

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Neurodegeneration

Mit Hilfe der histologischen Untersuchung sollte festgestellt werden, ob unter dem Einfluss eines Status epilepticus die unter physiologischen Bedingungen im Gehirn der 7 Tage alten Ratte stattfindende Neurodegeneration beeinflusst wird, und ob die zusätzliche Gabe von Diazepam die beobachteten Veränderungen modifiziert.

Die Analyse der Hirnschnitte erfolgte mittels stereologischer Dissektionsmethode nach *Gundersen* und wurde bereits im Abschnitt 2.2.2 ausführlich erläutert. Pro Tier wurde aus dem für die einzelnen Regionen ermittelten Wert ein Summenscore für das gesamte Gehirn errechnet. Diese Scores bildeten die Grundlage für den quantitativen Vergleich der Neurodegeneration zwischen den Versuchsgruppen.

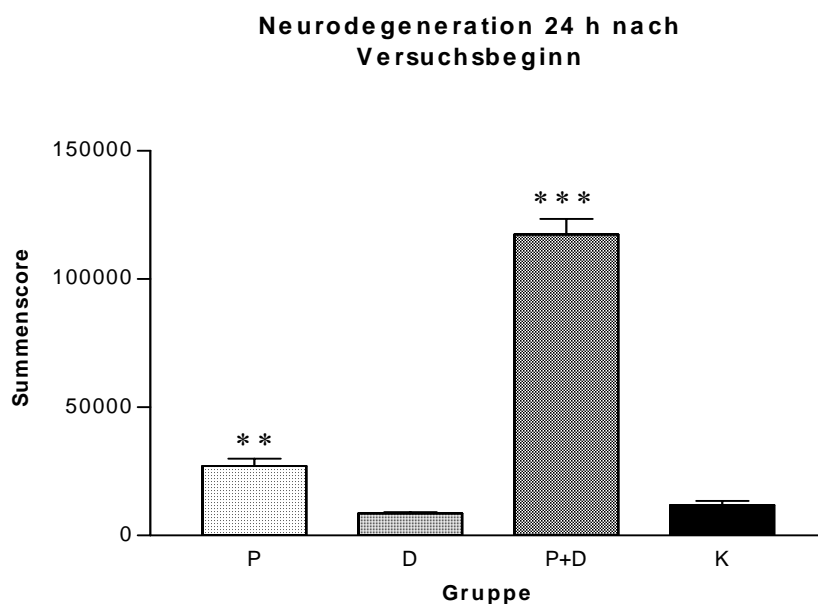


Abb. 4: Summenscores der Versuchsgruppen im Vergleich, Perfusion 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen Zunahme der histologisch nachweisbaren Neurodegeneration durch den Status epilepticus, noch stärkere degenerative Veränderungen bei zusätzlicher Gabe von Diazepam. **P**=Pilocarpin (200mg/kg), **D**=Diazepam (5mg/kg), **P+D**=Pilocarpin (200mg/kg) und Diazepam (5mg/kg), **K**=Kontrolle. Ergebnisse der statistischen Analyse: \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ .

In der Versuchsgruppe der Pilocarpin-Tiere zeigte sich, dass 24 Stunden nach Auslösung des Status epilepticus die Anzahl degenerierter Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht war ( $P_{P:K} < 0,01$ ). Insgesamt wurde eine Zunahme der Degeneration um das 2,3fache festgestellt. Unter den analysierten Hirnregionen war der Thalamus die Region, in der die größte

Dichte degenerierter Zellen zu finden war.

Wurden die Tiere mit Diazepam in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht behandelt, konnte 24 Stunden nach Injektion des Medikaments eine im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen unveränderte Neurodegeneration festgestellt werden ( $P_{D:K} > 0,05$ ).

Dagegen führte die Verabreichung von Diazepam 2 Stunden nach Auslösung des Status epilepticus im Intervall von 24 Stunden zu einer massiven Zunahme degenerierter Zellen ( $P_{P+D:K} < 0,001$ ). Die Auszählung der Tiere dieser Versuchsgruppe ergab eine Steigerung um das 9,95fache des physiologischen Wertes.

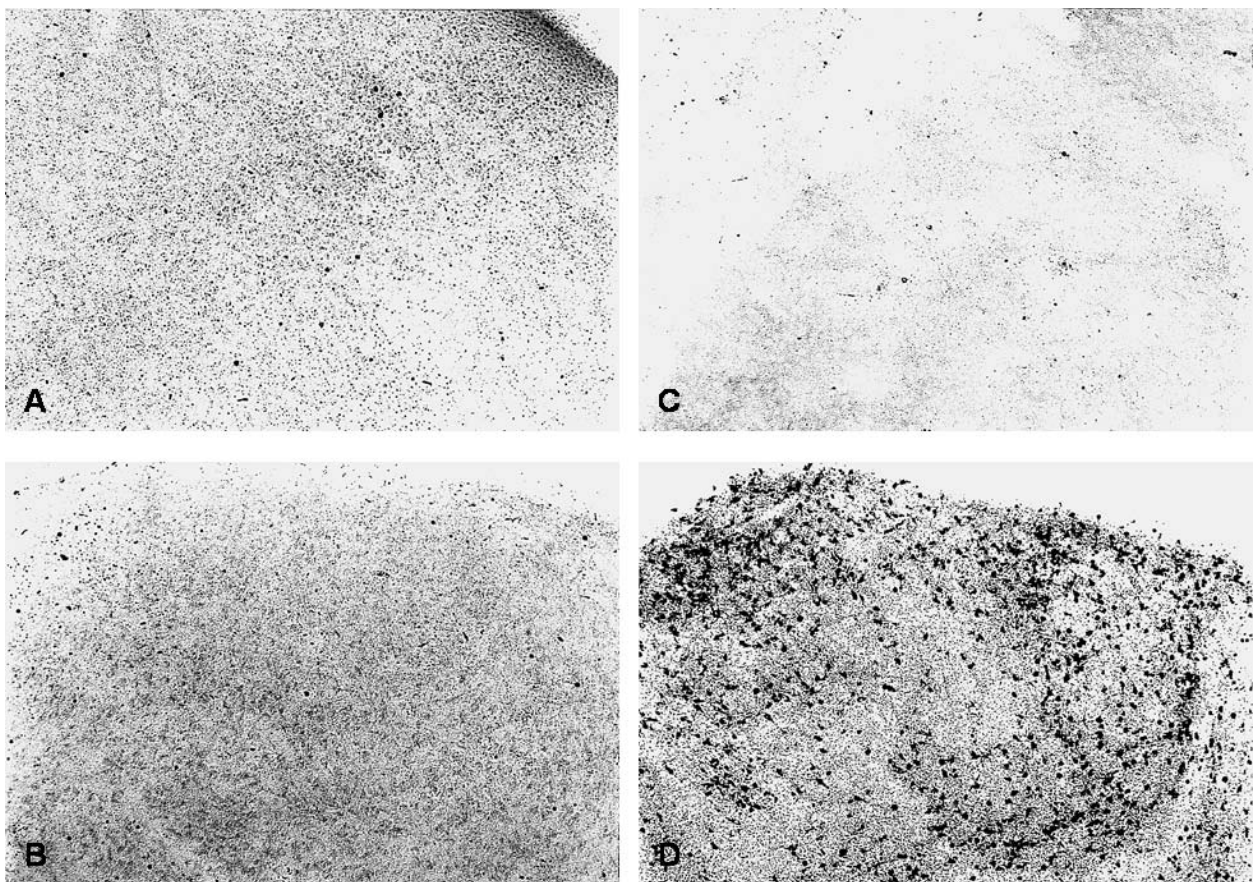


Abb. 5: Thalamuspräparate in der Kupfer-Silber-Färbung: Neurodegeneration im Gehirn der 8 Tage alten Ratte 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Degenerierte Zellen stellen sich als schwarze Punkte dar. **A:** Kontrolle, **B:** Pilocarpin (200mg/kg), **C:** Diazepam (5mg/kg), **D:** Pilocarpin (200mg/kg) und Diazepam (5mg/kg) kombiniert. Vergrößerung 10fach.

Da die Kupfer-Silber-Färbung degenerierte Zellen unabhängig von der Form des Zelltodes markiert, wurde zusätzlich die elektronenmikroskopische Untersuchung einiger Präparate durchgeführt, um die beobachteten Zelluntergänge morphologisch näher charakterisieren zu

können.

### 3.2 Morphologische Analyse

In der ultrastrukturellen Analyse zeigten die Zellen folgende morphologische Charakteristika: frühe Stadien des Zelluntergangs gingen mit einer Verklumpung des Chromatins einher, das sich in Form schwarzer Kugeln entlang der Kernmembran anordnete. In späteren Stadien der Zelldegeneration fand sich eine Fragmentierung der Kernmembran, wodurch es zur Vermengung von Zytoplasma und Nukleoplasma kam. Die Zelle begann zu schrumpfen und entwickelte eine wellige Oberfläche mit vereinzelt erkennbaren Ausstülpungen, in denen sich Zellinhalt befand. In den Präparaten der Pilocarpin-Tiere und Pilocarpin/Diazepam-Gruppe zeigten die untersuchten Zellen darüber hinaus geschwollene dendritische Elemente.

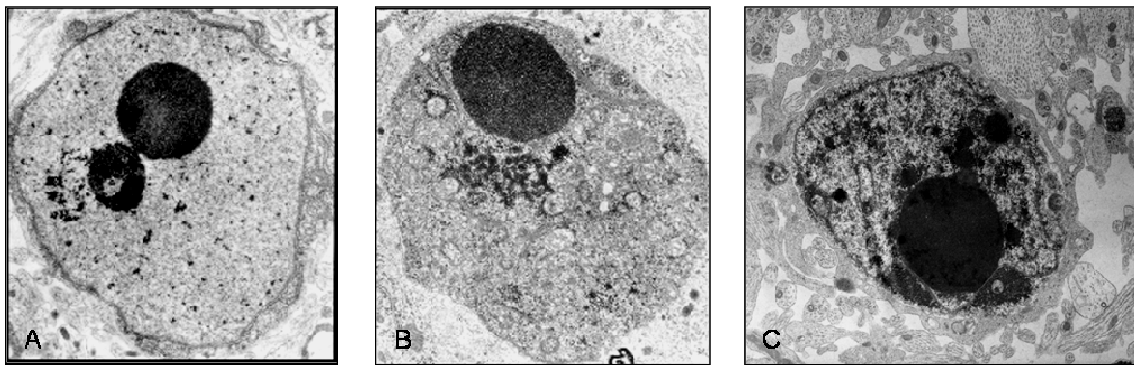


Abb. 6: Elektronenmikroskopie einzelner degenerierter Zellen aus Thalamuspräparaten der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe. **A:** Chromatinkondensation und beginnende Vermischung von Kerninhalt und Zytoplasma nach Fragmentierung der nukleären Membran, wobei das Chromatin noch relativ zentral in der Zelle lokalisiert ist. **B:** Fortgeschritteneres Stadium, am dunkler gefärbten Zytoplasma ist die stärkere Durchmischung nukleärer und zytoplasmatischer Bestandteile erkennbar. Die große Chromatinkugel im oberen Bildbereich ist bereits der Zellmembran angelagert. **C:** Der Übertritt von Kerninhalt in das Zytoplasma durch die fragmentierte Kernmembran ist deutlich erkennbar. Das Chromatin lagert sich in Kugelform der Zytoplasmamembran an. Im unteren Bildbereich deuten sich Ausstülpungen der Kernmembran an. Vergrößerung 9000fach.

### 3.3 Regulation von PI3K- und ERK1/2- Kaskade

Mittels Western Blot sollte untersucht werden, ob den histologischen und morphologischen Veränderungen durch einen Status epilepticus auf Proteinebene eine Regulation antiapoptotischer Kaskaden vorausgeht, und wie diese Regulation durch die Zugabe von Diazepam beeinflusst wird. Untersucht wurden einzelne Elemente der PI3K-(Akt) und der ERK1/2-Kaskade (Raf-1, ERK1/2) in der phosphorylierten (aktivierten) und nicht-phosphorylierten (inaktiven) Form. Alle Faktoren wurden zunächst in den Zeitstufen 4, 12 und 24 Stunden untersucht. Die aktivierten Formen zeigten in diesen Intervallen deutliche Konzentrationsveränderungen und wurden daher in 2 weiteren Zeitstufen betrachtet (3, 6 Stunden). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Prozentwerte, die das Verhältnis der

jeweiligen Gruppenmittelwerte zu den Kontrolltieren beschreiben (s. 2.2.4). Die Varianzanalyse erfolgte zunächst für alle Gruppenmittelwerte einer Zeitstufe mittels One-Way-Anova-Test ( $P_{3h/4h/6h/12h/24h}$ ), zwischen welchen der Versuchsgruppen signifikante Mittelwertabweichungen bestanden, wurde mit Hilfe des Student's t-Test (Newman-Keul-Test:  $P_{P:K/D:K/P+D:K}$ ) bestimmt.

Die Kupfer-Silber-Färbung hatte die höchste Dichte degenerierter Zellen im Thalamus ergeben, daher wurde für die molekularbiologische Untersuchung Gewebe des rechten Thalamus verwendet.

### 3.3.1 PI3K-Kaskade

#### *Akt*

Für den Faktor Akt ergaben sich 4 Stunden nach Auslösung des Status epilepticus folgende Werte in den Versuchsgruppen: Pilocarpin-Gruppe 108,5 % (SEM 3,4), Diazepam-Gruppe 94,6% (SEM 7,3), Pilocarpin/Diazepam-Gruppe 101,3% (SEM 2,87).

Im 12-Stunden-Intervall betragen die Werte 108,4% in der Pilocarpin-Gruppe (SEM 1,4), 104,6% in der Diazepam-Gruppe (SEM 2,2) und 108,4% in der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 2,52).

Nach 24-Stunden fanden sich Werte von 110,9% in der Pilocarpin-Gruppe (SEM 3,8), 104,2% in der Diazepam-Gruppe (SEM 0,9) und 106,1% in der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 3,5).

In keiner der Zeitstufen waren die Konzentrationsveränderungen signifikant ( $P_{4h} = 0,19$ ,  $P_{12h} = 0,15$ ,  $P_{24h} = 0,14$ ).

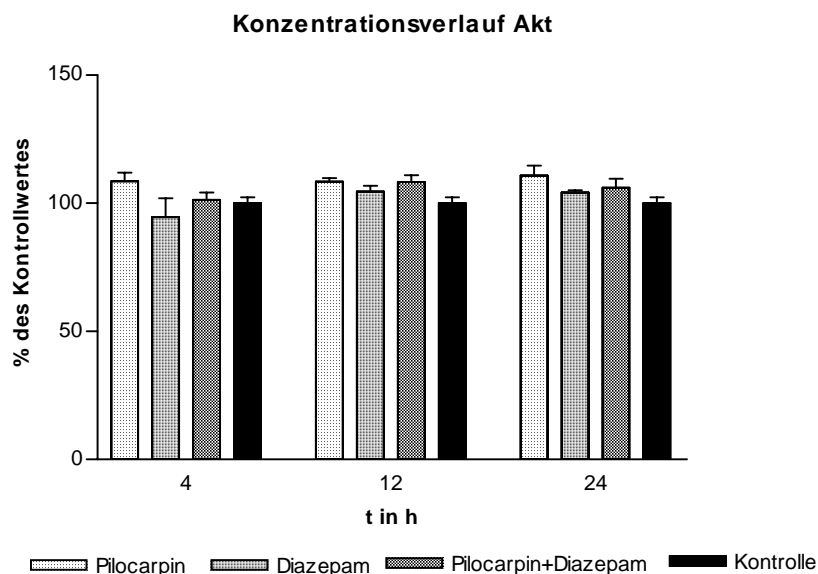


Abb. 7: Konzentrationsverlauf von Akt 4, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Darstellung der vier Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler ( $\bar{T}$ ). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich in keiner der Gruppen eine signifikante Abweichung von den Akt-Konzentrationen der Kontrolltiere.

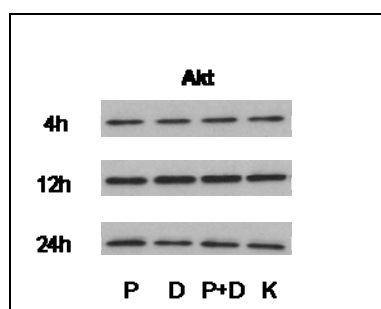


Abb. 8: Western Blot Akt 4, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.

### *P-Akt*

Im 3-Stunden-Intervall fanden sich Konzentrationsveränderungen auf 105,8% für die Pilocarpin-Gruppe (SEM 1,9), 94,6% für die Diazepam-Tiere (SEM 1,1) und 99,82% für Pilocarpin/Diazepam (SEM 1,0).

4 Stunden nach dem Krampfanfall zeigten sich Veränderungen der P-Akt-Konzentration auf 133,05% in der Pilocarpin-Gruppe (SEM 6,5), 82,5% in der Diazepam-Gruppe (SEM 4,7) und 113,45% in der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 4,9). Alle Abweichungen erwiesen sich als signifikant ( $P_{D:K} < 0,01$ ;  $P_{P:K} < 0,001$ ;  $P_{P+D:K} < 0,05$ ).

Das 6-Stunden-Intervall zeigte Werte von 92,0% für die Behandlung mit Pilocarpin (SEM 0,8),

94,3% für Diazepam (SEM 8,1), und 89,2% für Pilocarpin und Diazepam (SEM 4,4).

In der 12-Stunden-Zeitstufe fand sich für die Tiere der Pilocarpin-Gruppe der Wert 95,9% (SEM 5,4), für die Diazepam-Gruppe ein Wert von 98,2% (SEM 5,0) und für die Pilocarpin/Diazepam-Tiere ein Abfall der Konzentration auf 63,4% (SEM 7,2), der statistisch signifikant war ( $P_{P+D:K} < 0,001$ ).

Im 24-Stunden-Intervall zeigten sich P-Akt-Veränderungen auf 84,64% für die Behandlung mit Pilocarpin (SEM 6,9), 105,7% für Diazepam (SEM 1,5) und 96,8% für Pilocarpin und Diazepam (SEM 1,2). Nur die Konzentrationsveränderung in der Pilocarpin-Gruppe lag im signifikanten Bereich ( $P_{P:K} < 0,01$ ).

Im 3- und 6-Stunden-Intervall ergaben sich keine signifikanten Mittelwertabweichungen ( $P_{3h} = 0,07$ ,  $P_{6h} = 0,08$ ).

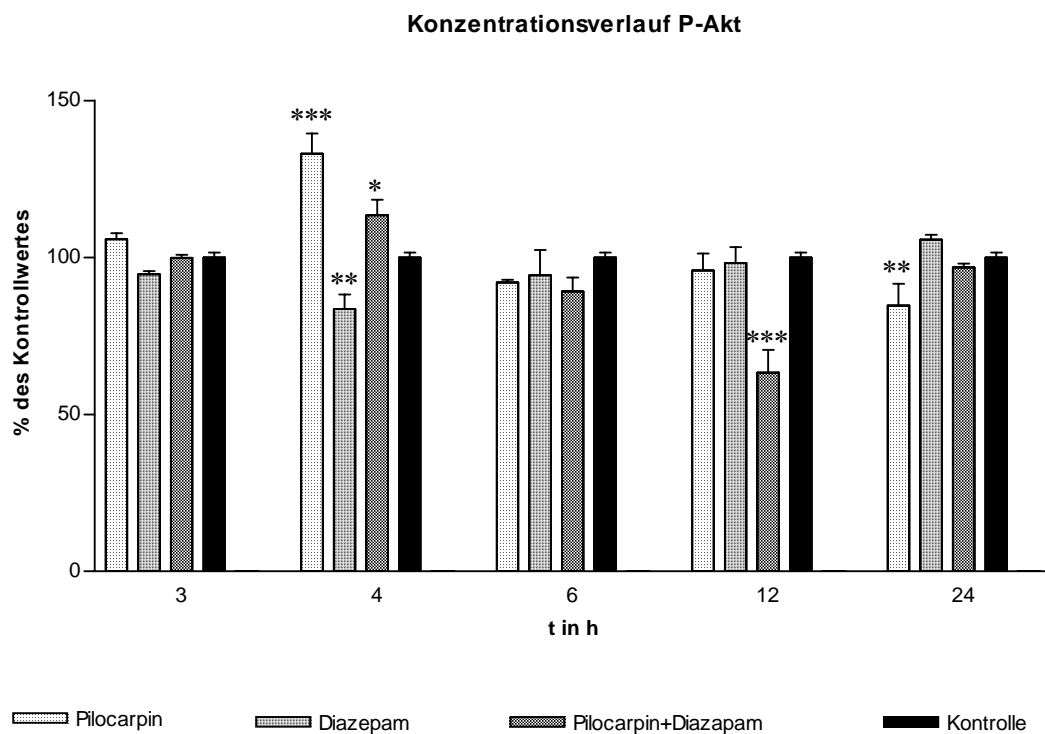


Abb. 9: Konzentrationsverlauf für P-Akt 3, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich aller Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler ( $\bar{T}$ ) und Ergebnis der Signifikanzprüfung. Signifikante Veränderungen wurden im 4-, 12- und 24-Stunden-Intervall ermittelt ( $***P < 0,001$ ;  $**P < 0,01$ ;  $*P < 0,05$ ).

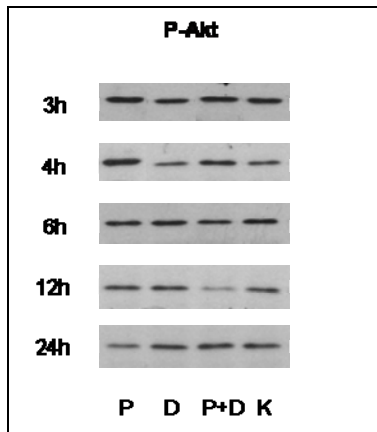


Abb. 10: Western Blot P-Akt 3, 4, 6, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.

### 3.3.2 ERK1/2-Kaskade

#### *Raf-1*

Für Raf-1 zeigte die Pilocarpin-Gruppe im 4-Stunden-Intervall 102% (SEM 6,4), die Diazepam-Gruppe 101,7% (SEM 6,3) und die Pilocarpin/Diazepam-Gruppe 99,4% (SEM 3,9).

Nach 12 Stunden fanden sich Werte von 94,2% für Pilocarpin (SEM 4,0), 102,3% für Diazepam (SEM 7,4) und 97,8% für Pilocarpin und Diazepam (SEM 7,2).

24-Stunden nach Versuchsbeginn zeigten sich Werte von 108,1% für Pilocarpin (SEM 1,7), 100,2% für Diazepam (SEM 9,62) und 92,1% in der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 2,6).

Die Mittelwertabweichungen in den einzelnen Zeitstufen erwiesen sich als nicht signifikant ( $P_{4h} = 0,97$ ,  $P_{12h} = 0,66$ ,  $P_{24h} = 0,23$ ).

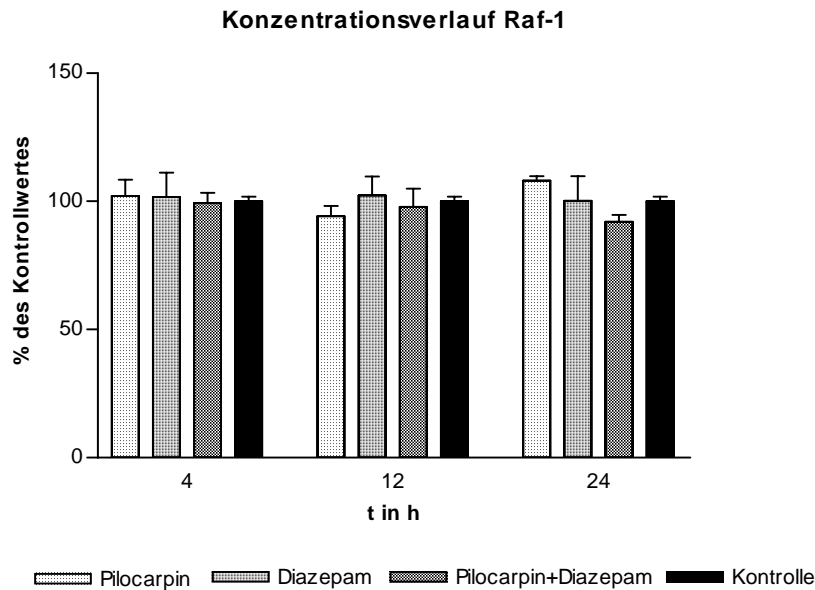


Abb. 11: Konzentrationsverlauf von Raf-1 4, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich aller Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler ( $\bar{T}$ ). Der zeitliche Verlauf zeigte in keiner der Gruppen eine signifikante Abweichung von den Raf-1-Konzentrationen der Kontrolltiere.

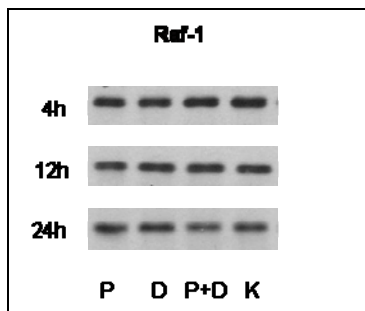


Abb. 12: Western Blot Raf-1 4, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.

### *P-Raf-1*

Die Untersuchungen zu P-Raf-1 ergaben im 3-Stunden-Intervall Konzentrationsveränderungen auf 93,2% nach Pilocarpin (SEM 5,9), auf 100,3% nach Diazepam (SEM 4,8) und auf 103,5% nach Pilocarpin/Diazepam (SEM 3,1).

Im 4-Stunden-Intervall zeigte sich für Pilocarpin ein Anstieg auf 123,3% (SEM 3,8), für Diazepam ein Abfall auf 83,2% (SEM 9,6) und für Pilocarpin/Diazepam ein Wert von 95,2% (SEM 6,8). Signifikant waren die Veränderungen der Diazepam-Tiere und der Pilocarpin-Gruppe ( $P_{D:K} < 0,05$ ,  $P_{P:K} < 0,001$ ).

Nach 6 Stunden fanden sich Werte von 101,8% für die Pilocarpin-Tiere (SEM 0,8), 96,1% für



die Gruppe der Diazepam-Tiere (SEM 7,9) und 83,3% für die Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 5,9). Die Konzentrationsveränderung der Pilocarpin/Diazepam-Versuchsgruppe war statistisch signifikant ( $P_{P+D} < 0,01$ ).

Für die Zeitstufe 12 Stunden wurden folgende Werte ermittelt: Pilocarpin-Gruppe 89,6% (SEM 5,5), Diazepam-Gruppe 99,3% (SEM 3,7), Pilocarpin/Diazepam-Gruppe 92,9% (5,1).

Nach 24 Stunden lagen die Werte der einzelnen Versuchsgruppen bei 106,7% für Pilocarpin (SEM 10,0), 96,1% für Diazepam (SEM 4,4) und 94,2% für Pilocarpin und Diazepam (SEM 1,4). Die Mittelwertabweichungen im 3-, 12- und 24-Stunden-Intervall waren statistisch nicht signifikant ( $P_{3h} = 0,19$ ,  $P_{12h} = 0,14$ ,  $P_{24h} = 0,2$ ).

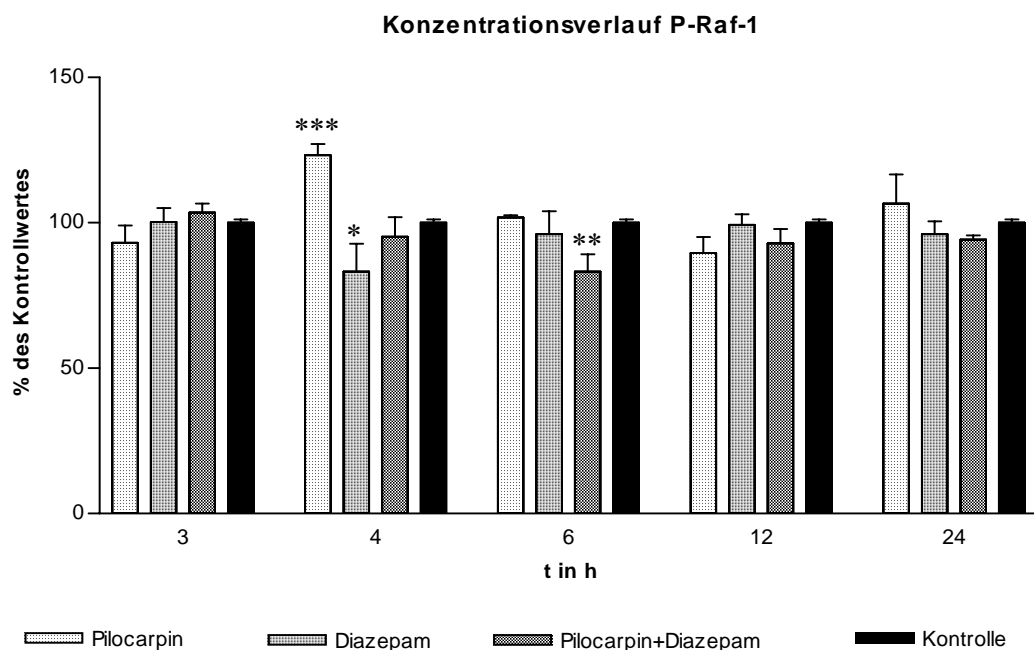


Abb. 13: Konzentrationsverlauf für P-Raf-1 3, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Darstellung aller Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler (T) und Ergebnis der statistischen Analyse. Signifikante Konzentrationsveränderungen zeigten sich 4 und 6 Stunden nach Versuchsbeginn (\*\*\*) $P < 0,001$ ; \*\*)  $P < 0,01$ ; \*)  $P < 0,05$ ).

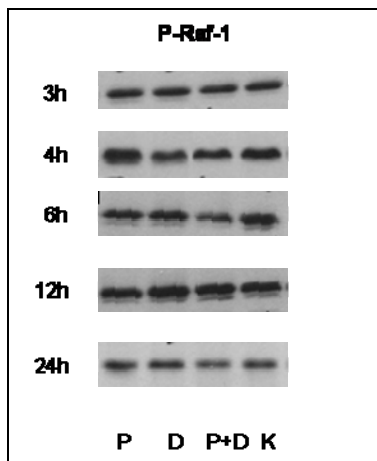


Abb. 14: Western Blot P-Raf-1 3, 4, 6, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.

### *Erk1/2*

Die Pilocarpin-Gruppe zeigte im 4-Stunden-Intervall den Wert von 88,3% (SEM 3,2), die Diazepam-Gruppe 101,2% (SEM 6,3), die Pilocarpin/Diazepam-Gruppe 92,1% (SEM 8,3).

12 Stunden nach dem Krampfereignis lagen die Tiere der Pilocarpin-Gruppe bei 108,2% (SEM 9,8), die Diazepam-Tiere bei 90,1% (SEM 5,9) die Pilocarpin/Diazepam-Tiere bei 106,1% (SEM 5,8).

Nach 24 Stunden ergab die Behandlung mit Pilocarpin 97,0% (SEM 1,7), mit Diazepam 93,4% (SEM 5,5), mit Pilocarpin und Diazepam 97,5% (SEM 3,7) im Vergleich zu den Kontrollen.

Für keine Zeitstufe lagen signifikante Konzentrationsveränderungen vor ( $P_{4h}=0,06$ ;  $P_{12h}=0,09$ ;  $P_{24h}=0,33$ ).

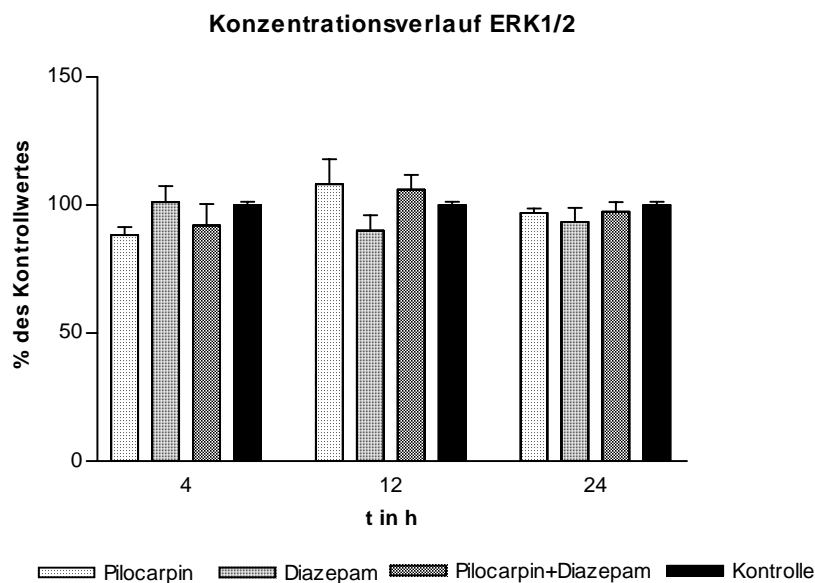


Abb. 15: Konzentrationsverlauf von ERK 4, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Darstellung aller Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler ( $\bar{T}$ ). In keiner der Gruppen zeigte sich für die Konzentration von ERK1/2 eine signifikante Abweichung von den ERK-Konzentrationen der Kontrolltiere.

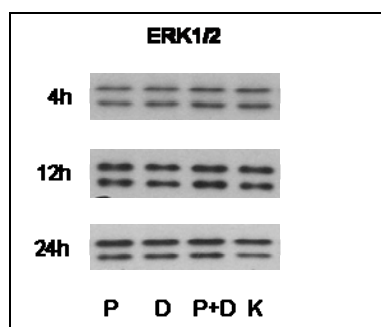


Abb. 16: Western Blot ERK1/2 4, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.

### *P-ERK1/2*

Für P-ERK1/2 zeigten die Tiere im 3-Stunden-Intervall einen Wert von 102,0% in der Pilocarpin-Gruppe (SEM 9,0), 56,1% in der Diazepam-Gruppe (SEM 26,96) und 84,47% bei den Pilocarpin/Diazepam-Tieren (SEM 4,9).

Im 4-Stunden-Intervall fand sich ein Konzentrationsanstieg auf 141,6% in der Pilocarpin-Versuchsgruppe (SEM 10,8), auf 70,5% bei den Diazepam-Tieren (SEM 10,0) und auf 126,8% in der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe (SEM 16,3).

6 Stunden nach dem Krampfanfall fanden sich Werte von 108,4% nach der Gabe von Pilocarpin (SEM 5,8), 84,3% nach Diazepam (SEM 26,6) und 89,3% nach der Behandlung mit Pilocarpin

und Diazepam (SEM 10,5).

Nach 12 Stunden zeigten die Pilocarpin-Tiere einen Konzentrationsabfall auf 70,4% (SEM 7,5), die Diazepam-Gruppe einen Konzentrationsanstieg auf 95,6% (SEM 8,1) und die Pilocarpin/Diazepam-Tiere einen Wert von 82,5% (SEM 17,0).

Im 24-Stunden-Intervall ergaben sich folgende Veränderungen der P-ERK-Konzentration: Pilocarpin 97,8% (SEM 10,0), Diazepam 96,0% (SEM 3,9), Pilocarpin/Diazepam 105,7 (SEM 10,3).

Die Mittelwertabweichungen waren in keiner Zeitstufe signifikant ( $P_{3h} = 0,49$ ,  $P_{4h} = 0,07$ ,  $P_{6h} = 0,9$ ,  $P_{12h} = 0,41$ ,  $P_{24h} = 0,99$ )

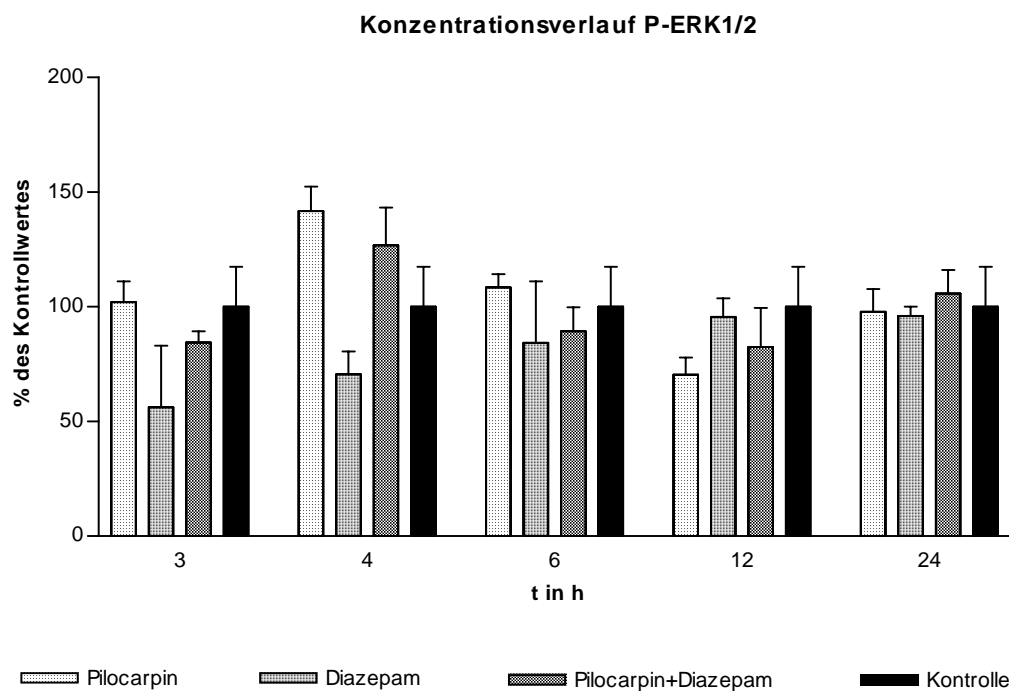


Abb. 17 : Konzentrationsverlauf für P-ERK1/2 3, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Darstellung aller Versuchsgruppen in der jeweiligen Zeitstufe mit Standardfehler (T). Die Varianzanalyse ergab in keiner Zeitstufe signifikante Mittelwertabweichungen.

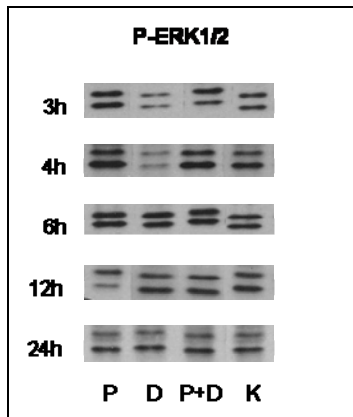


Abb. 18: Western Blot P-ERK1/2 3, 4, 6, 12, 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Vergleich der Versuchsgruppen innerhalb einer Zeitstufe.