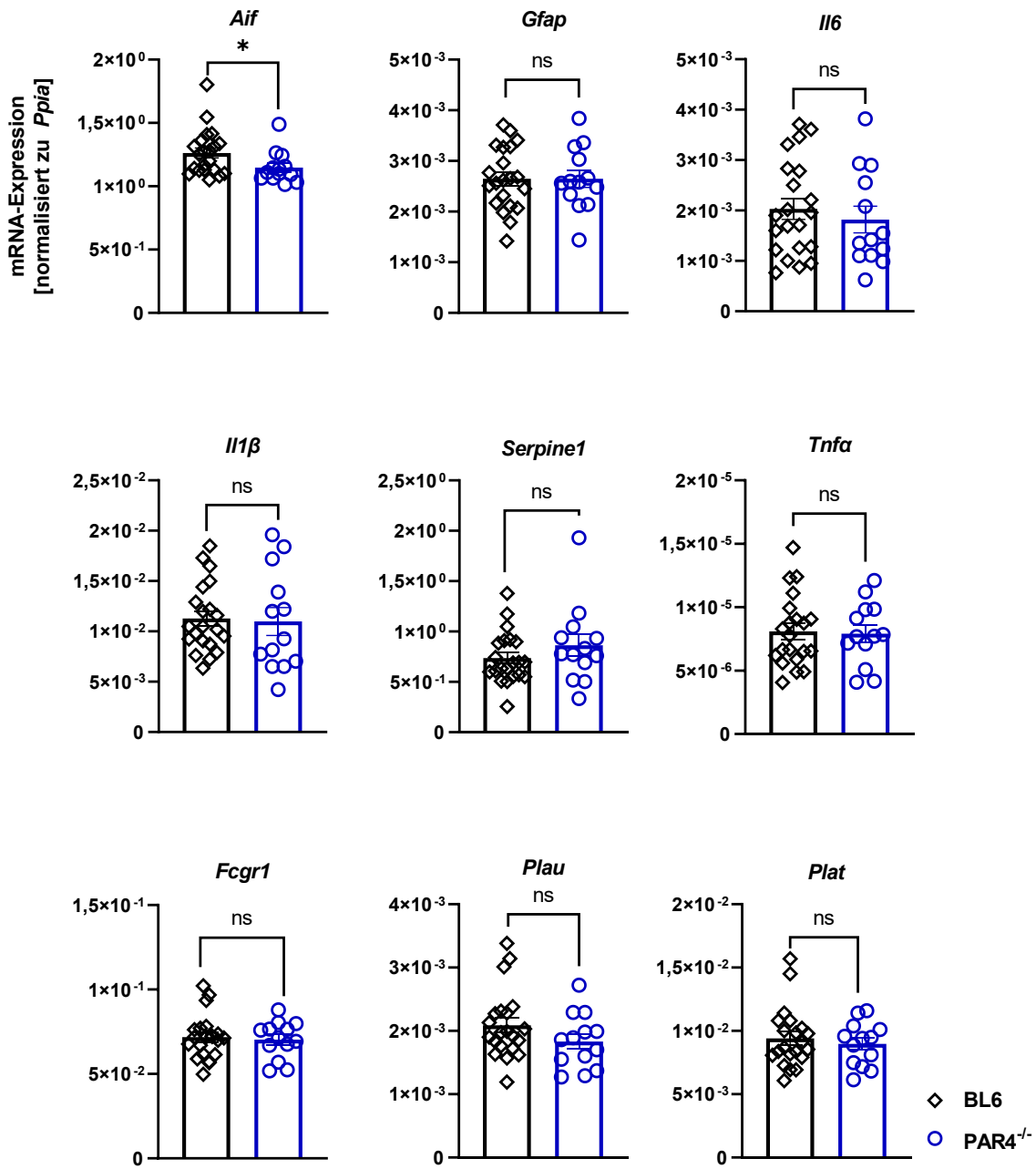


**Abbildung 32: Mikroskopie-Bilder der Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung**

Es werden exemplarische Schnitte der HE-Färbung des gesamten Gehirns (oben) der Schnittebene 9 sowie der ipsiläsionalen Hemisphäre (unten) der Schnittebene 10 gezeigt.

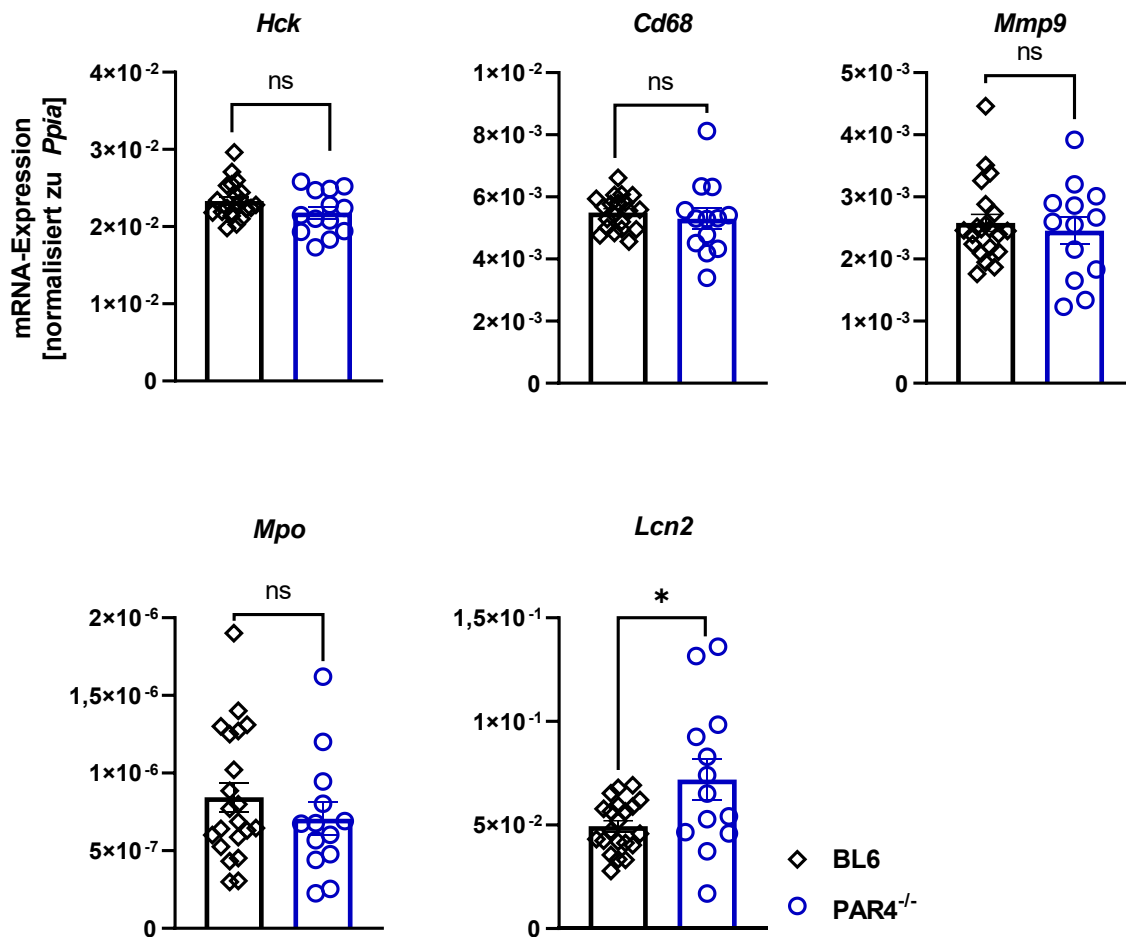
#### 4.4 Auswertung der qRT-PCR

Durch Anwendung der qRT-PCR kann auf die zum Zeitpunkt des Todes vorliegende mRNA im Hirngewebe rückgeschlossen werden. Zur Durchführung der Analyse wurden die Trimmchnitte der rechten Hemisphäre der BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe miteinander verglichen. Der mRNA-Gehalt wurde zur Expression des housekeeping-Gens *Ppia* normalisiert. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Verhältnis der Expression des untersuchten Gens zu dem *Ppia*-Gen. Die Analyse der mRNA-Proben fokussiert sich auf Gene, welche in der frühen Phase der Hirnschädigung hochreguliert sein können.



**Abbildung 33: Quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)-Ergebnisse [1]**

Die Säulendiagramme zeigen die Ergebnisse der qRT-PCR. Für alle untersuchten Gene gilt: BL6 n = 21, *PAR4*<sup>-/-</sup> n = 13. Die mRNA-Expression ist im Verhältnis zum Zielgen *Ppia* normalisiert und mit MW +/- SEM dargestellt. Student's-unpaired-t-Test, Mann-Whitney-U-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.



**Abbildung 34: Quantitative Real-Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)-Ergebnisse [2]**

Die Säulendiagramme zeigen die Ergebnisse der qRT-PCR. Für alle untersuchten Gene bis auf *Cd68* gilt: BL6 n = 21, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Für *Cd68* wurde durch den Rout-Test ein Ausreißer detektiert und exkludiert, es gilt: BL6 n = 20, PAR4<sup>-/-</sup> n = 13. Die mRNA-Expression ist im Verhältnis zum Zielgen *Ppia* normalisiert und mit MW  $\pm$  SEM dargestellt. Student's-unpaired-t-Test, Mann-Whitney-U-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

#### 4.4.1.1 *Iba1*

Das ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1 (*Iba1*, auch *Aif1* genannt) ist ein etablierter Mikroglia-Aktivierungsmarker. Nach Ischämien oder bei neurodegenerativen Erkrankungen nimmt z.B. die *Iba1*-Expression in Mikroglia zu, daher kann *Iba1* auch zur Untersuchung der Mikrogliaaktivität nach SHT sehr gut herangezogen werden (216, 217). Interessanterweise war die Expression für *Iba1* und somit die Mikrogliaaktivität in den BL6-Mäusen signifikant höher als in den PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen (BL6: MW  $1,263 \pm 3,943 \times 10^{-2}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $1,147 \pm 3,515 \times 10^{-2}$ , p = 0,0271).

#### 4.4.1.2 *Gfap*

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Astrozytenmarker, der Auskunft über die astrogliale Aktivierung sowie den Astrozytenschaden geben kann. Nach SHT kann GFAP sowohl histologisch als auch im Blut nachgewiesen werden (218, 219, 220). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Regulierung des *Gfap*-Gens zwischen den beiden Gruppen (BL6: MW  $2,65 \times 10^{-3} \pm 1,351 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $2,648 \times 10^{-3} \pm 1,719 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0,996$ ).

#### 4.4.1.3 *IL6*

Interleukin-6 (IL-6) gehört zu den Zytokinen und besitzt sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften (221). Nach CCI steigt die Konzentration von IL-6 innerhalb von Stunden im Hirngewebe an (222). IL-6 wird vor allem durch aktivierte Mikroglia und Astrozyten sowie Makrophagen sezerniert, wodurch die lokale Inflamationsreaktion verstärkt wird (223, 224). In der Analyse der mRNA-Expression konnte kein signifikanter Unterschied zwischen BL6- und PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden (BL6: MW  $2,031 \times 10^{-3} \pm 2,061 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $1,82 \times 10^{-3} \pm 2,648 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0,533$ ).

#### 4.4.1.4 *IL1 $\beta$*

IL-1 $\beta$  zählt als proinflammatorisches Zytokin zu den Schlüsselmediatoren der Neuroinflammation nach SHT. Es wird von aktivierten Mikroglia, Endothelzellen und Astrozyten produziert. Der frühe Anstieg von IL-1 $\beta$  nach SHT korreliert mit der Aktivierung von Mikroglia und infiltrierenden Immunzellen und ist somit eng mit dem sekundärem Gewebeschaden und dem funktionellem Outcome verknüpft (225, 226, 227). In der Aktivierung von IL-1 $\beta$  nach SHT bestand zwischen den beiden Studiengruppen kein signifikanter Unterschied (BL6: MW  $1,129 \times 10^{-2} \pm 7,434 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $1,098 \times 10^{-2} \pm 1,391 \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,832$ ).

#### 4.4.1.5 *Serpine1*

*Serpine1* kodiert den PAI-1. PAI-1 ist ein Serinprotease-Inhibitor („Serpin“) und der wichtigste Inhibitor von t-PA und u-PA. Er reguliert folglich die Fibrinolyse indem er den plasminvermittelten Abbau von Fibrin vermindert. Im Kontext des experimentellen SHT

stellt *Serpine1* vorrangig einen Marker und Mediator einer Störung des fibrinolytischen Systems und der Mikrothrombose dar (228, 229). In der Regulierung von *Serpine1* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Analyse (BL6:  $MW 7,36 \times 10^{-1} \pm 5,583 \times 10^{-2}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 8,626 \times 10^{-1} \pm 1,095 \times 10^{-1}$ ,  $p = 0,276$ ).

#### 4.4.1.6 *Tnfa*

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches nach SHT rasch im verletzten Hirngewebe ansteigt (230, 231). TNF- $\alpha$  wird im Wesentlichen durch aktivierte Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten produziert und sezerniert und führt in Folge zu einer Erhöhung der Expression weiterer proinflammatorischer Mediatoren und Adhäsionsmoleküle (231, 232, 233). Zusammengefasst stellt TNF- $\alpha$  einen frühen Mediator der Neuroinflammation dar, dessen Ausmaß häufig mit der Verletzungsschwere und der Gliaaktivierung korreliert (231, 232). In der qRT-PCR-Analyse ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (BL6:  $MW 8,096 \times 10^{-6} \pm 6,084 \times 10^{-7}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 7,915 \times 10^{-6} \pm 6,944 \times 10^{-7}$ ,  $p = 0,850$ ).

#### 4.4.1.7 *Fcgr1*

Das *Fcgr1*-Gen ist verantwortlich für die Kodierung des hochaffinen Fc- $\gamma$ -Rezeptors I (Fc $\gamma$ RI, auch CD64). Dieser Rezeptor, der eine hohe Affinität zu IgG aufweist, wird auf Mikroglia, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Unter neuroinflammatorischen Bedingungen, wie sie nach einem SHT auftreten können, kann es zu einer Hochregulierung des Fc $\gamma$ RI kommen, wodurch Mikroglia empfindlicher auf IgG-Komplexe und Autoantikörper reagieren. Die Signale, die durch den Fc $\gamma$ RI moduliert werden, fördern die Phagozytose, die Bildung von ROS und die Freisetzung von Zytokinen. Eine Hochregulierung von Fc $\gamma$ RI kann daher als Teil einer schädlichen proinflammatorischen Aktivierung angesehen werden (234, 235, 236, 237, 238). Die Untersuchung der mRNA-Expression resultierte in keinem signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen (BL6:  $MW 7,182 \times 10^{-2} \pm 2,868 \times 10^{-3}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 7,025 \times 10^{-2} \pm 3,07 \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,723$ ).

#### 4.4.1.8 *Plau*

Das Gen *Plau* kodiert den u-PA. Er fördert als Serinprotease den fibrinolytischen Abbau, in dem er Plasminogen zu Plasmin umwandelt. Zudem veranlasst er den Abbau von Matrixproteinen und spielt eine Rolle in der Zellmigration und -proliferation (239, 240, 241). Im Rahmen des SHT kann eine veränderte *Plau*-Expression im Rahmen einer Modulation der posttraumatischen Fibrinolyse, der Gefäß- und Mikrothrombosierungen sowie des neuroinflammatorischen Remodellings interpretiert werden. Die Hochregulierung von *Plau* nach SHT stellt einen Versuch des Organismus dar Mikrothromben und Fibrinablagerungen im perikontusionalem Gewebe abzubauen und somit eine bessere Perfusion und Reperfusion zu gewährleisten (228, 242). In der Regulierung des *Plau*-Gens konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden (BL6: MW  $2,09 \times 10^{-3} \pm 1,174 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $1,831 \times 10^{-3} \pm 1,196 \times 10^{-4}$ , p = 0,184).

#### 4.4.1.9 *Plat*

*Plat* kodiert eine weitere Serinprotease, den t-PA. Durch Spaltung des inaktiven Plasminogens überführt t-PA Plasminogen in seine aktive Form Plasmin. Damit ist t-PA ein Schlüsselenzym der Fibrinolyse. Eine zu hohe Aktivität hat eine Hyperfibrinolyse und ein erhöhtes Blutungsrisiko zur Folge, eine zu gering ausgeprägte Aktivität eine Hypofibrinolyse mit konsekutiver Thrombose (243, 244, 245). Die Produktion von t-PA erfolgt durch Endothelzellen, Neuronen und Gliazellen (246, 247). Eine erhöhte *Plat*-mRNA kann im Kontext des SHT zum einem als physiologische Reaktion auf Gefäßschäden und Mikrothromben gewertet werden, jedoch kann eine übermäßige Expression zur Destabilisierung der BHS sowie vermehrten Hirnödemen und Blutungen führen (243, 248). In der vorliegenden Studie konnte kein Unterschied in der mRNA-Expression von *Plat* festgestellt werden (BL6: MW  $9,403 \times 10^{-3} \pm 5,157 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $8,969 \times 10^{-3} \pm 4,788 \times 10^{-4}$ , p = 0,841).

#### 4.4.1.10 *Hck*

Die hämatopoetische Zellkinase (HCK) wird durch das *Hck*-Gen kodiert und gehört zur Scr-Familie der nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Ihre primäre Funktion entfaltet sie im angeborenen Immunsystem, indem sie die Phagozytose durch von Monozyten abstammende Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen, reguliert. Die

Aktivierung der Kinase kann durch verschiedene Faktoren wie Lipopolysaccharid, Interleukin-2 und IL-6 erfolgen. Nach ihrer Aktivierung zeigt die HCK proinflammatorische Effekte durch die Modulation der Zellproliferation, -migration und -apoptose (249, 250, 251, 252). Folglich kann eine vermehrte Expression von *Hck* nach SHT auf eine vermehrte inflammatorische Aktivität hindeuten, jedoch demonstrierten die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied (BL6:  $MW 2,33 \times 10^{-2} \pm 5,157 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 2,18 \times 10^{-2} \pm 7,729 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0,103$ ).

#### 4.4.1.11 *Cd68*

*Cd68* ist ein Glykoprotein und gehört zu den Lysosom-assoziierten Membranproteinen. Es stellt einen hochspezifischen Marker für phagozytisch aktivierte Makrophagen, Mikroglia und Monozyten dar (253, 254, 255, 256). Es wird auf der Oberfläche der genannten Zelle exprimiert und bindet apoptotische Zellen, Pathogene und oxidiertes low-density-Lipoprotein (256). Nach SHT kann *Cd68* somit als Marker für aktivierte Mikroglia angesehen werden und korreliert weiterhin mit der Iba1+ Mikroglia/Makrophagen-Infiltration (217). Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse wiesen auf keinen signifikanten Unterschied für die *Cd68*-Expression zwischen beiden Studiengruppen hin (BL6:  $MW 5,498 \times 10^{-3} \pm 1,206 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 5,298 \times 10^{-3} \pm 3,285 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0,514$ ).

#### 4.4.1.12 *Mmp9*

*Mmp9* kodiert die MMP-9. Sie ist in der Lage Komponenten der Extrazellulärmatrix abzubauen oder zu verändern. Typische Substrate der MMP-9 sind Kollagene, Gelatine und Proteoglykane. Durch den Abbau der neurovaskulären Matrix nach SHT können MMPs eine Schädigung der BHS verursachen und zu Hirnödemen, Hämorrhagien als auch glialen und neuronalen Zelluntergängen führen. Eine Hochregulation von *Mmp9* nach SHT kann folglich mit einer Schädigung der BHS sowie neuronalem Zelluntergang assoziiert sein (257, 258). Für die beiden Studiengruppen konnte im Vergleich keine signifikante Regulierung festgestellt werden (BL6 MW:  $2,58 \times 10^{-3} \pm 1,383 \times 10^{-4}$ , PAR4<sup>-/-</sup>:  $MW 2,455 \times 10^{-3} \pm 2,167 \times 10^{-4}$ ,  $p = 0,993$ ).

#### 4.4.1.13 *Mpo*

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein hämehaltiges Oxidationsenzym. Sie wird durch diverse phagozytische Zellen wie Neutrophile, Monozyten oder auch Mikroglia exprimiert und sezerniert (259). In der Forschung wird MPO als Indikator für die Neutrophileninfiltration benutzt (260). Die MPO spielt eine wesentliche Rolle im oxidativen Stress, indem sie die Produktion von ROS und reaktiven Stickstoffspezies fördert. Dadurch beeinflusst sie Signaltransduktionskaskaden, die mit der Polarisierung und Entzündung in Mikroglia und Neutrophilen verbunden sind (261). Der MPO können somit pro-neuroinflammatorische Effekte zugesprochen werden. BL6-Mäuse und PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in ihrer *Mpo*-Expression (BL6: MW  $8,434 \times 10^{-7} \pm 9,158 \times 10^{-8}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $7,059 \times 10^{-7} \pm 1,055 \times 10^{-7}$ ,  $p = 0,344$ ).

#### 4.4.1.14 *Lcn2*

Das *Lcn2*-Gen kodiert ein kleines Protein namens Lipocalin-2 (*Lcn2*). *Lcn2* wird von Neutrophilen nach Infektion bzw. Inflammation freigesetzt und spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort. Es hat bakteriostatische Effekte indem es während der antibakteriellen Immunabwehr den Eisenabbau moduliert. Nach SHT findet eine Hochregulation von *Lcn2* statt. Es wird von Astrozyten und Endothelzellen sezerniert und korreliert mit der Schwere des Hirnschadens. *Lcn2* fungiert als Mediator der Astrozytenantwort im Rahmen des Inflammationsgeschehens, indem es Morphologie, Zellwanderung und Apoptose mitreguliert (262, 263). Die Expression der *Lcn2*-mRNA war in der Analyse für die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant höher als die der BL6-Mäuse (BL6: MW  $4,942 \times 10^{-2} \pm 2,675 \times 10^{-3}$ , PAR4<sup>-/-</sup>: MW  $7,19 \times 10^{-2} \pm 9,873 \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,012$ ).

## 5 Diskussion

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es die Auswirkungen einer PAR4-Defizienz in der Maus im Zusammenhang mit einem experimentellem SHT zu untersuchen. Nach SHT ist eine ausgeglichene Hämostase von äußerster Bedeutung, um eine übermäßige Blutungsneigung aber auch die Ausbildung von Mikrothromben zu verhindern (117, 264). Eine frühe Ausbildung von Mikrothromben nach SHT führt zu zerebraler Minderperfusion und kann demzufolge den sekundären Hirnschaden vergrößern (265). Ebenso können intrazerebrale Blutungen nach SHT zu erhöhtem Hirndruck mit konsekutiver Apoptose von Neuronen und entsprechender Ausweitung des sekundären Hirnschadens mit vermindertem neurologischem Outcome führen (11, 266). PAR4 nimmt als Thrombozytenrezeptor einen wichtigen Teil in der sekundären Hämostase bei der Formation eines stabilen Thrombus ein (18, 19, 20, 132). Aufgrund dessen sollten in dieser Studie mögliche protektive Effekte einer PAR4-Defizienz nach SHT untersucht werden. Die Ergebnisse demonstrierten eine essenzielle Rolle von PAR4 für die Hämostase. PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine höhere Mortalität, eine kompromittierte Hämostase und eine durchlässigere BHS. Außerdem demonstrierten sie bereits vor SHT motorische Defizite, die sich nach erfolgtem SHT fortsetzten. In den folgenden Abschnitten werden die Studienergebnisse diskutiert und im Anschluss Limitationen der Studie benannt.

### 5.1 Motorische und neurologische Einschränkungen sowie Phänotyp

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde in PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen kein spontaner Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen berichtet (132). Die erste von Sambrano et al. gezüchtete PAR4<sup>-/-</sup>-Maus zeigte ein normales Erscheinungsbild, Körpergröße sowie Fertilität (134). Auch die Mäuse in dieser hier durchgeführten Studie präsentierten äußerlich keine Hinweise auf einen anderen Phänotyp. Jedoch waren die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits bevor SHT in ihren motorischen Fähigkeiten im RR-Test eingeschränkt (s. Abbildung 18). Der RR-Test ist ein Standardtest, um die motorische Koordination und das Gleichgewicht zu untersuchen. Die Differenz der Verweildauer auf dem Zylinder vor und nach SHT ergab keinen Unterschied zwischen PAR4<sup>-/-</sup>- und BL6-Mäusen (s. Abbildung 19). Andere Studien, die ebenfalls im SHT oder MCAO-Modell PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse untersuchten, stellten keine auffälligen Phänotypen fest; evaluierten allerdings die motorischen und neurologischen Fähigkeiten von PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen vor

SHT oder MCAO nicht (22, 23). Eine immunhistochemische Färbung auf PAR4 im nativen Rattengehirn ergab die Expression von PAR4 in den Pyramidenzellen der Kortexschichten III und V. Die Pyramidenzellen in diesen Schichten sind wichtig für die motorische Kontrolle und könnte bei PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen möglicherweise in ihrer ursprünglichen Funktion eingeschränkt sein (267). In-situ-Hybridisierungsdaten für F2RL3-mRNA deuten darauf hin, dass PAR4 im Kleinhirn exprimiert wird (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000127533-F2RL3/brain>, Abruf 11.12.2025 um 16:35 Uhr). Aufgaben des Kleinhirns sind z.B. die Koordination von Bewegungen und die Absolvierung motorischer Lernvorgänge (268). Diese Tatsache gepaart mit dem Verteilungsmuster von PAR4 im Gehirn könnte die beobachteten motorischen Defizite bei PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen erklären, selbst wenn keine äußeren Verletzungen wie ein SHT vorliegen (269).

Die neurologische Funktion der Mäuse wurde durch den NSS evaluiert. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Testverfahren, das die neurologischen Fähigkeiten über mehrere Aspekte wie Gleichgewicht, Reflexe und Paresen abdeckt. Vor SHT zeigten die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Einschränkung, nach SHT waren sie in gleichem Maße wie die BL6-Mäuse eingeschränkt (s. Abbildung 17). Die erreichten Punktwerte im NSS nach SHT waren in beiden Studiengruppen hoch und der unabhängige Effekt des SHT auf den NSS könnte möglicherweise Auswirkungen der PAR4-Defizienz auf den NSS maskieren. Die vorgefundenen subduralen Hämatome sowie die vermehrte intrakranielle Blutung bei den PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen suggerieren ein verschlechtertes neurologisches Outcome auf längere Sicht und eine Erhebung des NSS zu späteren Zeitpunkten im Rahmen einer Langzeitstudie wäre in diesem Setting sicherlich von Interesse.

## 5.2 Blutgerinnung

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine PAR4-Defizienz zu einer erhöhten und ausgeprägten Blutungsneigung führt (s. Abbildung 31). Bereits zuvor durchgeführte Studien konnten jenseits der SHT-Forschung in anderen Studienmodellen bei vorliegender PAR4-Defizienz eine verlängerte Blutungszeit nachweisen (134, 270). Eine gestörte Thrombusbildung als zu Grunde liegende Ursache wird auf eine beeinträchtigte sekundäre Hämostase und eine fehlerhafte Thrombozytenaktivierung zurückgeführt (149, 270, 271). Vandendries et al. fanden in

einer Untersuchung mittels Laser-induzierter arterieller Thrombusbildung an PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen heraus, dass die initiale Thrombusbildung sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht unterschied, das Thrombuswachstum in den PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen dennoch stark eingeschränkt war (160). Gleichmaßen konnten Lee et al. neben einer eingeschränkten arteriellen Thrombusbildung, durch Laser-induzierte Verletzung in der V. saphena nachweisen, dass eine PAR4-Defizienz zu einer verminderten Thrombenstabilität führt (271). Trotz der protektiven Wirkung der PAR4-Defizienz für Thrombosen waren bei den Mäusen keine Anzeichen für das Auftreten von spontanen Blutungen erkennbar. Im Gegensatz dazu wiesen neugeborene PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse in einer Studie Spontanblutungen in verschiedenen Organen und eine erhöhte perinatale Letalität auf (272).

Diese Studien geben solide Erklärungsansätze für die Pathomechanismen, die die äußerst eingeschränkte Hämostase nach SHT bei den PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen in dieser Studie verursachen könnten. Im Gegensatz zu den Mäusen in dieser Studie präsentierten Mäuse mit einem Knockout für andere Gerinnungsfaktoren wie FXI, PAI-1, u-PA und t-PA keinen derart ausgeprägten Phänotyp nach SHT (228, 248, 273). Mithilfe solcher Mausmodelle kann die Hämostase nach SHT mit ihrem komplexen Zusammenspiel aus Gerinnungsfaktoren, Thrombozyten, Endothelschäden aber auch inflammatorischen Prozessen besser verstanden werden. Das in dieser Studie verwendete PAR4<sup>-/-</sup>-Modell simuliert eine vollständige pharmakologische Hemmung des PAR4 und ermöglicht Einblicke und ein besseres Verständnis bezüglich der Rolle von PAR4 in der Aktivierung von Thrombozyten, der Thrombusbildung sowie der Beeinflussung von neuroinflammatorischen Prozesse nach SHT.

Da PAR4 eine essenzielle Rolle in der Ausbildung (stabiler) Thromben spielt, war es in dieser Studie von Interesse, potenzielle Effekte der PAR4-Defizienz auf die Ausbildung von Mikrothromben nach SHT zu detektieren. Die Entstehung von Mikrothromben nach SHT kann zu zerebraler Ischämie führen und hierdurch den sekundären Hirnschaden verstärken (274, 275). Es wurde bereits mehrmals beschrieben, dass die Abwesenheit von PAR4 protektiv gegen Thrombosen wirkt (159). In dieser Studie gab es weder makroskopisch, noch histologisch Hinweise auf Mikrothromben. Auch auf molekularer Ebene ließen sich keine Nachweise von Mikrothromben finden. Um einen potenziellen Zusammenhang zwischen PAR4-

Defizienz und protektiven Effekten bei der Entstehung von Mikrothromben nach einem SHT zu untersuchen, sind weitere Studien erforderlich.

Die ausgeprägte Blutung nach SHT stellt vermutlich einer der Hauptgründe für die hohe Mortalität der PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse dar. Der hohe Gewichtsverlust von  $\geq 10\%$  in 9 von 13 PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen in den ersten 24 h nach SHT unterstreicht den schlechten Allgemeinzustand der Mäuse. In der Tierforschung herrscht Konsens darüber, dass Gewichtsverlust ein Anzeichen für einen schlechten Gesundheitszustand, Schmerz, Leid sowie auch körperlichen Stress sein kann. (276) Als weitere Gründe für die hohe Mortalität und den verminderten Allgemeinzustand können weiterhin eine eingeschränkte Funktion der BHS sowie möglicherweise vermehrt ausgeprägte neuroinflammatorische Prozesse angesehen werden. Diese sollen im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

### 5.3 Störung der BHS und Neuroinflammation

Die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse präsentierten in dieser Studie eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS. Die Evaluation der IgG-Extravasation im Hirngewebe nach SHT ist eine validierte Untersuchung, um die Schädigung der BHS zu quantifizieren. Allerdings kann die Verlässlichkeit dieser Analyse bei Vorliegen von Blutungen eingeschränkt sein. Blutungen als Folge von Gefäßverletzungen ermöglichen IgG den Eintritt in das Hirngewebe. Die IgG-Extravasation kann demzufolge nicht ausschließlich auf eine gestörte BHS zurückgeführt werden. In solchen Fällen ist die Unterscheidung zwischen einer primären Dysfunktion der BHS oder den sekundären Effekten einer Blutung essenziell. Hierzu wären weitere Experimente, die eine Assoziation von IgG-Extravasation mit anderen Markern (wie z.B. Claudin-5, Occludin) für eine beschädigte BHS herstellen kann, hilfreich. In Fällen von aufgetretenen Blutungen oder erhöhtem Blutungsrisiko, ist die Interpretation der IgG-Extravasation mit Vorsicht zu betrachten.

Eine Permeabilitätsstörung der BHS führt im Generellen zu zerebralen Ödemen und infolgedessen zu einer gesteigerten Neuroinflammation mit Verschlechterung des sekundären Hirnschadens. In dieser Tatsache könnte ein weiterer Grund für die hohe Mortalität der PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse begründet liegen.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ergab eine Studie von Mao et al. in PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen ein reduziertes zerebrales Ödem als auch eine verminderte Extravasation

nach MCAO. Zusätzlich waren das Rollen und die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten herabgesetzt. Dies spiegelte sich in einem verbesserten Outcome bezogen auf die neurologische und motorische Funktion, evaluiert durch NSS und RR, wider (23). Die Applikation des PAR4-Antagonisten ML354 bestätigte den eher neurotoxischen Effekt von PAR4, da unter Einsatz von ML354 im tMCAO-Modell ein verminderter Hirnschaden sowie ein verbessertes neurologisches Outcome nachgewiesen werden konnte (138). Im MCAO-Modell wird eine zerebrale Ischämie durch einen vorübergehenden arteriellen Verschluss der A. carotis simuliert. Der Pathomechanismus, der zur Hirnschädigung führt, ist folglich ein anderer im Vergleich zum CCI-Modell unserer Studie. Das MCAO-Modell weist außerdem ein viel geringeres Blutungsrisiko auf. Zwar können auch hier Blutungen, in Folge von Reperfusionsschäden oder Permeabilitätsstörungen der BHS auftreten, jedoch treten diese Komplikationen hauptsächlich nach Lysetherapie mit t-PA auf (277, 278). Demgegenüber sind Blutungskomplikationen im CCI-Modell sehr häufig. Sie werden direkt durch das Trauma mit konsekutiver Ruptur der Hirngefäße verursacht. Des Weiteren ist ein erhöhtes Nachblutungsrisiko in den ersten Tagen nach Trauma für das SHT charakteristisch (279, 280, 281).

Die Ergebnisse von Mao et al. werden durch eine Studie von Luo et al. unterstützt. Luo et al. behandelten Wildtyp-Mäuse mit dem selektiven und reversiblen PAR4-Antagonisten BMS-986120 und unterzogen sie eines experimentellen SHT durch Anwendung des CCI-Modells. Die Behandlung mit BMS-986120 führte zu einem reduzierten zerebralen Ödem, einem vermindertem Läsionsvolumen und einem verringerten neuronalen Schaden (22). PAR4 war in der Penumbra, mit einem Peak bei 72 h, hochreguliert und vermehrt auf Astrozyten exprimiert. Durch den Antagonismus von PAR4 konnte die Thrombin-induzierte Inflammation in Astrozyten reduziert werden und die Regulierung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  war reduziert (22). Auch im tMCAO-Modell konnten Fleischer et al. unter Einsatz von ML354 eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Expression, der Apoptosemarker sowie der Makrophagenansammlung erreichen (138). Im Gegensatz hierzu war in unserer qRT-PCR-Analyse keine Reduktion von Entzündungsmarkern zu finden, die einen antiinflammatorischen Effekt der PAR4-Defizienz unterstützen könnten. Eine Erklärung könnte die unterschiedliche Inaktivierung von PAR4 bieten. Die PAR4-Defizienz der Mäuse in der vorliegenden

Studie bewirkt eine vollständige Inhibition des PAR4. Eine pharmakologische Antagonisierung könnte demgegenüber schwächere Effekte haben und die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der inflammatorischen Reaktion erklären. Andererseits war Iba1, ein Mikroglia-Marker, in den PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen unserer Studie herunterreguliert. Dies lässt eine verminderte Aktivierung von Mikroglia annehmen. Suo et al. konnten ähnliche Ergebnisse in ihrer Studie feststellen: hier induzierte ein PAR4-Agonismus die Synthese von TNF- $\alpha$  in der Mikroglia (163).

Gegensätzlich zur Iba1-Reduktion war Lcn2, ein Marker für Neuroinflammation, in PAR4<sup>-/-</sup>-Mäusen hochreguliert. Durch Untersuchungen an Patienten konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Lcn2-Serumspiegel mit einem schlechterem neurologischen Outcome nach schwerem SHT oder SAB einhergeht (282, 283). Zusätzlich ist ein erhöhter Lcn2-Spiegel mit akuten neuroinflammatorischen Prozessen nach SAB assoziiert (283). Es gibt Hinweise, dass Lcn2 auch eine eingeschränkte Funktion der BHS verursachen könnte (284, 285). Dies ist kongruent mit den Ergebnissen zur Integrität der BHS in unserer Studie. Bezüglich des langfristigen neurologischen Outcomes in Korrelation mit Lcn2 wären weitere Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten nach SHT von Nöten.

#### 5.4 Zusammenhang Gerinnung und Immunsystem

Wie bereits aus den vorherigen Abschnitten hervorgehend spielt PAR4 eine wichtige Rolle sowohl in der Hämostase als auch in der Neuroinflammation. Nach SHT wird durch die Gewebeverletzung TF freigesetzt und über den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade vermehrt Thrombin produziert (286). Nach SHT hat TF Einfluss auf die Hämostase, Thrombose und Inflammation. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die durch TF ausgelöste Thrombinproduktion nach SHT eine Rolle bei der Aktivierung der Gerinnung und der Koagulopathie nach Trauma spielt (286, 287, 288). Die Koagulopathie-assoziierte Neuroinflammation nach SHT soll vor allem durch die TF-vermittelte Thrombinbildung verursacht werden (286). Neben seiner wichtigen Funktion in der Hämostase, wird Thrombin als proinflammatorisches Protein auch in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht (166). Thrombin wird als Hauptmodulator der endothelialen Aktivierung und Inflammation sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem angesehen (166, 289). Eine durch hohe Thrombinkonzentrationen verursachte Aktivierung von PAR4 nach SHT führt zu

einer ausgeprägteren Hirnschädigung durch inflammatorische Signalkaskaden (22). Da die Thrombingenerierung als Folge der TF-Freisetzung durch die extrinsische Gerinnungskaskade erfolgt, stehen Hämostase und Neuroinflammation hier im direkten Zusammenhang. PAR4 als einer der Hauptrezeptoren für Thrombin scheint demnach eine wichtige Schnittstelle zwischen Hämostase und Neuroinflammation darzustellen.

### 5.5 Klinische Relevanz

Thrombin, der Aktivator von PAR4, ist entscheidend für den sekundären Hirnschaden. Daher konzentrieren sich die Forscher auf PAR4, dessen Inhibition möglicherweise neuroprotektive Wirkungen haben könnte (125). Mehrere Studien konnten bereits neuroprotektive Effekt durch PAR4-Inhibition darlegen: Der selektive und reversible PAR4-Antagonist BMS-986120 verminderte die durch Thrombin induzierte Entzündungsreaktion in Astrozyten nach SHT (22). Ferner konnte nach tMCAO eine Hochregulation der PAR4-Expression in kortikalen Neuronen nachgewiesen werden. Hier führte der PAR4-Antagonist ML354 zu einer reduzierten Infarktgröße und zu verbesserten neurologischen Fähigkeiten. Dieser neuroprotektive Effekt war unabhängig von dem PAR4 auf Thrombozyten (138). Im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen gibt es Hinweise, dass die Expression von F2RL3-mRNA bei Patienten mit Morbus Alzheimer zu einer schlechteren kognitiven Leistungsfähigkeit führt und positiv mit den Transkriptionsniveaus von proinflammatorischen Markern korreliert (167). Inwiefern im Detail PAR4 eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt, ist noch ungeklärt. Die hier vorliegende Studie konnte keine neuroprotektiven Auswirkungen in Abwesenheit von PAR4 aufzeigen. Für potenzielle klinische Implikationen und Translationen sind weitere Studien notwendig, um die neuroprotektiven Effekte durch Inhibition von PAR4 weiter zu untersuchen. Differenziert sollte hierbei betrachtet werden, inwiefern die thrombozytenunabhängigen PAR4-Signalkaskaden allein für die neuroprotektiven Effekte verantwortlich sind, inwiefern Wechselwirkungen zwischen den auf verschiedenen Zellen exprimierten PAR4s besteht und ob spezifische Inhibitoren angepasst an die Lokalisation des PAR4 erfolgsversprechend sind. Eine Entwicklung von Liquor- oder Serummarkern, um PAR4-Regulationen einfacher zu diagnostizieren

und verfolgen zu können, wäre ein großer Vorteil. Solche Marker würden später zusätzlich klinische Studien in ihrer Evaluierbarkeit erleichtern.

Neben eines möglichen neuroprotektiven Effekts durch PAR4-Inhibition, steht PAR4 bereits länger aufgrund seiner thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung im Fokus der Forschung. Nachdem der PAR1-Antagonist Vorapaxar als Thrombozytenaggregationshemmer ein erhöhtes Blutungsrisiko als Nebenwirkung bei Patienten mit Myokardinfarkt aufwies (179), schien PAR4 als potenziell nebenwirkungsärmere Alternative vielversprechend. Durch seine physiologische Funktion kann durch Hemmung von PAR4 die Ausbildung stabiler Thromben verhindert werden, ohne die initiale Blutstillung zu stark zu beeinträchtigen (290). Es werden bereits klinische Studien in den Phasen 1 und 2a mit PAR4-Antagonisten durchgeführt, die auf ein reduziertes Blutungsrisiko und eine höhere Sicherheit hinweisen (19, 21). Im Widerspruch zu zuvor genannten Studien demonstrierte unsere Studie ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko in Abwesenheit von PAR4. Hierbei sollte dagegen bedacht werden, dass dieses erhöhte Blutungsrisiko direkt durch ein traumatisches Ereignis (mit-)ausgelöst wurde. Darüber hinaus besteht zwischen den Spezies Mensch und Maus ein Unterschied in der Expression sowie dem Zusammenspiel der PARs. Mäuse exprimieren PAR3 und PAR4, Menschen PAR1 und PAR4 auf ihren Thrombozyten (17, 140). PAR3 dient auf murinen Thrombozyten als Kofaktor für PAR4, wohingegen PAR1 und PAR4 auf humanen Thrombozyten unabhängig voneinander durch Thrombin eine Thrombozytenaggregation auslösen können, wenngleich auch einen funktionalen Synergismus zeigen (17, 140). Ferner unterscheiden sich die Signaltransduktion und Rückkopplungsmechanismen des humanen und murinen PAR4 (291). Für die präventive Anwendung von PAR4-Antagonisten ist insbesondere das Auftreten von spontanen Blutungsereignissen z.B. bei vorliegender Schlaganfallhistorie von Interesse. Denn auch unter den aktuell bereits eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmern kann es durch Traumata zu vermehrten Blutungsereignissen kommen. Nichtsdestotrotz sind für die PAR4-Antagonisten weitere sowie größer angelegte Phase-3-Studien essenziell, im Speziellen mit Fokus auf Blutungsereignisse als unerwünschte Nebenwirkung.

### 5.6 Limitationen dieser Dissertation

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf. Hierzu zählen die kurze Überlebenszeit von 24 h, die unerwartet hohe Mortalität und die dadurch verminderte Stichprobengröße. Diese Einschränkungen verhinderten weitere detaillierte Untersuchungen zu Langzeiteffekten und dem (neurologischen) Outcome der PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse. Die verminderte Stichprobengröße führt zu einer geringeren Belastbarkeit der Ergebnisse. Die ablaufenden inflammatorischen Prozesse nach SHT sind sehr komplex und die hier durchgeführte single point Untersuchung zum Zeitpunkt von 24 h nach SHT stellt lediglich eine Momentaufnahme in der sehr frühen Phase nach SHT dar. Diverse inflammatorische Marker, die ihre maximale Hochregulation nach SHT zu einem späteren Zeitpunkt erreichen, werden nicht abgebildet. Zudem schränkt eine einzelne Untersuchung 24 h nach SHT die Beurteilbarkeit der dynamischen inflammatorischen Prozesse und deren Einordnung im Rahmen des Outcomes ein. Leider war eine erneute Durchführung der Studie mit weiteren Untersuchungszeitpunkten aufgrund von ethischen Bedenken nicht möglich. Des Weiteren konnten aufgrund der hohen Sterblichkeit und der kurzen Überlebenszeit keine weiteren Analysen auf histologischer und molekularer Ebene veranlasst werden, die Erklärungen für die hohe Mortalität oder auch den Einfluss der PAR4-Defizienz auf den sekundären Hirnschaden, hätten geben können. Es kann folglich nicht sicher ausgeschlossen werden, dass Tiere, die vor Studienendpunkt verstorben sind, ein vergrößertes Läsionsvolumen, vermehrte intrazerebrale Blutungen oder auch eine erhöhte Inflammationsreaktion gezeigt hätten.

Darüber hinaus stellt der vergleichbare jedoch nicht identische genetische Hintergrund der Wildtyp-Kontrollmäuse eine weitere Limitation dar. Durch den fehlenden Einsatz von Wurfgeschwistern der PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse kann eine genetische und umweltbedingte Variation zwischen den Studiengruppen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Zuletzt ist die direkte Translation der gefundenen Ergebnisse auf den Menschen mit Vorsicht zu betrachten. Auf murinen Thrombozyten werden die Typen 3 und 4 der PARs exprimiert, hierbei ist PAR4 der Hauptthrombinrezeptor und PAR3 fungiert als Kofaktor für PAR4 (140). Im Gegensatz dazu werden auf humanen Thrombozyten die Rezeptortypen 1 und 4 exprimiert. Eine unterschiedliche Funktion und Interaktion der PARs untereinander limitieren die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen (291, 292).

## 5.7 Fazit und Ausblick

In dem vorliegenden Forschungsprojekt wurden die Auswirkungen einer PAR4-Defizienz im experimentell induzierten SHT-Mausmodell untersucht. Bisherige Studien zeigten neuroprotektive Effekte einer PAR4-Defizienz oder Inhibition (22, 23, 138).

Die Ergebnisse aktueller Studien weisen darauf hin, dass eine PAR4-Defizienz oder ein PAR4-Antagonismus den sekundären Hirnschaden nach SHT oder Schlaganfall reduziert sowie das neurologische Outcome verbessert. Trotz der zahlreichen Studien ist der zu Grunde liegende Pathomechanismus noch nicht im Detail geklärt. Insbesondere im Rahmen des SHT gibt es bislang nur wenige Studien, die den Einfluss von PAR4 nach SHT untersuchen. Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts verdeutlichen die wichtige Rolle von PAR4 nach SHT und zeigen schwerwiegende Folgen in Form von vermehrten Blutungen bei PAR4-Defizienz auf. Zudem präsentierten die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse dieser Studie einen nie zuvor beschriebenen Phänotyp, der mit Einschränkungen in der motorischen Funktion einherging. Diese Resultate stehen im Gegensatz zum Stand der aktuellen Forschung und nur weitere Untersuchungen können differenzierte Einblicke in die ablaufenden Pathomechanismen geben. Von besonderem Interesse wären Langzeitstudien, die die Mortalität, das neurologische Outcome als auch die histologischen Schäden über einen längeren Zeitraum analysieren. Insbesondere auf das komplexe Zusammenspiel zwischen Hämostase und Neuroinflammation sollte ein Fokus gelegt werden, da PAR4 eine wichtige Schnittstelle dieser Prozesse darstellt und in diesem Forschungsprojekt die Schäden durch eine eingeschränkte Hämostase potenziell neuroprotektive Effekte überwiegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Studie wichtige negative Aspekte einer PAR4-Defizienz beleuchten. Sie ermöglichen eine differenziertere und kritischere Betrachtung des PAR4 im Rahmen der Neuroprotektion und des Gerinnungsmanagement nach SHT. Ferner kann sie als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, deren Ziel es ist, das Blutungsmanagement nach SHT zu optimieren.

## **6 Zusammenfassung**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist ein sehr komplexes Krankheitsbild mit hoher Mortalität und zählt vor allem unter jüngeren Patienten zu den Haupttodesursachen. Durch zahlreiche Langzeitfolgen stellt das SHT zudem eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar. Bis zum heutigen Tag sind die genauen ablaufenden pathophysiologischen Prozesse nach SHT, trotz vielfältiger Forschungsprojekte noch nicht im Detail verstanden. Die Therapiemöglichkeiten belaufen sich lediglich auf Präventivmaßnahmen zur Eindämmung des sekundären Hirnschadens. Ein kausaler Therapieansatz ist bis heute noch ausstehend.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich im Rahmen der Grundlagenforschung mit den Einflüssen des Protease-aktivierten Rezeptors 4 (PAR4) im experimentellen SHT-Mausmodell. Der durch Thrombin aktivierte PAR4 ist essenziell für eine stabile Thrombenbildung. Die nach SHT auftretende posttraumatische Koagulopathie führt häufig zu einer Vergrößerung des Hirnschadens, einer erhöhten Mortalität sowie einem verschlechterten Outcome. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern PAR4 die Koagulopathie nach SHT beeinflusst. Neben seiner wichtigen Rolle in der Hämostase scheint eine Inhibition oder Defizienz von PAR4 außerdem neuroprotektive Effekte zu haben.

Um die Effekte von PAR4 nach SHT genauer zu untersuchen, unterzogen wir PAR4-knockout-Mäuse (PAR4<sup>-/-</sup>) und Wildtyp-Kontrollmäuse (BL6) einem experimentellen SHT mithilfe des Controlled Cortical Impact (CCI)-Modells. Der Überlebenszeitraum betrug 24 Stunden (h) nach SHT. Zu den durchgeführten Untersuchungen zählten Verhaltenstests sowie histologische und molekularbiologische Analysen. Die Verhaltenstests wurden sowohl vor SHT als auch 24 h nach SHT durchgeführt, alle weiteren Analysen erfolgten 24 h nach SHT.

Die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse präsentierten bereits vor SHT eine eingeschränkte motorische Funktion im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Nach SHT bestand weder in der neurologischen noch in der motorischen Funktion ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen. Auffällig war der erhöhte Gewichtsverlust als auch die hohe Mortalität von 41 Prozent (%) in der PAR4<sup>-/-</sup>-Gruppe. In der histologischen Analyse zeigten die PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse ein signifikant vergrößertes Hämatom sowie eine signifikant höhere IgG-Extravasation. Ein Unterschied hinsichtlich des

Läsionsvolumens ließ sich nicht feststellen. Die molekularbiologische Untersuchung ergab eine vermehrte Expression von Lcn2, ein Protein, das während des Inflammationsgeschehens freigesetzt wird und positiv mit der Schwere des Hirnschadens korreliert. Konträr dazu deutet die verminderte Expression des Mikroglia markers Iba1 auf eine herabgesetzte Mikrogliaaktivität und folglich auf eine reduzierte Neuroinflammation hin.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine PAR4-Defizienz zu einer erhöhten Mortalität, einer vermehrten intrazerebralen Blutung sowie einer durchlässigeren Blut-Hirn-Schranke (BHS) führt. PAR4 spielt demnach eine fundamentale Rolle für die Hämostase nach SHT und scheint darüber hinaus auch für die normale Hirnfunktion essenziell zu sein, da PAR4<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits vor SHT eine eingeschränkte motorische Funktion aufwiesen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Pryzmont M, Kosciuczuk U, Maciejczyk M. Biomarkers of traumatic brain injury: narrative review and future prospects in neurointensive care. *Front Med (Lausanne)*. 2025;12:1539159.
2. Hvingelby VS, Bjarkam CR, Mathiesen TI, Poulsen FR, Bøtker MT, Husted A, et al. The prognostic significance of biomarkers in cerebrospinal fluid following severe traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurgical Review*. 2022;45(4):2547-64.
3. Salasky VR, Chang W-TW. Neurotrauma Update. *Emergency Medicine Clinics of North America*. 2023;41(1):19-33.
4. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
5. Arora K, Vats V, Kaushik N, Sindhawani D, Saini V, Arora DM, et al. A Systematic Review on Traumatic Brain Injury Pathophysiology and Role of Herbal Medicines in its Management. *Curr Neuropharmacol*. 2023;21(12):2487-504.
6. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Medical Clinics of North America*. 2020;104(2):213-38.
7. Faul M, Coronado V. Chapter 1 - Epidemiology of traumatic brain injury. In: Grafman J, Salazar AM, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. 127: Elsevier; 2015. p. 3-13.
8. Carney N, Totten AM, O'Reilly C, Ullman JS, Hawryluk GW, Bell MJ, et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery*. 2017;80(1):6-15.
9. Ritter M. Evidence-Based Pearls: Traumatic Brain Injury. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 2023;35(2):171-8.
10. Numminen HJ. The incidence of traumatic brain injury in an adult population--how to classify mild cases? *Eur J Neurol*. 2011;18(3):460-4.
11. Pinggera D, Geiger P, Thomé C. Traumatic brain injury. *Nervenarzt*. 2023;94(10):960-72.
12. Dobson GP, Morris JL, Letson HL. Traumatic brain injury: Symptoms to systems in the 21st century. *Brain Res*. 2024;1845:149271.
13. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9.
14. Samuels JM, Moore EE, Silliman CC, Banerjee A, Cohen MJ, Ghasabyan A, et al. Severe traumatic brain injury is associated with a unique coagulopathy phenotype. *J Trauma Acute Care Surg*. 2019;86(4):686-93.
15. Fletcher-Sandersjoo A, Thelin EP, Maegele M, Svensson M, Bellander BM. Time Course of Hemostatic Disruptions After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Literature. *Neurocrit Care*. 2021;34(2):635-56.
16. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.

17. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 1999;103(6):879-87.
18. Priestley ES, Banville J, Deon D, Dubé L, Gagnon M, Guy J, et al. Discovery of Two Novel Antiplatelet Clinical Candidates (BMS-986120 and BMS-986141) That Antagonize Protease-Activated Receptor 4. *J Med Chem.* 2022;2022:8854-.
19. Merali S, Wang Z, Frost C, Callejo M, Hedrick M, Hui L, et al. New oral protease-activated receptor 4 antagonist BMS-986120: tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and gene variant effects in humans. 2022.
20. Bertron JL, Duvernay MT, Mitchell SG, Smith ST, Maeng JG, Blobaum AL, et al. Discovery and Optimization of a Novel Series of Competitive and Central Nervous System-Penetrant Protease-Activated Receptor 4 (PAR4) Inhibitors. *Cite This: ACS Chem Neurosci* 2021. 2021;12:4534-.
21. Nash J, Meah MN, Whittington B, Debono S, Raftis J, Miller MR, et al. PAR4 Antagonism in Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2024;44(4):987-96.
22. Luo J, Wu X, Liu H, Cui W, Guo W, Guo K, et al. Antagonism of Protease-Activated Receptor 4 Protects Against Traumatic Brain Injury by Suppressing Neuroinflammation via Inhibition of Tab2/NF-kappaB Signaling. *Neurosci Bull.* 2021;37(2):242-54.
23. Mao Y, Zhang M, Tuma RF, Kunapuli SP. Deficiency of PAR4 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(5):1044-52.
24. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI, Demographics, Clinical Assessment Working Group of the I, et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91(11):1637-40.
25. Marr AL, Coronado VG. Central Nervous System Injury Surveillance Data Submission Standards—2002. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control. 2004.
26. Thapa K, Khan H, Singh TG, Kaur A. Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *J Mol Neurosci.* 2021;71(9):1725-42.
27. Manley GT, Dams-O'Connor K, Alosco ML, Awwad HO, Bazarian JJ, Bragge P, et al. A new characterisation of acute traumatic brain injury: the NIH-NINDS TBI Classification and Nomenclature Initiative. *Lancet Neurol.* 2025;24(6):512-23.
28. Reith FCM, Lingsma HF, Gabbe BJ, Lecky FE, Roberts I, Maas AIR. Differential effects of the Glasgow Coma Scale Score and its Components: An analysis of 54,069 patients with traumatic brain injury. *Injury.* 2017;48(9):1932-43.
29. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):844-54.
30. Smith LGF, Milliron BS, Mai-Lan H, Houchun HH, Rusin J, Leonard J, et al. Advanced neuroimaging in traumatic brain injury: an overview. *Neurosurg Focus.* 2019;47(6).
31. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT, et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 2008;25(7):719-38.

32. Zhong H, Feng Y, Shen J, Rao T, Dai H, Zhong W, et al. Global Burden of Traumatic Brain Injury in 204 Countries and Territories From 1990 to 2021. *Am J Prev Med.* 2025.
33. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2019;130(4):1080-97.
34. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):987-1048.
35. Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, Rusnak M, Nieboer D, Feigin V, et al. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Health.* 2016;1(2):e76-e83.
36. Jochems D, van Rein E, Niemeijer M, van Heijl M, van Es MA, Nijboer T, et al. Incidence, causes and consequences of moderate and severe traumatic brain injury as determined by Abbreviated Injury Score in the Netherlands. *Sci Rep.* 2021;11(1):19985.
37. Asemota AO, George BP, Bowman SM, Haider AH, Schneider EB. Causes and trends in traumatic brain injury for United States adolescents. *J Neurotrauma.* 2013;30(2):67-75.
38. Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, Puyana JC. Global neurotrauma research challenges and opportunities. *Nature.* 2015;527(7578):S193-7.
39. Wang J, Han F, Zhao Q, Xia B, Dai J, Wang Q, et al. Clinicopathological Characteristics of Traumatic Head Injury in Juvenile, Middle-Aged and Elderly Individuals. *Med Sci Monit.* 2018;24:3256-64.
40. Injury GBDTB, Spinal Cord Injury C. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(1):56-87.
41. Savelieff MG, Feldman EL. Traumatic Brain Injury: A Success Stemming From Stem Cells. *Neurology.* 2021;96(8):357-8.
42. Horton R. GBD 2010: understanding disease, injury, and risk. *Lancet.* 2012;380(9859):2053-4.
43. Holmes JF, Hendey GW, Oman JA, Norton VC, Lazarenko G, Ross SE, et al. Epidemiology of blunt head injury victims undergoing ED cranial computed tomographic scanning. *Am J Emerg Med.* 2006;24(2):167-73.
44. Kaplan ZLR, van der Vlegel M, van Dijk J, Pisica D, van Leeuwen N, Lingsma HF, et al. Intramural Healthcare Consumption and Costs After Traumatic Brain Injury: A Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI) Study. *J Neurotrauma.* 2023;40(19-20):2126-45.
45. Orr TJ, Lesha E, Kramer AH, Cecia A, Dugan JE, Schwartz B, et al. Traumatic Brain Injury: A Comprehensive Review of Biomechanics and Molecular Pathophysiology. *World Neurosurg.* 2024;185:74-88.
46. Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(8):1224-38.

47. Ommaya AK, Grubb Jr. RL, Naumann RA. Coup and contre-coup injury: observations on the mechanics of visible brain injuries in the rhesus monkey. *Journal of Neurosurgery*. 1971;35(5):503-16.
48. Schmidt OI, Infanger M, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. The Role of Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *European Journal of Trauma*. 2004;30(3):135-49.
49. Zima L, Moore AN, Smolen P, Kobori N, Noble B, Robinson D, et al. The evolving pathophysiology of TBI and the advantages of temporally-guided combination therapies. *Neurochem Int*. 2024;180:105874.
50. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:528.
51. Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001;82(10):1461-71.
52. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2013;246:35-43.
53. Işııkay Aİ, Karakaya D. A Review of Traumatic Axonal Injury. *Acta Medica*. 2021;52(2):102-8.
54. Logsdon AF, Lucke-Wold BP, Turner RC, Huber JD, Rosen CL, Simpkins JW. Role of Microvascular Disruption in Brain Damage from Traumatic Brain Injury. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1147-60.
55. Louie S, Poblete RA, Kuo GY, Tarzi FPP. Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. In: Lv X, Guo Y, Mao G, editors. *Frontiers In Traumatic Brain Injury*. Rijeka: IntechOpen; 2022.
56. Sulhan S, Lyon KA, Shapiro LA, Huang JH. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *J Neurosci Res*. 2020;98(1):19-28.
57. Kursancew ACS, Faller CJ, Bortoluzzi DP, Niero LB, Brandao B, Danielski LG, et al. Neuroinflammatory Response in the Traumatic Brain Injury: An Update. *Neurochem Res*. 2024;50(1):64.
58. Kempuraj D, Ahmed ME, Selvakumar GP, Thangavel R, Dhaliwal AS, Dubova I, et al. Brain Injury-Mediated Neuroinflammatory Response and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist*. 2020;26(2):134-55.
59. Kempuraj D, Ahmed ME, Selvakumar GP, Thangavel R, Raikwar SP, Zaheer SA, et al. Mast Cell Activation, Neuroinflammation, and Tight Junction Protein Derangement in Acute Traumatic Brain Injury. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:4243953.
60. Hakiminia B, Alikiaii B, Khorvash F, Mousavi S. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury: From mechanistic view to targeted therapeutic opportunities. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2022;36(4):612-62.
61. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):13-25.
62. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1):a020412.

63. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
64. Hay JR, Johnson VE, Young AM, Smith DH, Stewart W. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(12):1147-57.
65. Robicsek SA, Bhattacharya A, Rabai F, Shukla K, Dore S. Blood-Related Toxicity after Traumatic Brain Injury: Potential Targets for Neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2020;57(1):159-78.
66. Nelasari D, Sumandari A, Sasmita Ajiningrum R. Traumatic Brain Injury. *KESANS : International Journal of Health and Science.* 2022;1(4):357-67.
67. Khokhar AM, Gull Z, Ali R. Head Injury and Intracranial Hemorrhages: A CT Imaging Study of Trauma Patients. *Medical Science and Discovery.* 2023;10(3):168-71.
68. Waseem N, Akhtar A, Saleem K, Liaqat S, Waqas U. The Evaluation of Frequency of Intracranial Haemorrhage in Patients of Head Trauma with GCS 10-15 on Computed Tomography Scan. *EAS Journal of Medicine and Surgery.* 2020;2(11):205-11.
69. Fiorelli EM, Bozzano V, Bonzi M, Rossi SV, Colombo G, Radici G, et al. Incremental Risk of Intracranial Hemorrhage After Mild Traumatic Brain Injury in Patients on Antiplatelet Therapy: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Emerg Med.* 2020;59(6):843-55.
70. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008;7(8):728-41.
71. Narayan RK, Maas AI, Servadei F, Skolnick BE, Tillinger MN, Marshall LF, et al. Progression of traumatic intracerebral hemorrhage: a prospective observational study. *J Neurotrauma.* 2008;25(6):629-39.
72. Perel P, Roberts I, Bouamra O, Woodford M, Mooney J, Lecky F. Intracranial bleeding in patients with traumatic brain injury: a prognostic study. *BMC Emerg Med.* 2009;9:15.
73. Chang EF, Meeker M, Holland MC. Acute traumatic intraparenchymal hemorrhage: risk factors for progression in the early post-injury period. *Neurosurgery.* 2006;58(4):647-56; discussion -56.
74. Tataryn Z, Botsford B, Riesenburger R, Kryzanski J, Hwang S. Spontaneous resolution of an acute epidural hematoma with normal intracranial pressure: case report and literature review. *Childs Nerv Syst.* 2013;29(11):2127-30.
75. Wang W. Minimally Invasive Surgical Treatment of Acute Epidural Hematoma: Case Series. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6507350.
76. Tenny S, Das JM, Thorell W. Intracranial Hemorrhage. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.*
77. Gutowski P, Meier U, Rohde V, Lemcke J, von der Brelie C. Clinical Outcome of Epidural Hematoma Treated Surgically in the Era of Modern Resuscitation and Trauma Care. *World Neurosurg.* 2018;118:e166-e74.
78. Heinzelmann M, Platz A, Imhof HG. Outcome after acute extradural haematoma, influence of additional injuries and neurological complications in the ICU. *Injury.* 1996;27(5):345-9.

79. Rahimi A, Corley JA, Ammar A, Shlobin NA, Rolle M, Mekary RA, et al. The unmet global burden of cranial epidural hematomas: A systematic review and meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2022;219:107313.
80. Goubert R, Wray A, Matonis D. A Case Report of Epidural Hematoma After Traumatic Brain Injury. *J Educ Teach Emerg Med.* 2020;5(3):V22-V4.
81. Qiao Y, Alkarawi S, Provasek VE, Zhang YJ, Tsappidi S, Hui F. Chronic subdural hematoma: What precisely are we treating? *Interv Neuroradiol.* 2024;15910199241263633.
82. Bajsarowicz P, Prakash I, Lamoureux J, Saluja RS, Feyz M, Maleki M, et al. Nonsurgical acute traumatic subdural hematoma: what is the risk? *J Neurosurg.* 2015;123(5):1176-83.
83. Massaro F, Lanotte M, Faccani G, Triolo C. One hundred and twenty-seven cases of acute subdural haematoma operated on. Correlation between CT scan findings and outcome. *Acta Neurochir (Wien).* 1996;138(2):185-91.
84. Alshora W, Alfageeh M, Alshahrani S, Alqahtani S, Dajam A, Matar M, et al. Diagnosis and management of subdural hematoma: a review of recent literature. *International Journal Of Community Medicine And Public Health.* 2018;5(9).
85. Kia M, Saluja RS, Marcoux J. Acute Traumatic Subdural Hematoma and Anticoagulation Risk. *Can J Neurol Sci.* 2023;50(2):188-93.
86. Liebert A, Hirschmann E, Eibl T, Hammer A, Steiner HH, Schebesch KM, et al. Acute-to-chronic subdural hematoma: radiographic and clinical progression from acute subdural hematoma. *Neurosurg Rev.* 2024;47(1):247.
87. Rodriguez-Ruiz E, Galarza L, Schaller SJ. Principles and Management of Subarachnoid Haemorrhage. In: Pérez-Torres D, Martínez-Martínez M, Schaller SJ, editors. *Best 2022 Clinical Cases in Intensive Care Medicine: From the ESICM NEXT Committee Clinical Case Contest.* Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 415-24.
88. Griswold DP, Fernandez L, Rubiano AM. Traumatic Subarachnoid Hemorrhage: A Scoping Review. *J Neurotrauma.* 2022;39(1-2):35-48.
89. Servadei F, Murray GD, Teasdale GM, Dearden M, Iannotti F, Lapierre F, et al. Traumatic Subarachnoid Hemorrhage: Demographic and Clinical Study of 750 Patients from the European Brain Injury Consortium Survey of Head Injuries. *Neurosurgery.* 2002;50(2):261-9.
90. Wu Z, Li S, Lei J, An D, Haacke EM. Evaluation of traumatic subarachnoid hemorrhage using susceptibility-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(7):1302-10.
91. Modi NJ, Agrawal M, Sinha VD. Post-traumatic subarachnoid hemorrhage: A review. *Neurol India.* 2016;64 Suppl:S8-S13.
92. Sanicola HW, Stewart CE, Luther P, Yabut K, Guthikonda B, Jordan JD, et al. Pathophysiology, Management, and Therapeutics in Subarachnoid Hemorrhage and Delayed Cerebral Ischemia: An Overview. *Pathophysiology.* 2023;30(3):420-42.
93. Raya AK, Diringner MN. Treatment of Subarachnoid Hemorrhage. *Critical Care Clinics.* 2014;30(4):719-33.

94. Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2019;19(7):679-94.
95. Faghih-Jouybari M, Raof MT, Abdollahzade S, Jamshidi S, Padegane T, Ehteshami S, et al. Mortality and morbidity in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: A single-center experience. *Curr J Neurol*. 2021;20(1):32-6.
96. Yan F, Yi Z, Hua Y, Shen Y, Li M, Ding Y, et al. Predictors of mortality and recurrent stroke within five years of intracerebral hemorrhage. *Neurol Res*. 2018;40(6):466-72.
97. Al-Koussa H, AlZaim I, El-Sabban ME. Pathophysiology of Coagulation and Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Coagulation Cascades and Disorders. *J Clin Med*. 2022;11(16).
98. Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003;17(3):369-83.
99. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol*. 2011;39(1):273-80.
100. Klamroth R. Physiologie des Gerinnungssystems. *Klinische Angiologie*. Springer Reference Medizin 2022. p. 1-5.
101. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*. 2012;129(3):220-4.
102. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-23.
103. Sira J, Eyre L. Physiology of haemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2016;17(2):79-82.
104. Ullah N, Ali M, Dad Khan I, Khan M, Jamil H, Anthony N. Comparative Effects of P2Y<sub>12</sub> Inhibitors on Thrombus Biology and Inflammatory Responses in Atherothrombotic Cardiovascular Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Cureus*. 2025;17(11):e95888.
105. Liverani E, Kilpatrick LE, Tsygankov AY, Kunapuli SP. The role of P2Y<sub>12</sub> receptor and activated platelets during inflammation. *Curr Drug Targets*. 2014;15(7):720-8.
106. Amboss SE. Primäre Hämostase - Teil 2 - Physiologie und Medikamente - AMBOSS Auditor [Video]. Verfügbar unter: <https://www.youtube.com/watch?v=uJmsNU49KCK&t=177s> [Abgerufen am 29.12.2025, 23:25 Uhr] 2016.
107. Kosmalka M, Znajewska-Szulc K, Bronowski A. Hemostasis – compendium for students. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020;10(12):214-27.
108. Moore EE, Moore HB, Kornblith LZ, Neal MD, Hoffman M, Mutch NJ, et al. Trauma-induced coagulopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):30.
109. Fletcher-Sandersjoo A, Sebghati J, Thelin EP. Hemostatic disturbances in traumatic brain injury: from mechanism to management. *Acta Neurochir (Wien)*. 2025;167(1):146.
110. Maegele M, Aversa J, Marsee MK, McCauley R, Chitta SH, Vyakaranam S, et al. Changes in Coagulation following Brain Injury. *Semin Thromb Hemost*. 2020;46(2):155-66.

111. CRASH-3 trial collaborators. Effects of tranexamic acid on death, disability, vascular occlusive events and other morbidities in patients with acute traumatic brain injury (CRASH-3): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2019;394(10210):1713-23.
112. Zhang M, Liu T. Efficacy and safety of tranexamic acid in acute traumatic brain injury: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Emerg Med*. 2024;80:35-43.
113. Xiong Y, Guo X, Huang X, Kang X, Zhou J, Chen C, et al. Efficacy and safety of tranexamic acid in intracranial haemorrhage: A meta-analysis. *PLoS One*. 2023;18(3):e0282726.
114. Lawati KA, Sharif S, Maqbali SA, Rimawi HA, Petrosoniak A, Belley-Cote EP, et al. Efficacy and safety of tranexamic acid in acute traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Intensive Care Med*. 2021;47(1):14-27.
115. Schober P, Loer SA, Schwarte LA. Antifibrinolytics in the treatment of traumatic brain injury. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2022;35(5):583-92.
116. Maegele M, Schochl H, Menovsky T, Marechal H, Marklund N, Buki A, et al. Coagulopathy and haemorrhagic progression in traumatic brain injury: advances in mechanisms, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2017;16(8):630-47.
117. Maegele M. Coagulopathy and Progression of Intracranial Hemorrhage in Traumatic Brain Injury: Mechanisms, Impact, and Therapeutic Considerations. *Neurosurgery*. 2021;89(6):954-66.
118. Maegele M. Coagulopathy after traumatic brain injury: incidence, pathogenesis, and treatment options. *Transfusion*. 2013;53 Suppl 1:28S-37S.
119. Fletcher-Sandersjoo A, Maegele M, Bellander BM. Does Complement-Mediated Hemostatic Disturbance Occur in Traumatic Brain Injury? A Literature Review and Observational Study Protocol. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
120. Stoll G, Nieswandt B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(8):473-81.
121. Martin GE, Xia B, Kim Y, Johnson MD, Veile R, Friend LA, et al. Platelet Function Changes in a Time-Dependent Manner Following Traumatic Brain Injury in a Murine Model. *Shock*. 2018;50(5):551-6.
122. Wallen TE, Singer KE, Baucom MR, England LG, Schuster RM, Pritts TA, et al. Effects of antifibrinolytics on systemic and cerebral inflammation after traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2022;93(1):30-7.
123. Dean T, Mendiola AS, Yan Z, Meza-Acevedo R, Cabriga B, Akassoglou K, et al. Fibrin promotes oxidative stress and neuronal loss in traumatic brain injury via innate immune activation. *Journal of Neuroinflammation*. 2024;21(1).
124. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26(4):297-303.
125. Ye F, Garton HJL, Hua Y, Keep RF, Xi G. The Role of Thrombin in Brain Injury After Hemorrhagic and Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2021;12(3):496-511.

126. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64(6):1057-68.
127. Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*. 1991;353(6345):674-7.
128. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9208-12.
129. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997;386(6624):502-6.
130. Xu W-F, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Biochemistry*. 1998;95:6642-6.
131. Peach CJ, Edgington-Mitchell LE, Bunnett NW, Schmidt BL. Protease-activated receptors in health and disease. *Physiol Rev*. 2023;103(1):717-85.
132. French SL, Hamilton JR. Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again. *Br J Pharmacol*. 2016;173(20):2952-65.
133. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690-4.
134. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng Y-W, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature Genetics*. 2001;413:74-8.
135. Chandrabalan A, Ramachandran R, Ramachandran CR. Molecular mechanisms regulating Proteinase-Activated Receptors (PARs). *The FEBS Journal*. 2021;288:2697-726.
136. Han X, Nieman MT, Kerlin BA. Protease-activated receptors: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5(1):17-26.
137. Petryszak R, Burdett T, Fiorelli B, Fonseca NA, Gonzalez-Porta M, Hastings E, et al. Expression Atlas update--a database of gene and transcript expression from microarray- and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D926-32.
138. Fleischer M, Szepanowski RD, Pesara V, Bihorac JS, Oehler B, Dobrev D, et al. Direct neuronal protection by the protease-activated receptor PAR4 antagonist ML354 after experimental stroke in mice. *Br J Pharmacol*. 2024;181(18):3364-79.
139. Bah A, Chen Z, Bush-Pelc LA, Mathews FS, Di Cera E. Crystal structures of murine thrombin in complex with the extracellular fragments of murine protease-activated receptors PAR3 and PAR4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11603-8.
140. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*. 2000;404(6778):609-13.
141. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol*. 2010;160(2):191-203.
142. Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:67.

143. Mathews, II, Padmanabhan KP, Ganesh V, Tulinsky A, Ishii M, Chen J, et al. Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes. *Biochemistry*. 1994;33(11):3266-79.
144. Kawabata A, Saifeddine M, Al-Ani B, Leblond L, Hollenberg MD. Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(1):358-70.
145. Hollenberg MD, Mihara K, Polley D, Suen JY, Han A, Fairlie DP, et al. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(5):1180-94.
146. Han X, Nieman MT. The domino effect triggered by the tethered ligand of the protease activated receptors. *Thromb Res*. 2020;196:87-98.
147. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(2):94-109.
148. Lindahl T, Bjerke M, Ramström S, Vretenbrant K. Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017;97(03):417-24.
149. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic Kinetics of Activation and Signaling for PAR1 and PAR4 Thrombin Receptors in Platelets. *Biochemistry*. 2000;39:5458-67.
150. Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*. 2003;102(9):3224-31.
151. Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25216-21.
152. Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13532-9.
153. Dorsam RT, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47588-95.
154. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):504-8.
155. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(8):1800-14.
156. Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, McLaughlin JN, Cleator J, Hamm HE. PAR4, but not PAR1, signals human platelet aggregation via Ca<sup>2+</sup> mobilization and synergistic P2Y<sub>12</sub> receptor activation. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26665-74.
157. Gong Y, Xi G, Hu H, Gu Y, Huang F, Keep RF, et al. Increase in brain thrombin activity after experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;105:47-50.

158. Hubbard WB, Dong JF, Cruz MA, Rumbaut RE. Links between thrombosis and inflammation in traumatic brain injury. *Thromb Res.* 2021;198:62-71.
159. French SL, Arthur JF, Lee H, Nesbitt WS, Andrews RK, Gardiner EE, et al. Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood. *J Thromb Haemost.* 2016;14(8):1642-54.
160. Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(1):288-92.
161. Lin YC, Ko YC, Hung SC, Lin YT, Lee JH, Tsai JY, et al. Selective Inhibition of PAR4 (Protease-Activated Receptor 4)-Mediated Platelet Activation by a Synthetic Nonanticoagulant Heparin Analog. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(4):694-703.
162. Rohatgi T, Sedehizade F, Reymann KG, Reiser G. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. *Neuroscientist.* 2004;10(6):501-12.
163. Suo Z, Wu M, Citron BA, Gao C, Festoff BW. Persistent protease-activated receptor 4 signaling mediates thrombin-induced microglial activation. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31177-83.
164. Striggow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, et al. 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.* 2001;14(4):595-608.
165. Wang H, Ubl JJ, Reiser G. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia.* 2002;37(1):53-63.
166. Iannucci J, Grammas P. Thrombin, a Key Driver of Pathological Inflammation in the Brain. *Cells.* 2023;12(9).
167. Winfree RL, Erreger K, Phillips J, Seto M, Wang Y, Schneider JA, et al. Elevated protease-activated receptor 4 (PAR4) gene expression in Alzheimer's disease predicts cognitive decline. *Neurobiol Aging.* 2024;140:93-101.
168. Lekic T, Klebe D, McBride DW, Manaenko A, Rolland WB, Flores JJ, et al. Protease-activated receptor 1 and 4 signal inhibition reduces preterm neonatal hemorrhagic brain injury. *Stroke.* 2015;46(6):1710-3.
169. Leys D. Atherothrombosis: A Major Health Burden. *Cerebrovascular Diseases.* 2001;11(Suppl. 2):1-4.
170. Poole RM, Elkinson S. Vorapaxar: first global approval. *Drugs.* 2014;74(10):1153-63.
171. Steg PG, Dorman SH, Amarenco P. Atherothrombosis and the role of antiplatelet therapy. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:325-32.
172. Smith SC, Jr., Benjamin EJ, Bonow RO, Braun LT, Creager MA, Franklin BA, et al. AHA/ACC Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients with Coronary and other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation.* 2011;124(22):2458-73.

173. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., et al. 2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2011;123(18):e426-579.
174. Del Giovane C, Boncoraglio GB, Bertu L, Banzi R, Tramacere I. Antiplatelet drugs for secondary prevention in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Neurol*. 2021;21(1):319.
175. Johnston SC, Easton JD, Farrant M, Barsan W, Conwit RA, Elm JJ, et al. Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA. *N Engl J Med*. 2018;379(3):215-25.
176. Baber U, Leisman DE, Cohen DJ, Gibson CM, Henry TD, Dangas G, et al. Tailoring Antiplatelet Therapy Intensity to Ischemic and Bleeding Risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2019;12(1):e004945.
177. Flaumenhaft R, De Ceunynck K. Targeting PAR1: Now What? *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(8):701-16.
178. Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno DJ, Armstrong PW, Werf FVd, et al. Thrombin-Receptor Antagonist Vorapaxar in Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(1):20-33.
179. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1404-13.
180. Han X, Nieman MT. PAR4 (Protease-Activated Receptor 4): PARTICULARLY Important 4 Antiplatelet Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(2):287-9.
181. Sidhu TS, French SL, Hamilton JR. Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6169-83.
182. Wilson SJ, Ismat FA, Wang Z, Cerra M, Narayan H, Raftis J, et al. PAR4 (Protease-Activated Receptor 4) Antagonism With BMS-986120 Inhibits Human Ex Vivo Thrombus Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(2):448-56.
183. Meah MN, Raftis J, Wilson SJ, Perera V, Garonzik SM, Murthy B, et al. Antithrombotic Effects of Combined PAR (Protease-Activated Receptor)-4 Antagonism and Factor Xa Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(11):2678-85.
184. Li S, Liu S, Yuan D, Liu R, Hu L, Zhu X. Discovery of quinazoline-benzothiazole derivatives as novel potent protease-activated receptor 4 antagonists with improved pharmacokinetics and low bleeding liability. *Eur J Med Chem*. 2024;280:116980.
185. Johnson VE, Meaney DF, Cullen DK, Smith DH. Animal models of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015;127:115-28.
186. Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*. 2010;41 Suppl 1:S10-3.
187. Marklund N. Rodent Models of Traumatic Brain Injury: Methods and Challenges. In: Kobeissy FH, Dixon CE, Hayes RL, Mondello S, editors. *Injury Models of the Central Nervous System: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 29-46.

188. Skotak M, Townsend MT, Ramarao KV, Chandra N. A Comprehensive Review of Experimental Rodent Models of Repeated Blast TBI. *Front Neurol.* 2019;10:1015.
189. Albert-Weissenberger C, Siren AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2(1):16.
190. Saidu U, Bulama I, Onu A, Abbas A, Saidu Y, Bilbis L. Experimental animal models in traumatic brain injury research: a comprehensive review of methods and outlook. *International Journal of Scientific Reports.* 2024;10:206-14.
191. Fournier M-L, Clément T, Aussudre J, Plesnila N, Obenaus A, Badaut J. Contusion Rodent Model of Traumatic Brain Injury: Controlled Cortical Impact. In: Das H, editor. *Wound Regeneration: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer US; 2021. p. 49-65.
192. Huerta de la Cruz S, Santiago-Castañeda C, Rodríguez-Palma EJ, Rocha L, Sancho M. Lateral fluid percussion injury: A rat model of experimental traumatic brain injury. *Methods Cell Biol.* 2024;185:197-224.
193. Ghosh KK, Padmanabhan P, Yang CT, Wang Z, Palanivel M, Ng KC, et al. An In Vivo Study of a Rat Fluid-Percussion-Induced Traumatic Brain Injury Model with [(11)C]PBR28 and [(18)F]flumazenil PET Imaging. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
194. Ibrahim B, Usman B, Mshelia P, abba sanda K, Waziri A, Timta M, et al. Serum Dynamics of Electrolytes, Lipid profile, and Neuro-Behavioral Severity Score in Traumatic Brain Injury-induced Albino Rat Models. *Sahel Journal of Veterinary Sciences.* 2025;21:7-13.
195. Evans LP, Roghair AM, Gilkes NJ, Bassuk AG. Visual Outcomes in Experimental Rodent Models of Blast-Mediated Traumatic Brain Injury. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:659576.
196. Risling M, Smith D, Stein TD, Thelin EP, Zanier ER, Ankarcrona M, et al. Modelling human pathology of traumatic brain injury in animal models. *J Intern Med.* 2019;285(6):594-607.
197. Romine J, Gao X, Chen J. Controlled cortical impact model for traumatic brain injury. *J Vis Exp.* 2014(90):e51781.
198. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol.* 2016;7:134.
199. Osier ND, Korpon JR, Dixon CE. Controlled Cortical Impact Model. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis © 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.; 2015.
200. Osier N, Dixon CE. Mini Review of Controlled Cortical Impact: A Well-Suited Device for Concussion Research. *Brain Sci.* 2017;7(7).
201. Shohami E, Novikov M, Bass R. 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 Research.* 1995; 674: 55-62.
202. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma.* 1996;13(10):557-68.

203. Ritter K, Jung K, Dolderer C, Appel D, Oswald CC, Ritz U, et al. Early Reciprocal Effects in a Murine Model of Traumatic Brain Injury and Femoral Fracture. *Mediators of Inflammation*. 2021;2021:1-14.
204. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S, et al. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. 2020.
205. Carl Roth GmbH. Infobroschuere Hämatoxylin/Eosin-Färbung H&E. 2022.
206. Hauk A. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit*. 2013;43(5):278-.
207. Rich JT, Neely JG, Paniello RC, Voelker CC, Nussenbaum B, Wang EW. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;143(3):331-6.
208. Zwiener I, Blettner M, Hommel G. Survival Analysis. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2011.
209. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*,. 1958;53:457-81.
210. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013(75):e2609.
211. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 1994;11.
212. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. 2010;189(2):180-5.
213. Lu J, Moochhala S, Kaur C, Ling E. Cellular Inflammatory Response Associated with Breakdown of the Blood-Brain Barrier After Closed Head Injury in Rats. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*. 2001;18:399-408.
214. Kuang F, Wang BR, Zhang P, Fei LL, Jia Y, Duan XL, et al. Extravasation of blood-borne immunoglobulin G through blood-brain barrier during adrenaline-induced transient hypertension in the rat. *Int J Neurosci*. 2004;114(6):575-91.
215. Choi BY, Jang BG, Kim JH, Lee BE, Sohn M, Song HK, et al. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. *Brain Res*. 2012;1481:49-58.
216. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke*. 2001;32(5):1208-15.
217. Lier J, Streit WJ, Bechmann I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*. 2021;10(9).
218. Lei J, Gao G, Feng J, Jin Y, Wang C, Mao Q, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2015;19:362.
219. Preston AN, Cervasio DA, Laughlin ST. Chapter Six - Visualizing the brain's astrocytes. In: Shukla AK, editor. *Methods in Enzymology*. 622: Academic Press; 2019. p. 129-51.

220. Sun D, Jakobs TC. Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist*. 2012;18(6):567-88.
221. Aliyu M, Zohora FT, Anka AU, Ali K, Maleknia S, Saffarioun M, et al. Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *Int Immunopharmacol*. 2022;111:109130.
222. Yang SH, Gangidine M, Pritts TA, Goodman MD, Lentsch AB. Interleukin 6 mediates neuroinflammation and motor coordination deficits after mild traumatic brain injury and brief hypoxia in mice. *Shock*. 2013;40(6):471-5.
223. Zhang H, Zhang X, Chai Y, Wang Y, Zhang J, Chen X. Astrocyte-mediated inflammatory responses in traumatic brain injury: mechanisms and potential interventions. *Front Immunol*. 2025;16:1584577.
224. Zhao JY, Zhou Y, Zhou CW, Zhan KB, Yang M, Wen M, et al. Revisiting the critical roles of reactive microglia in traumatic brain injury. *Int J Surg*. 2025;111(6):3942-78.
225. Ozen I, Ruscher K, Nilsson R, Flygt J, Clausen F, Marklund N. Interleukin-1 Beta Neutralization Attenuates Traumatic Brain Injury-Induced Microglia Activation and Neuronal Changes in the Globus Pallidus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2).
226. Flygt J, Ruscher K, Norberg A, Mir A, Gram H, Clausen F, et al. Neutralization of Interleukin-1beta following Diffuse Traumatic Brain Injury in the Mouse Attenuates the Loss of Mature Oligodendrocytes. *J Neurotrauma*. 2018;35(23):2837-49.
227. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):57-64.
228. Griemert EV, Schwarzmaier SM, Hummel R, Gölz C, Yang D, Neuhaus W, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 augments damage by impairing fibrinolysis after traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2019;85(5):667-80.
229. Shaikh SB, Balaya RDA, Dagamajalu S, Bhandary YP, Unwalla H, Prasad TSK, et al. A signaling pathway map of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1/SERPINE-1): a review of an innovative frontier in molecular aging and cellular senescence. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):544.
230. Bermpohl D, You Z, Lo EH, Kim H-H, Whalen MJ. TNF Alpha and Fas Mediate Tissue Damage and Functional Outcome after Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2007;27(11):1806-18.
231. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1999;10(2):119-30.
232. Zhang M, Xie J, Ma Y, Wang L, Liu L, Zhang P, et al. TNF- $\alpha$  in traumatic brain injury: a bidirectional effect in regulating neuroimmune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2025;82(1):372.
233. Gonzalez Caldito N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. *Front Immunol*. 2023;14:1213448.
234. Gyoneva S, Ransohoff RM. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):471-80.

235. Akinrinmade OA, Chetty S, Daramola AK, Islam MU, Thepen T, Barth S. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomedicines*. 2017;5(3).
236. Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol*. 2022;143(2):179-224.
237. Li J, Yang Y, Zhao C, Zhao J, Wang X, Ye S, et al. Microglial C/EBP $\beta$ -Fcgr1 regulatory axis blocking inhibits microglial pyroptosis and improves neurological recovery. *J Neuroinflammation*. 2025;22(1):29.
238. Ley K, Pramod AB, Croft M, Ravichandran KS, Ting JP. How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol*. 2016;7:204.
239. Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):690-4.
240. Del Rosso M, Fibbi G, Matucci Cerinic M. The urokinase-type plasminogen activator system and inflammatory joint diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 1999:485-98.
241. Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator is a modulator of synaptic plasticity in the central nervous system: implications for neurorepair in the ischemic brain. *Neural Regen Res*. 2020;15(4):620-4.
242. Morales D, McIntosh T, Conte V, Fujimoto S, Graham D, Grady MS, et al. Impaired fibrinolysis and traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2006;23(6):976-84.
243. Mori T, Wang X, Kline AE, Siao C-J, Dixon CE, Tsirka SE, et al. Reduced cortical injury and edema in tissue plasminogen activator knockout mice after brain trauma. *NeuroReport*. 2001;12(18):4117-20.
244. Collen D, Lijnen HR, Todd PA, Goa KL. Tissue-type plasminogen activator. A review of its pharmacology and therapeutic use as a thrombolytic agent. *Drugs*. 1989;38(3):346-88.
245. Kruithof EK, Dunoyer-Geindre S. Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2014;112(2):243-54.
246. Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci*. 2009;32(1):48-55.
247. Pu H, Shi Y, Zhang L, Lu Z, Ye Q, Leak RK, et al. Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(18):9115-24.
248. Hijazi N, Abu Fanne R, Abramovitch R, Yarovoi S, Higazi M, Abdeen S, et al. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice. *Blood*. 2015;125(16):2558-67.
249. Luo S, Du S, Tao M, Cao J, Cheng P. Insights on hematopoietic cell kinase: An oncogenic player in human cancer. *Biomed Pharmacother*. 2023;160:114339.
250. Smolinska MJ, Page TH, Urbaniak AM, Mutch BE, Horwood NJ. Hck tyrosine kinase regulates TLR4-induced TNF and IL-6 production via AP-1. *The Journal of Immunology*. 2011;187(11):6043-51.

251. Guo M, Duan Y, Dai S, Li J, Chen X, Qu L, et al. Structural study of ponatinib in inhibiting SRC kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;598:15-9.
252. Zhou Y, Feng Z, Cao F, Liu X, Xia X, Yu C-h. Abl-mediated PI3K activation regulates macrophage podosome formation. *Journal of cell science*. 2020;133(11):jcs234385.
253. Okada K, Arai S, Itoh H, Adachi S, Hayashida M, Nakase H, et al. CD68 on rat macrophages binds tightly to S100A8 and S100A9 and helps to regulate the cells' immune functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100(5):1093-104.
254. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993;81(6):1607-13.
255. Gordon S. Biology of the macrophage. *J Cell Sci Suppl*. 1986;4:267-86.
256. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017;97(1):4-13.
257. Appel D, Hummel R, Weidemeier M, Endres K, Götz C, Schäfer MKE. Pharmacologic Inhibition of ADAM10 Attenuates Brain Tissue Loss, Axonal Injury and Pro-inflammatory Gene Expression Following Traumatic Brain Injury in Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:661462.
258. Sifringer M, Stefovská V, Zentner I, Hansen B, Stepulak A, Knaute C, et al. The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2007;25(3):526-35.
259. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2004;90(3):724-33.
260. Margotti W, Giustina AD, de Souza Goldim MP, Hubner M, Cidreira T, Denicol TL, et al. Aging influences in the blood-brain barrier permeability and cerebral oxidative stress in sepsis. *Exp Gerontol*. 2020;140:111063.
261. Chen S, Chen H, Du Q, Shen J. Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. *Front Physiol*. 2020;11:433.
262. Jha MK, Lee S, Park DH, Kook H, Park KG, Lee IK, et al. Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;49:135-56.
263. Jaber SA, Cohen A, D'Souza C, Abdulrazzaq YM, Ojha S, Bastaki S, et al. Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:112002.
264. Böhm JK, Schaeben V, Schäfer N, Güting H, Lefering R, Thorn S, et al. Extended Coagulation Profiling in Isolated Traumatic Brain Injury: A CENTER-TBI Analysis. *Neurocrit Care*. 2022;36(3):927-41.
265. Han X, Chai Z, Ping X, Song LJ, Ma C, Ruan Y, et al. In vivo Two-Photon Imaging Reveals Acute Cerebral Vascular Spasm and Microthrombosis After Mild Traumatic Brain Injury in Mice. *Front Neurosci*. 2020;14:210.
266. Wallesch C-W. Schädel-Hirn-Trauma aus neurologischer Sicht. *Neurologie up2date*. 2019;2(04):375-88.

267. Henrich-Noack P, Riek-Burchardt M, Baldauf K, Reiser G, Reymann KG. Focal ischemia induces expression of protease-activated receptor1 (PAR1) and PAR3 on microglia and enhances PAR4 labeling in the penumbra. *Brain Res.* 2006;1070(1):232-41.
268. Timmann-Braun D, Maschke M. Kleinhirn ganz groß: Über den wichtigsten Zuarbeiter des Großhirns. Druckausgabe: ESSENER UNIKATE 22, 2003, ISBN 3-934359-22-1. 2003(22):18-29.
269. Link LS, Gölz C, Hummel R, Ritter K, Reyda S, Ruf W, et al. Protease-activated receptor 4 deficiency increases mortality, intracranial bleeding, and blood-brain barrier impairment following traumatic brain injury in mice. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* 2025;9(8):103238.
270. Hamilton JR, Cornelissen I, Coughlin SR. Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2004;2(8):1429-35.
271. Lee RH, Kawano T, Grover SP, Bharathi V, Martinez D, Cowley DO, et al. Genetic deletion of platelet PAR4 results in reduced thrombosis and impaired hemostatic plug stability. *J Thromb Haemost.* 2022;20(2):422-33.
272. French SL, Hamilton JR. Perinatal lethality of Par4(-/-) mice delivered by primiparous dams reveals spontaneous bleeding in mice without platelet thrombin receptor function. *Platelets.* 2018;29(2):196-8.
273. Schwarzmaier SM, de Chaumont C, Balbi M, Terpolilli NA, Kleinschnitz C, Gruber A, et al. The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI. *J Neurotrauma.* 2016;33(17):1634-44.
274. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N. Temporal Profile of Thrombogenesis in the Cerebral Microcirculation after Traumatic Brain Injury in Mice. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA.* 2010;27:121–30.
275. Stein SC, Graham DI, Chen XH, Smith DH. Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2004;54(3):687-91; discussion 91.
276. Hawkins P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim.* 2002;36(4):378-95.
277. Ye Y, Xin XY, Zhang HL, Fan RW, Zhu YT, Li D. A modified mouse model of haemorrhagic transformation associated with tPA administration after thromboembolic stroke. *Heliyon.* 2023;9(1):e13102.
278. Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Perez de la Ossa N, Davalos A, et al. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke.* 2011;42(1):196-203.
279. McKee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol.* 2015;127:45-66.
280. Cernak I. Animal Models of Head Trauma. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2005;2:410 – 22.

281. Joo H, Bae J, Park JW, Lee BJ, Lee BD, Bu Y. Modified Protocol to Enable the Study of Hemorrhage and Hematoma in a Traumatic Brain Injury Mouse Model. *Front Neurol.* 2021;12:717513.
282. Shen LJ, Zhou J, Guo M, Yang CS, Xu QC, Lv QW, et al. Serum lipocalin-2 concentrations and mortality of severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta.* 2017;474:130-5.
283. Yu F, Saand A, Xing C, Lee JW, Hsu L, Palmer OP, et al. CSF lipocalin-2 increases early in subarachnoid hemorrhage are associated with neuroinflammation and unfavorable outcome. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2021;41(10):2524-33.
284. Liu J, Pang SY, Zhou SY, He QY, Zhao RY, Qu Y, et al. Lipocalin-2 aggravates blood-brain barrier dysfunction after intravenous thrombolysis by promoting endothelial cell ferroptosis via regulating the HMGB1/Nrf2/HO-1 pathway. *Redox Biol.* 2024;76:103342.
285. Mondal A, Bose D, Saha P, Sarkar S, Seth R, Kimono D, et al. Lipocalin 2 induces neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction through liver-brain axis in murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):201.
286. Hubbard WB, Sim MMS, Saatman KE, Sullivan PG, Wood JP. Tissue factor release following traumatic brain injury drives thrombin generation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2022;6(4):e12734.
287. Zelaya H, Rothmeier AS, Ruf W. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *J Thromb Haemost.* 2018;16(10):1941-52.
288. Howard BM, Miyazawa BY, Dong W, Cedron WJ, Vilardi RF, Ruf W, et al. The tissue factor pathway mediates both activation of coagulation and coagulopathy after injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015;79(6):1009-13; discussion 14.
289. Göbel K, Eichler S, Wiendl H, Chavakis T, Kleinschnitz C, Meuth SG. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders-A Systematic Review. *Front Immunol.* 2018;9:1731.
290. Liu S, Li S, Yuan D, Wang E, Xie R, Zhang W, et al. Protease activated receptor 4 (PAR4) antagonists: Research progress on small molecules in the field of antiplatelet agents. *Eur J Med Chem.* 2021;209:112893.
291. Renna SA, Michael JV, Kong X, Ma L, Ma P, Nieman MT, et al. Human and mouse PAR4 are functionally distinct receptors: Studies in novel humanized mice. 2022.
292. Renna SA, McKenzie SE, Michael JV. Species Differences in Platelet Protease-Activated Receptors. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9).

## 8 Anhang

### 8.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
„Falcon®“ (25 ml + 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OE
Collection tubes (2 ml)	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Dako pen	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Deckgläser	Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
Einstreu Lignocel® FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH & Co KG, Rosenberg, DE
Einwegpipetten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Entellan Eindeckmedium	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Holzwattestäbchen 15 cm	WIROS Wilfried Rosbach GmbH, Willich, DE
Kompressen 10 x 10 cm	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Microtom Klingen - C35	Feather, Köln, DE
Mikroskop Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Mini-Spinsäule	Qiagen, Hilden, DE
MoliCare® Premium	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DE
NaCl 0,9 %	B. Braun, Melsungen, DE
Nitril Handschuhe	VWR International, LLC, Leuven, B
PCR-Klebefolie	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Plain Skirted Tube, Natural, 0,5 ml	StarLab, Ahrensburg, DE
Prolene 6-0	Ethicon, San Lorenzo, USA
Qiazol Lyse-Reagens	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Ratte/Maus Haltung – Alleinfuttermittel	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Reagenzgefäße	StarLab, Ahrensburg, DE
RNase freies Wasser	Fermentas, St. Leon Rot, DE
RNaseZap™	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, LTU
Safe-lock Tubes (1,5 + 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Saugtupfer Sugi®	Questalpha, Eschenburg, DE
Trennsäule	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Xylol	PanReac/AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

8.2 Geräte**Tabelle 5: Übersicht verwendeter Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CCI-Impaktor Model #39463923</b>	Leica, Richmond, USA
<b>Cryostar™ NX70 Kryostat</b>	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
<b>Gewebehomogenisator MM 300</b>	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
<b>Heizblock ThermoMixer TM Comfort</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Homeothermic Monitoring System Thermostar 69027</b>	RWD, TX, USA
<b>Inkubator Babytherm IC8000</b>	Dräger, Lübeck, DE
<b>LightCycler® 480</b>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<b>Magnetrüher IKAMAG® RET</b>	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, DE
<b>Mastercycler Gradient</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Mastermill MM300</b>	Microtrac Retsch GmbH, Haan, DE
<b>Mikropipetten</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Mikroskopiekamera Axio Cam 105</b>	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE
<b>Mikrozentrifuge Mini Star Silverline</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
<b>Ohrlochzange</b>	Zoonlab, Castrop-Rauxel, DE
<b>Operations-Mikroskop Technoskop OPMI 1-FC 459909</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
<b>Photometer NanoVue System</b>	GE Healthcare, Illinois, USA
<b>Pipetten (verschiedene Größen)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Plattformschüttler Unimax 2010</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
<b>Qiagen Handbuch (2014)</b>	Qiagen GmbH, Hilden, DE
<b>Rota-Rod LE8200</b>	Panlab Harvard Apparatus, Cornella, ES
<b>Stereomikroskop Stemi 305</b>	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE
<b>Stereotaktischer Rahmen</b>	Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
<b>Temperaturhomöostasegerät (Wärmeplatte)</b>	Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE
<b>Temperatursonde Physitemp BAT-12</b>	Physitemp, New Jersey, USA
<b>Tierhaltungsschrank, UniProtect 3378- V02 THF</b>	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Tischwaage DIPSE TP-2000</b>	SSR Produkt GmbH & Co KG, Oldenburg, DE
<b>Ultraschall Luftbefeuchter BH-860E</b>	Honeywell, Offenbach am Main, DE
<b>Uni-Drive N Mikrobohrer</b>	Paggen, Starnberg, DE
<b>Vapor 19.3 Isofluran</b>	Drägerwerk AG, Lübeck, DE
<b>Vortex Reax control (Laborschüttler)</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
<b>Waage CS 200</b>	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA
<b>Wasserbad 1086</b>	LAUDA-GFL GmbH, Lauda-Königshofen, DE
<b>Zentrifuge Eppendorf 5804 R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Zentrifuge Megafuge 1.0</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
<b>Zentrifuge Micro Star 17 R</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

### 8.3 Chemikalien

**Tabelle 6: Übersicht verwendeter Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>3-3' Diaminobenzidine</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
<b>Aqua destillata, sterile</b>	Braun, Melsungen, DE
<b>Chloroform</b>	Sigma, St. Louis, MO, USA
<b>Epredia™ Richard-Allan Scientific™ Neg 50™ Gefrierschnittmedium</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Ethanol 100%</b>	AppliChem, Darmstadt, DE
<b>Ethanol 70 %</b>	AppliChem, Darmstadt, DE
<b>Ethanol 80 %</b>	AppliChem, Darmstadt, DE
<b>Ethanol 96 %</b>	AppliChem, Darmstadt, DE
<b>Isopropanolol 100%</b>	Sigma, St. Louis, MO, USA
<b>Isopropanolol 70 %</b>	Sigma, St. Louis, MO, USA
<b>Isopropanolol 80 %</b>	Sigma, St. Louis, MO, USA
<b>Kresylviolett (Acetat)</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Paraformaldehyd (PFA) 4 %</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>PBS, Dulbecco Trockensubstanz</b>	Biochrom, Berlin, DE
<b>Roti®Histokitt</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
<b>Roti®Histol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>RPE-Puffer</b>	Universal Kit, Qiagen, Hilden, DE
<b>RWT-Puffer</b>	Universal Kit, Qiagen, Hilden, DE
<b>Stickstoff, flüssig</b>	Air Liquide, Düsseldorf, DE
<b>Triton X-100</b>	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
<b>Trockeneis</b>	Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, DE
<b>Wasserstoffperoxid 3 %</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
<b>Wipeout Puffer</b>	Universal Kit, Qiagen, Hilden, DE

#### 8.4 Arzneimittel

**Tabelle 7: Übersicht verwendeter Arzneimittel**

<b>Arzneimittel</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Bepanthen-Augensalbe®</b>	Bayer Vital, Leverkusen, DE (Augensalben gegen Austrocknen)
<b>Histoacryl® Gewebekleber</b>	Braun, Melsungen, DE
<b>Isofluran-Piramal, Wirkstoff: Isofluran</b>	Piramal Critical Care B.V., TR Voorschoten, NL

#### 8.5 Antikörper

**Tabelle 8: Übersicht verwendeter Antikörper**

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Goat-anti-mouse-HRP-linked-AK	Ziege	1:500	SC-2031, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
<b>Sekundärer Antikörper</b>			
VECTASTAIN® ABC-Kit	-	-	Vector Laboratories, Inc., CA, USA

## 8.6 Kits

**Tabelle 9: Übersicht verwendeter Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix Plus ROX Vial, AB-4166</b>	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
<b>Färbekit: Hämatoxylin &amp; Eosin (HE)</b>	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, DE
<b>PrimaQuant qPCR-CYBR-Green-MasterMix Blue</b>	Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach, DE
<b>QuantiTect Reverse Transcription Kit</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>RNeasy Plus Universal Kit</b>	Qiagen, Hilden, DE

## 8.7 Puffer und Lösungen

**Tabelle 10: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen**

<b>Chemikalie</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>„Phosphat buffered Saline“ + TX100 (PBST)</b>	PBS + 0,1 % Triton X-100
<b>„Phosphat buffered saline“ (PBS)</b>	9,55 g D-PBS in 1 l Aqua dest.
<b>Kresylviolett</b>	5 mg Kresylviolett in 100 ml Ethanol (100 %), bei 50 °C für 30 min rühren, auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen, anschließend filtrieren
<b>Paraformaldehyd 4 %</b>	70 °C 235 ml Aqua dest. + 18.8 g PFA + 0.47 ml 10 M NaOH, Lösung filtern + 235 ml 0.2 M Phosphatpuffer

8.8 Primer**Tabelle 11: Übersicht verwendeter Primer**

<b>Genname, (Amplikon- länge (bp), Annealing- Temperatur)</b>	<b>Oligonukleotidsequenz 5´-3´ (fw: forward, rev: reverse)</b>	<b>Kits (inklusive Hersteller)</b>	<b>Genbank Nummer</b>
<b><i>Aif1</i> (144 bp, 58 °C)</b>	fw: ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA rev: CAGCATTCGCTTCAAGGACATA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_019467
<b><i>Cd68</i> (113 bp, 58 °C)</b>	fw: CCCACCTGTCTCTCTCATTTTC rev: CACATTGTATTCCACCGCC	PrimaQuant Cybr SL9902B (Steinbrenner Laborsysteme)	NM_001291058.1
<b><i>Fcgr1</i> (211 bp, 58 °C)</b>	fw: CCACAATGATTGGCTGCTACT rev: CGTGCCTGAGCAGTGGTA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_010186.5
<b><i>Gfap</i> (120 bp, 58 °C)</b>	fw: CGGAGACGCATCACCTCTG rev: TGGAGGAGTCATTCGAGACAA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_001131020
<b><i>Hck</i> (299 bp, 58 °C)</b>	fw: TGA AGA AGG CAG CAA GCA G rev: GCA GGA TAC CAA AGG ACC AG	PrimaQuant Cybr SL9902B (Steinbrenner Laborsysteme)	NM_001172117.1
<b><i>I11β</i> (348 bp, 55 °C)</b>	fw: GTGCTGTCGGACCCATATGAG rev: CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC Cy5-CAGCTG GAGAGTGTGGATCCCAAG C--PH FL-TAATGAAAGACGGCACACCCACCC	Light Cyclor 480 Probes Master 04887301001 (Roche)	NM_008361

## Anhang

<b>Genname, (Amplikon- länge (bp), Annealing- Temperatur)</b>	<b>Oligonukleotidsequenz 5´-3´ (fw: forward, rev: reverse)</b>	<b>Kits (inklusive Hersteller)</b>	<b>Genbank Nummer</b>
<b><i>IIf6</i> (471 bp, 55 °C)</b>	fw: TCGTGAAAA TGAGAAAAGAGTTG rev: TATGCT TAGGCATAACGCACTAG Cy5-- TGCTCTCCTAACAGATAAGCTGGAGTC AC--PH CATAAAATAGTCCTTCTACCCCAATTT CC-FL	Light Cycler 480 Probes Master 04887301001 (Roche)	NM_031168
<b><i>Lcn2</i> (239 bp, 58 °C)</b>	fw: TGGCCCTGAGTGTGATGTG rev: CTCTTGTAGCTCATAGATGGTGC	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_008491
<b><i>Mmp9</i> (106 bp, 58 °C)</b>	fw: AAGTCTCAGAAGGTGGAT rev: AATAGGCTTTGTCTTGGTA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_013599
<b><i>Mpo</i> (220 bp, 58 °C)</b>	fw: ACACCCTCATCCAACCCTTC rev: TGCTCAAATAGTCGCTCCC	PrimaQuant Cybr SL9902B (Steinbrenner Laborsysteme)	NM_010824.2
<b><i>Plat</i> (172 bp, 58 °C)</b>	fw: ACAACGACATCGCATTACTG rev: TCAGAGAAGAATGGAGACGA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_008872
<b><i>Plau</i> (138 bp, 58 °C)</b>	fw: AACTGCTTCATTCAACTCC rev: CTGTCTTCCCTGTAGTATTCGT	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_008873
<b><i>Ppia</i> (146 bp, 58 °C)</b>	fw: GCGTCTSCTTCGAGCTGTT rev: RAAGTCACCACCCTGGCA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_008907

<b>Genname, (Amplikon- länge (bp), Annealing- Temperatur)</b>	<b>Oligonukleotidsequenz 5´-3´ (fw: forward, rev: reverse)</b>	<b>Kits (inklusive Hersteller)</b>	<b>Genbank Nummer</b>
<b><i>Serpine1</i> (174 bp, 58 °C)</b>	fw: GGAYGTGARCTCATAGACA rev: TGGTCGGAAAGACTTGTGA GCCTCCTCATCCTgCCTAAgTTCTCTC- FL LC Red640- GGAGACTGAAGTGGACCTCAGAGGGC C--PH	Maxima ProbeqPCR Master Mix K0262 (Thermo Scientific)	NM_008871
<b><i>Tnfa</i> (212 bp, 62 °C)</b>	fw: TCTCATCAGTTCTATGGCCC rev: GGGAGTAGACAAGGTACAAC	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB- 4166 (Thermo Scientific)	NM_013693

## 8.9 Software

**Tabelle 12: Übersicht verwendeter Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Adobe Illustrator 2020</b>	Adobe Inc., San José, CA, USA
<b>Adobe Photoshop 2020</b>	Adobe Inc., San José, CA, USA
<b>BioRender</b>	BiorRender, Ontario, Kanada
<b>EndNote 20</b>	Clarivate™, Philadelphia, USA
<b>GraphPad Prism 9</b>	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
<b>ImageJ, Version 1.53a</b>	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
<b>LightCycler® 480, Version 4.5</b>	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>Microsoft Word</b>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>Zen 2.0 blue edition</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE

## 9 Publikationen

**Link LS**, Gölz C, Hummel R, Ritter K, Reyda S, Ruf W, et al. Protease-activated receptor 4 deficiency increases mortality, intracranial bleeding, and blood-brain barrier impairment following traumatic brain injury in mice. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2025;9(8):103238ISSN 2475-0379

Wang S, Hall C, Wang Y, **Link L**, Zhang Y, Schlägel A, et al. Intermittent Propofol Exposure Induces Neurodevelopmental Alterations in Human Brain Organoids. *Cell Mol Neurobiol*. 2026.

## 10 Danksagung



## **11 Tabellarischer Lebenslauf**