

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Physiologische Parameter der Versuchstiere

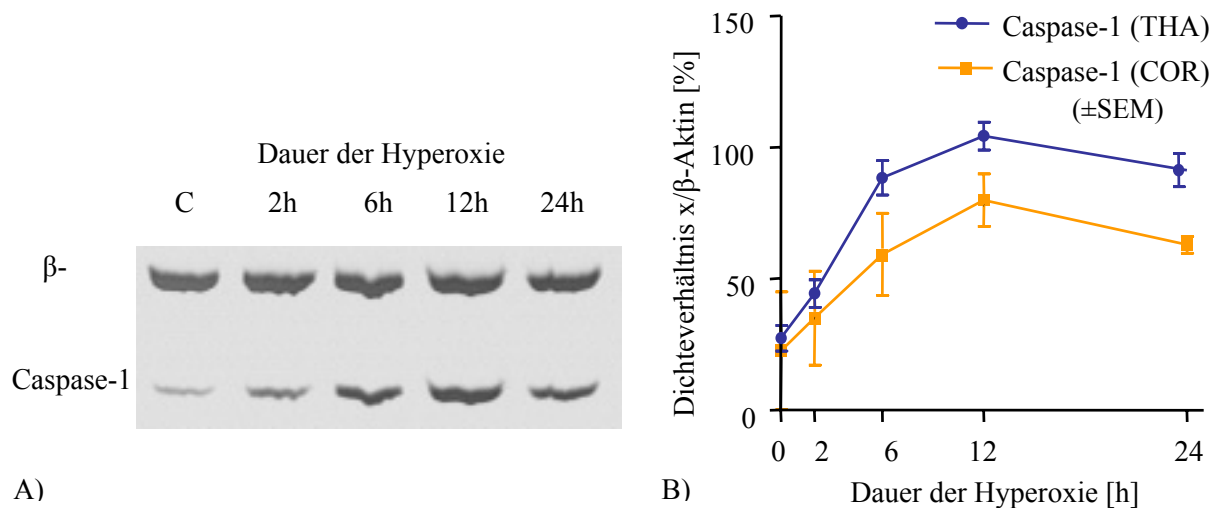
Zwischen Versuchs- und Kontrolltieren konnten sowohl bei Han Wistar Ratten als auch bei IRAK-4 (-/-) Mäusen und dem Wildtyp C57/BL6 keine phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. IRAK-4 (-/-) Mäuse wiesen keine erhöhte Mortalität auf. Keine der Gruppen zeigte eine Beeinträchtigung oder Unterschiede in Körpergewicht oder Atemparametern.

Bei jedem der Tiere wurde vor und nach dem Versuch die Körpertemperatur erfasst, um exogene und individuelle Störgrößen, wie mangelnde Zuwendung des Muttertieres oder Erkrankung eines Versuchstiers zu erkennen und auffällige Tiere zu selektieren. Hyperoxie, die Injektion von IL-18BP oder ihre Kombination hatten keinen Einfluss auf die Körpertemperatur, hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Während der Versuche konnten bei Tieren, die eine Therapie mit IL-18BP erhielten, keine Nebenwirkungen erkannt werden.

#### 3.2. Caspase-1 (ICE): mRNA- und Proteinexpression

Der Einfluss von Hyperoxie auf die Expression der Caspase-1 wurde auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Die Caspase-1-mRNA-Level wurden in Gewebe aus Thalamus und Kortex sechs Tage alter Han Wistar Ratten (n = 5 pro Zeitstufe) bestimmt. Dies geschah bei Versuchstieren nach einer definierten Hyperoxieexposition von 2, 6, 12 und 24 Stunden sowie bei den Kontrolltieren, die der Normoxie ausgesetzt waren (n = 5).

Nach Hyperoxieexposition konnte ein Anstieg der Caspase-1-mRNA-Level nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde auf mRNA-Ebene bereits nach zweistündiger Sauerstoffexposition (80%) beobachtet. Die höchsten mRNA-Konzentrationen zeigten sich nach 6-12 Stunden. In Gewebe von Tieren, die 24 Stunden der erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren, zeigten sich bereits wieder abnehmende Caspase-1-mRNA-Level. Bei diesen Versuchen diente  $\beta$ -Aktin als interner Standard. Signifikante Unterschiede wurden für  $\beta$ -Aktin hierbei nicht nachgewiesen. (Abbildung 3.1.)

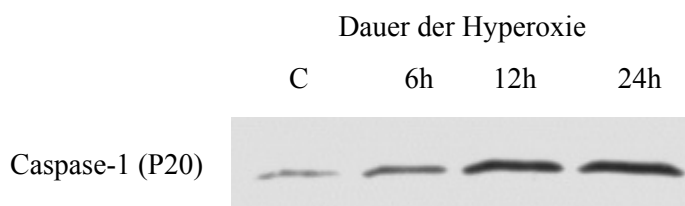


**Abbildung 3.1.:** Hyperoxie verstärkt die Expression von Caspase-1-mRNA.

**A)** Das Polyacrylamidgel verdeutlicht die verstärkte mRNA-Expression im Thalamus sechs Tage alter Ratten.

**B)** Densitometrische Ermittlung der Caspase-1-mRNA in Thalamus und Kortex ( $n = 5$ ). Die Grafik zeigt Standardabweichungen der Caspase-1-Banden in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Aktin. Bereits zwei Stunden nach Beginn der Hyperoxieexposition ist eine verstärkte Expression der Caspase-1-mRNA erkennbar. Varianzanalysen ergaben eine stark signifikante Wirkung der Therapie mit 80% Sauerstoff auf die Caspase-1-Expression (2h  $p = 0,0383$ ; 6h  $p < 0,0001$ ).

Auch auf Proteinebene konnte der Effekt gezeigt werden. Mittels Western-Blot-Verfahren wurden erhöhte Proteinkonzentrationen der Caspase-1 infolge Hyperoxiebehandlung in Gewebe aus Thalamus und Kortex nachgewiesen. Bereits nach 6 Stunden Sauerstoffbehandlung (80%) fand sich eine erhöhte Konzentration der aktiven P-20 Untereinheit von Caspase-1. Das Maximum zeigte sich nach 12 Stunden (Abbildung 3.2.).

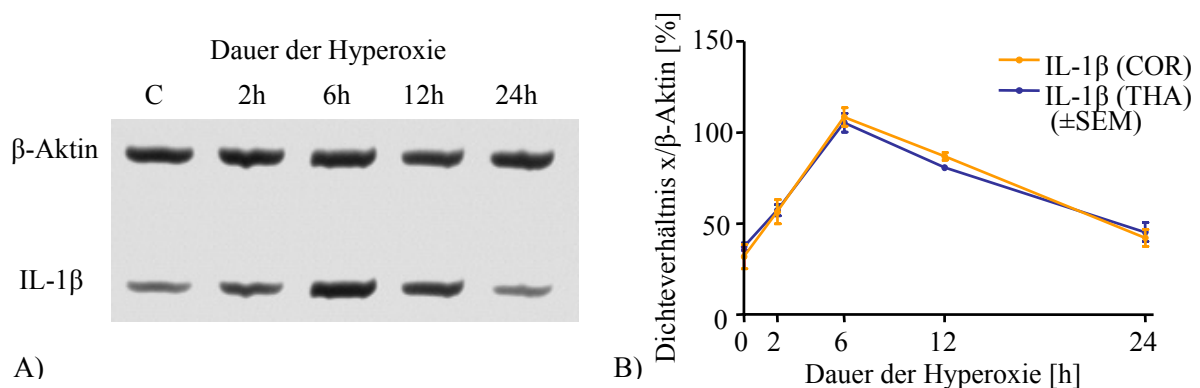


**Abbildung 3.2.:** Verstärkte Protein-Level von Caspase-1 bei Hyperoxie.

Das Gel zeigt ansteigende Proteinkonzentrationen der aktiven P-20 Untereinheit der Caspase-1 im Thalamus 6 Tage alter Ratten ( $n = 5$ ). Ein Maximum findet sich 12 Stunden nach Beginn der Hyperoxieexposition.

### 3.3. Interleukin-1 $\beta$ : mRNA- und Proteinexpression

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der Effekt der Hyperoxie auf die IL-1 $\beta$ -Expression untersucht. Die Level der mRNA wurden in Gewebe aus Thalamus und Kortex der sechs Tage alten Ratten nach 2, 6, 12 und 24 Stunden Sauerstoffbehandlung (80%) bestimmt und in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Aktin gesetzt. Bei Tieren mit zweistündiger Exposition zeigte sich bereits ein Anstieg der IL-1 $\beta$ -mRNA, das Maximum fand sich bei 6 Stunden in allen untersuchten Hirnregionen. Die Konzentration der IL-1 $\beta$ -mRNA kehrte bei 24- bis 48-stündiger Hyperoxieexposition auf die basalen Werte zurück (Abbildung 3.3.). Kontrolltiere zeigten keine Veränderungen.

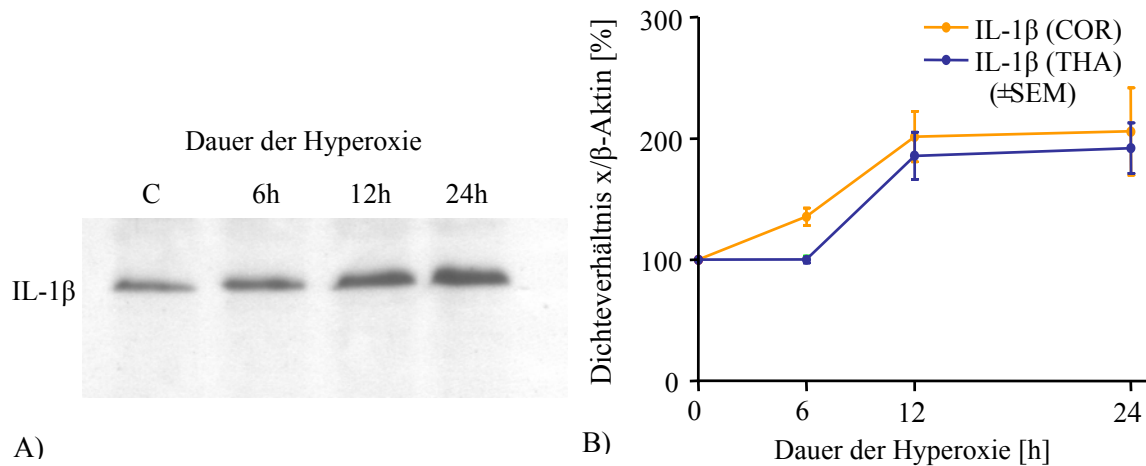


**Abbildung 3.3.:** Hyperoxie verstärkt die Expression von Interleukin-1 $\beta$ -mRNA.

**A)** Das Polyacrylamidgel zeigt die Hochregulation der IL-1 $\beta$ -mRNA im Thalamus sechs Tage alter Ratten ( $n = 6$  pro Zeitstufe).

**B)** Densitometrische Ermittlung der IL-1 $\beta$ -mRNA in Thalamus und Kortex ( $n = 6$ ). Das Dichteverhältnis ist in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Aktin dargestellt. Maximale Werte für die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  finden sich nach sechsständiger Hyperoxieexposition.

Die Expression von IL-1 $\beta$ -Protein stimmt mit dieser Beobachtung überein. Im Westernblot zeigten sich nach 12ständiger Hyperoxiebehandlung signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen in Gewebe aus Thalamus und Kortex (Abbildung 3.4.).



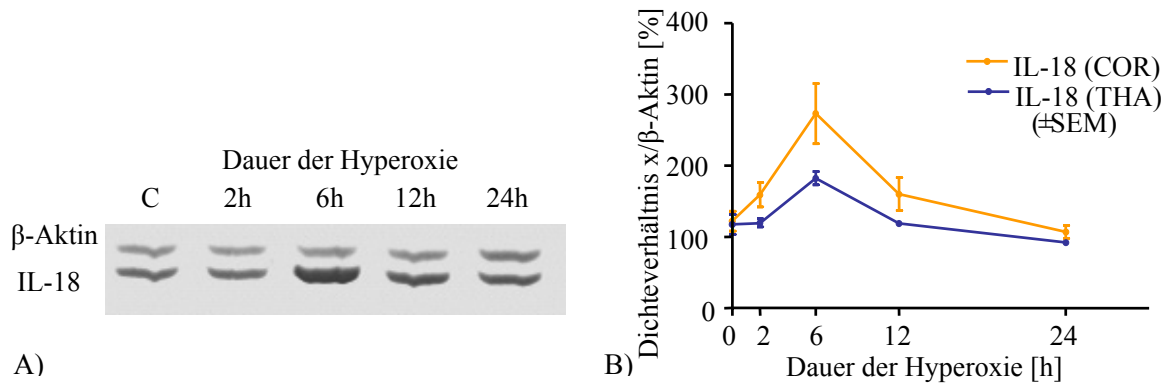
**Abbildung 3.4.:** Verstärkte Interleukin-1 $\beta$ -Proteinkonzentrationen bei Hyperoxie.

**A)** Das Polyacrylamidgel zeigt steigende Proteinkonzentrationen für IL-1 $\beta$  im Thalamus 6 Tage alter Ratten, die jeweils einem definierten Zeitraum 80%iger Hyperoxie ausgesetzt waren ( $n = 6$ ).

**B)** Die Proteinexpression ist als Dichteverhältnis, bezogen auf Werte der Kontrolltiere, dargestellt.

### 3.4. Interleukin-18 und Interleukin-18R $\alpha$ : mRNA- und Proteinexpression

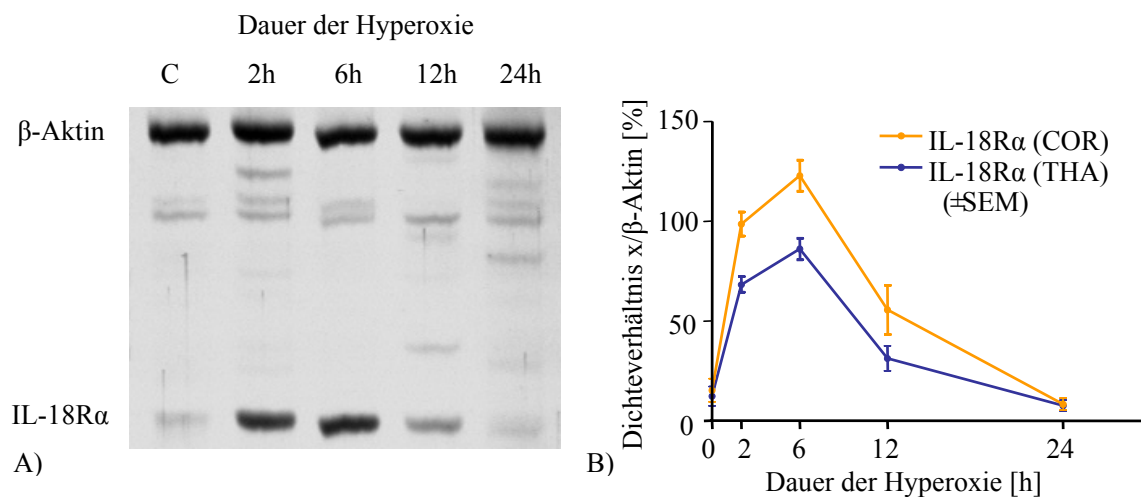
Die Bestimmung der mRNA-Level von IL-18 und IL-18R $\alpha$  wurde mit Gewebe aus Thalamus und Kortex von Ratten vorgenommen, welche zuvor 2, 6, 12 und 24 Stunden der 80%igen Hyperoxie ausgesetzt waren ( $n = 6$  pro Zeitstufe). In allen untersuchten Hirnregionen der Versuchstiere fanden sich im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte Werte für mRNA von IL-18 und IL-18R $\alpha$ . Dies wurde bereits nach zweistündiger Hyperoxieexposition beobachtet, maximale Konzentrationen fanden sich nach 6 Stunden Hyperoxie. Bei längerer Exposition (24 Stunden) zeigte sich eine Rückkehr zu basalen Werten. (Abbildung 3.5., Abbildung 3.6.).



**Abbildung 3.5.:** Hyperoxie verstärkt die Expression von Interleukin-18-mRNA.

**A)** Die Hochregulation der IL-18-mRNA im Thalamus sechs Tage alter Ratten ( $n = 6$ ) ist anhand der Banden im Gel erkennbar.

**B)** Densitometrisch ermittelte Werte der IL-18-mRNA in Thalamus und Kortex ( $n = 6$ ). Das Dichteverhältnis ist in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Aktin dargestellt. Maximale Werte für die mRNA-Expression von IL-18 finden sich nach sechsständiger Hyperoxieexposition.

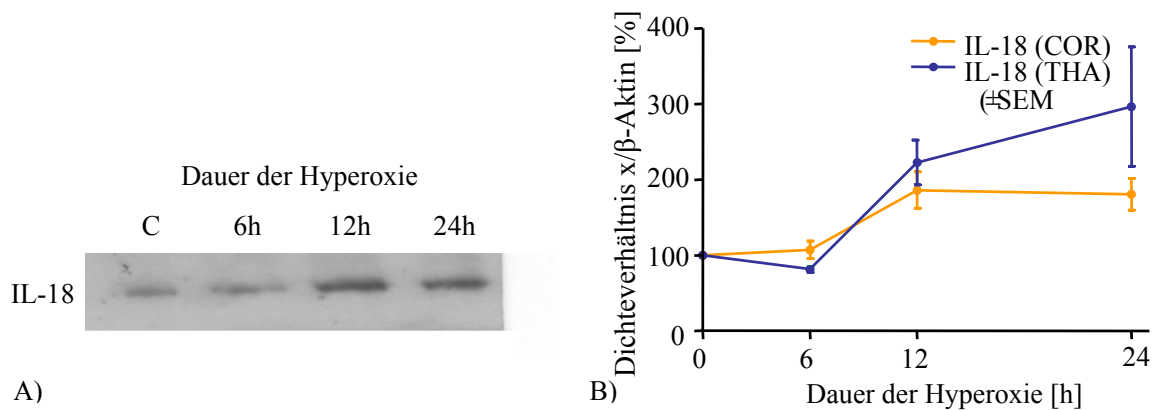


**Abbildung 3.6.:** Hyperoxie verstärkt die mRNA-Expression von Interleukin-18R $\alpha$ .

**A)** Das Polyacrylamidgel zeigt die Hochregulation der IL-18R $\alpha$ -mRNA im Thalamus sechs Tage alter Ratten ( $n = 6$ ).

**B)** Densitometrische Ermittlung der IL-18R $\alpha$ -mRNA in Thalamus und Kortex ( $n = 6$ ). Das Dichteverhältnis ist in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Aktin dargestellt. Nach sechsständiger Hyperoxieexposition zeigten sich maximale Werte der mRNA-Expression.

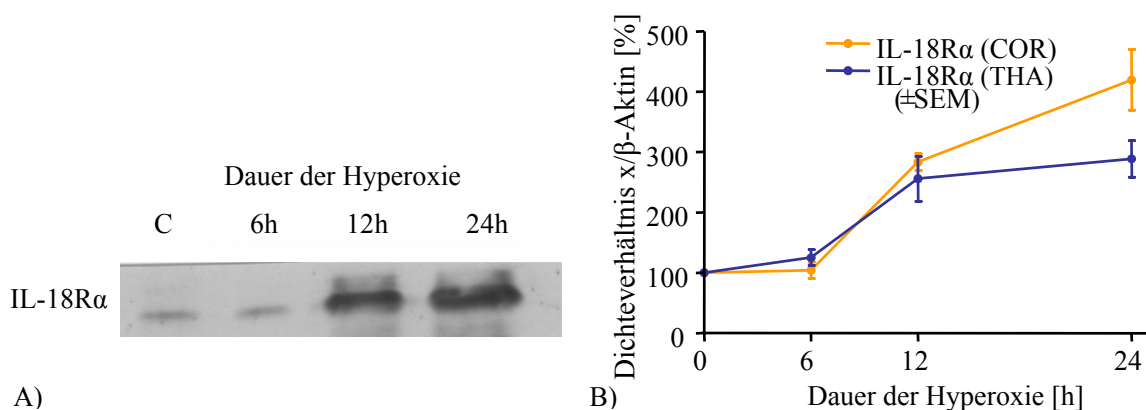
Auch die Westernblot-Untersuchungen zeigen deutlich erhöhte Proteinkonzentrationen von IL-18 und IL-18R $\alpha$  bei Versuchstieren. Das Maximum zeigte sich nach 12ständiger Sauerstoffbehandlung (Abbildung 3.7., Abbildung 3.8.).



**Abbildung 3.7.:** Hyperoxie verstärkt die Proteinexpression von Interleukin-18.

**A)** Gesteigerte Proteinexpression von IL-18 im Thalamus 6 Tage alter Ratten, die jeweils einem definierten Zeitraum 80%iger Hyperoxie ausgesetzt waren (n = 6).

**B)** Das Dichtverhältnis ist, bezogen auf Werte der Kontrolltiere, hier grafisch dargestellt. Ein signifikanter Anstieg zeigt sich nach 12stündiger Hyperoxieexposition.



**Abbildung 3.8.:** Gesteigerte Proteinkonzentration von Interleukin-18Rα bei Hyperoxie.

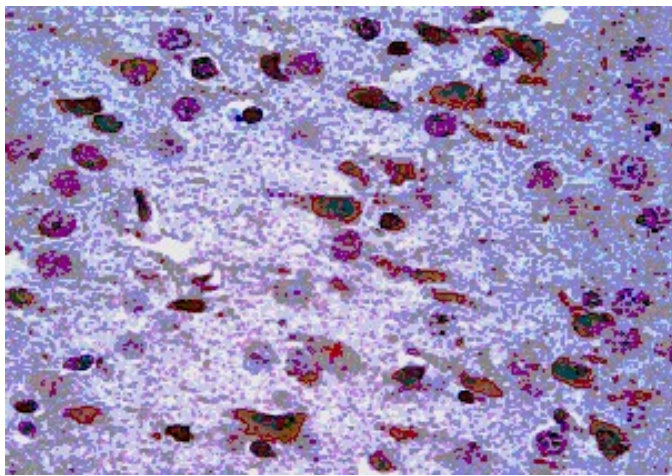
**A)** Das Polyacrylamidgel zeigt steigende Proteinkonzentrationen für IL-18Rα im Thalamus 6 Tage alter Ratten nach Hyperoxieexposition.

**B)** Die Proteinexpression ist als Dichtverhältnis bezogen auf Werte der Kontrolltiere dargestellt. Bei Tieren, die 12 Stunden einer 80%igen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren, sind erstmals signifikant erhöhte Werte erkennbar.

### 3.5. Immunhistologischer Nachweis von IL-18, IL18Rα und Caspase-3

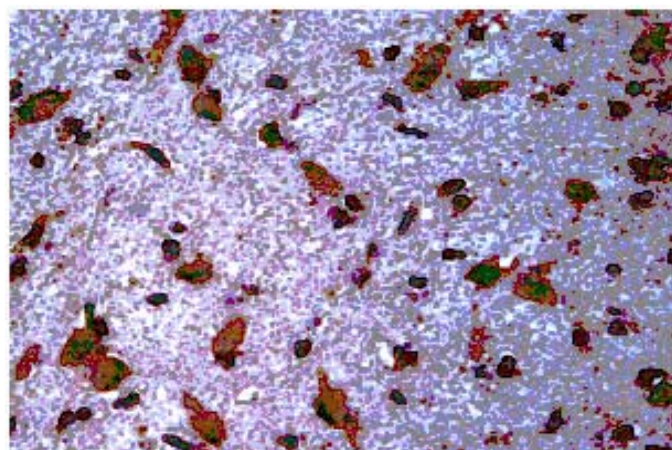
Immunhistochemische Färbungen von Gewebsschnitten des laterodorsalen Thalamus weisen das Vorkommen von IL-18 bei den Tieren nach (n = 6). Die verstärkte Expression nach 12stündiger Behandlung mit 80%iger Hyperoxie wird durch eine Zunahme der immunpositiven Bereiche

deutlich. Diese Gebiete sind hauptsächlich mikroglialen Zellen, aber auch Neuronen zuzuordnen (Abbildung 3.9.). Der immunhistochemische Nachweis von IL-18R $\alpha$  nach 12 Stunden Hyperoxie zeigt, dass IL-18-R $\alpha$  vornehmlich von thalamischen und kortikalen Neuronen exprimiert wird (n = 6) (Abbildung 3.10.). Weiterhin konnten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen im Hirngewebe der Versuchstiere vermehrt Caspase-3 positive Zellen, vor allem in kortikalen und thalamischen Regionen, nachgewiesen werden (Abbildung 3.11.). Die größte Caspase-3-Aktivität wurde bei Tieren beobachtet, die für 12 Stunden mit 80%igem Sauerstoff behandelt worden waren (n = 4).



**Abbildung 3.9.:** Immunhistochemische Anfärbung von IL-18.

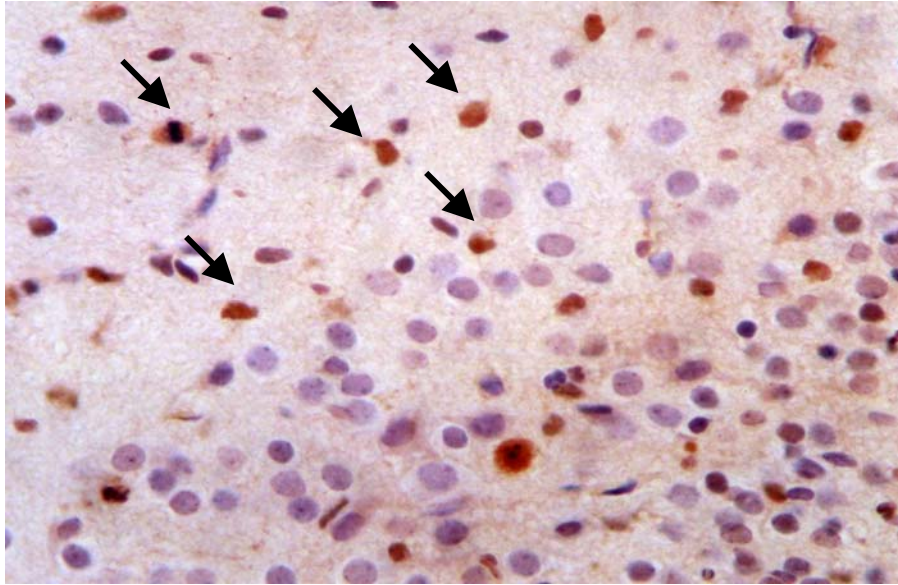
Die Abbildung zeigt einen Bereich im laterodorsalen Thalamus einer 6 Tage alten Ratte, welche zuvor über einen Zeitraum von 12 Stunden einer Hyperoxie von 80% ausgesetzt war (Vergrößerung: 40fach). Mikrogliale Zellen und Neuronen sind immunpositiv für IL-18.



**Abbildung 3.10.:** Immunhistochemische Anfärbung von IL-18R $\alpha$ .

Die Abbildung zeigt einen Bereich im laterodorsalen Thalamus einer 6 Tage alten Ratte, welche zuvor über den Zeitraum von 12 Stunden einer Hyperoxie von 80% ausgesetzt war (Vergrößerung: 40fach). Hauptsächlich Neuronen zeigen eine Immunpositivität für IL-18R $\alpha$ .





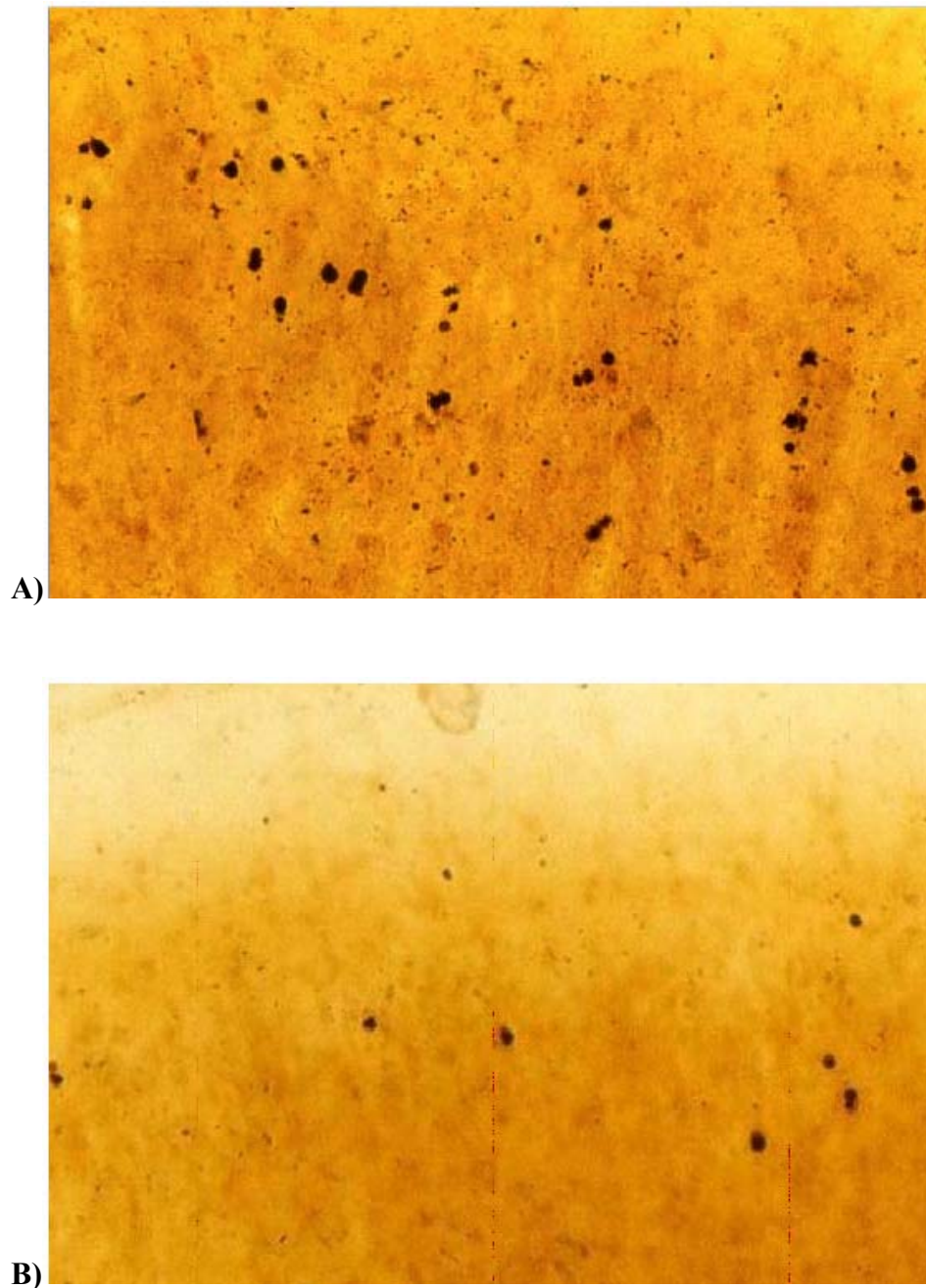
**Abbildung 3.11.:** Immunhistochemische Darstellung Caspase-3 positiver Zellen. Die Abbildung zeigt immunhistochemisch angefärbte Caspase-3 positive Zellen (Pfeile) im laterodorsalen Thalamus einer sieben Tage alten Ratte, die zuvor über 24 Stunden einer 80%igen Hyperoxie ausgesetzt wurde (Vergrößerung: 40fach).

### 3.6. IL-18BP wirkt im Hyperoxiemodell neuroprotektiv

Ein Zusammenhang zwischen verstärkt exprimiertem IL-18 unter hyperoxischen Bedingungen und neuronalen Zellschäden bei Hyperoxie wurde mit Hilfe des IL-18BP bewiesen. Vor 24-stündiger Hyperoxietherapie intraperitoneal injiziertes rekombinantes IL-18BP (40  $\mu$ g) führte im Vergleich zu den Kontrolltieren zu signifikant geringeren Apoptosescores (n = 6) (Abbildung 3.12., Tabelle 3.1., Abbildung 3.13.).

Die Behandlung der Tiere mit IL-18BP allein zeigte keine Nebeneffekte und Veränderungen der physiologischen Apoptoserate im Hirn 7 Tage alter Han Wistar Ratten.





**Abbildung 3.12.:** Rekombinantes IL-18 Bindungsprotein reduziert hyperoxie-induzierte neuronalen Schäden – Histologischer Nachweis.

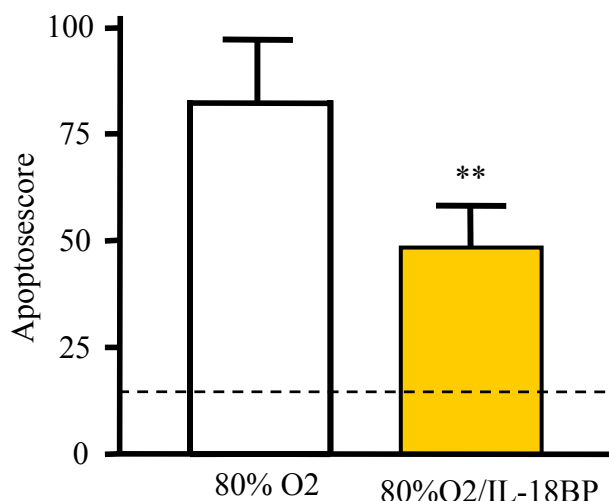
**A)** Parietaler Kortex einer sieben Tage alten Ratte (Kontrolltier), welche zuvor über 24 Stunden einer 80%igen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt wurde (DeOlmos Kupfer-Silber-Färbung, Vergrößerung: 40fach).

**B)** Parietaler Kortex einer sieben Tage alten Ratte, welcher vor der 24stündigen Hyperoxieexposition intraperitoneal 40 µg rekombinantes IL-18BP appliziert wurden (DeOlmos Kupfer-Silber-Färbung, Vergrößerung: 40fach). Im Vergleich zum Kontrolltier (Abbildung 4.11.A) ist die Anzahl der angefärbten Zellen deutlich reduziert.

Hirnregion	21% O <sub>2</sub> /NaCl	80% O <sub>2</sub> /NaCl	80% O <sub>2</sub> /IL-18BP
Cortex frontalis II	1986 ± 307	10640 ± 2888	5468 ± 1942
Cortex frontalis IV	361 ± 74	1904 ± 866	1265 ± 468
Cortex parietalis II	2832 ± 221	12868 ± 4480	7992 ± 2340
Cortex parietalis IV	347 ± 37	2880 ± 1268	1676 ± 898
Cortex cinguli II	1875 ± 236	3872 ± 1582	2444 ± 986
Cortex cinguli IV	350 ± 39	1982 ± 623	1140 ± 467
Cortex retrosplenialis II	1289 ± 101	5774 ± 3380	4624 ± 1600
Cortex retrosplenialis IV	364 ± 48	1065 ± 244	648 ± 262
Weißer Substanz	367 ± 55	12354 ± 2768	7267 ± 2450
Nucleus caudatus	579 ± 61	6480 ± 1623	3680 ± 1400
Thalamus mediodorsalis	761 ± 24	5803 ± 1830	3476 ± 1358
Thalamus laterodorsalis	400 ± 34	8868 ± 1635	5348 ± 1460
Thalamus ventralis	254 ± 28	2577 ± 900	1456 ± 768
Hippocampus	779 ± 67	3403 ± 1266	2206 ± 980

**Tabelle 3.1.:** Die Behandlung mit rekombinantem IL-18BP zeigt einen neuroprotektiven Effekt bei neonatalen Ratten im Hyperoxiemodell.

Sieben Tage alte Han Wistar Ratten wurden über 24 Stunden mit Normoxie (21% O<sub>2</sub>), Hyperoxie (80% O<sub>2</sub>) oder der Kombination aus Hyperoxie (80% O<sub>2</sub>) und IL-18BP-Injektion (40 µg zu Beginn der Sauerstofftherapie) behandelt. Die Werte geben die jeweilige mittlere Dichte degenerierter Neurone ± Standardabweichung an.



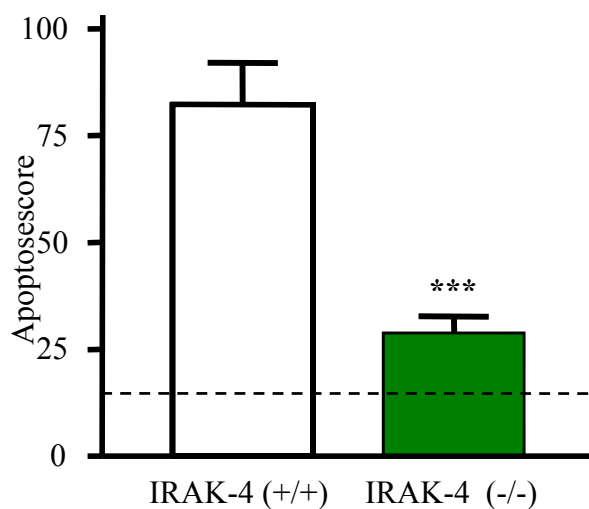
**Abbildung 3.13.:** Rekombinantes IL-18 Bindungsprotein reduziert hyperoxie-induzierte neuronale Schäden – Statistische Analyse.

In allen betrachteten Hirnregionen reduziert das IL-18BP neurodegenerative Prozesse signifikant (n = 6, \*\*p = 0,0057). Die perforierte Linie gibt die physiologische Apoptoserate an.

### 3.7. Reduktion der hyperoxie-induzierten Hirnschädigung bei IRAK-4 (-/-)

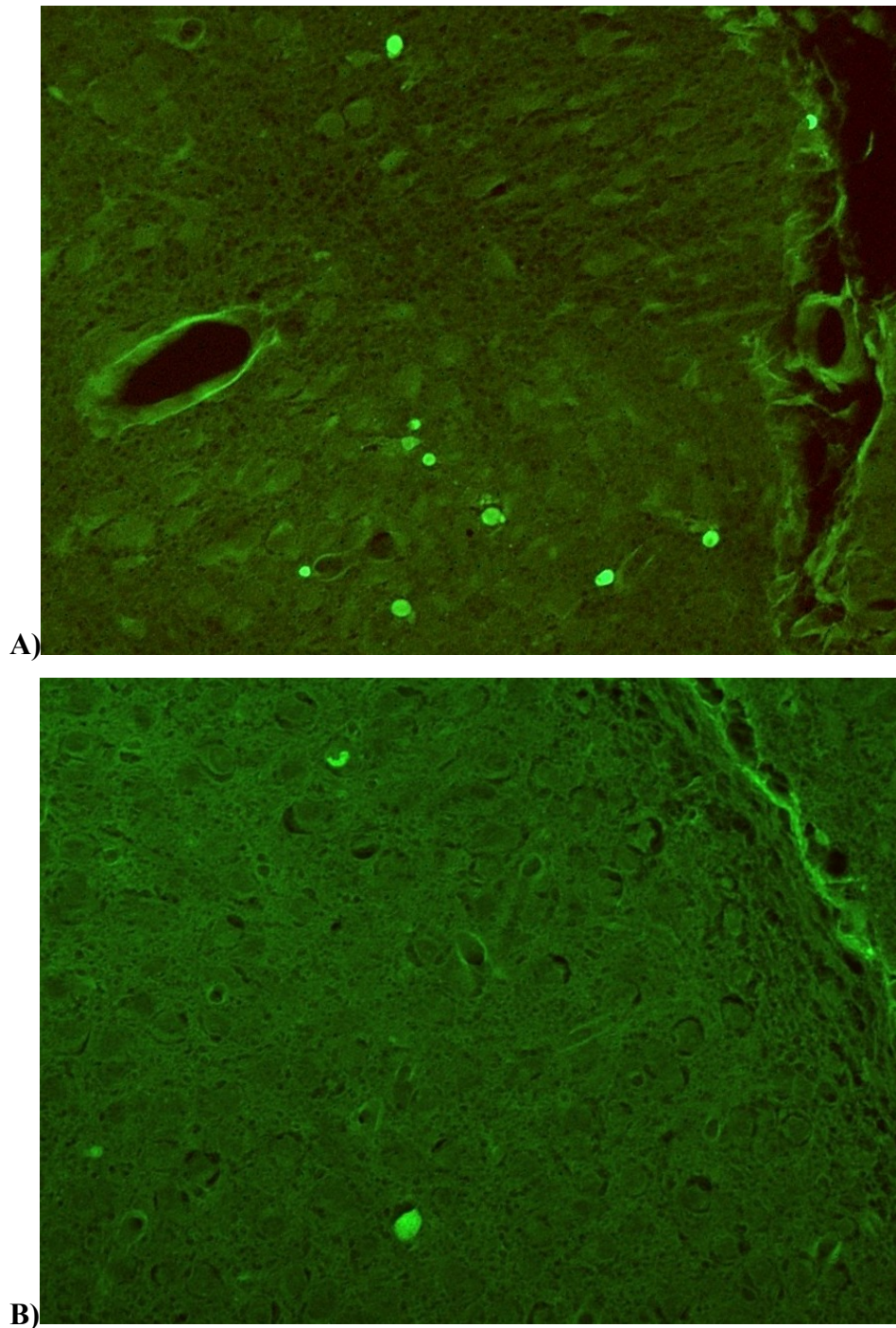
#### Mäusen

Der Zusammenhang der beiden Caspase-1 abhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 und der neuronalen Schädigung bei Hyperoxie wurde weiterhin mit Hilfe von sechs Tage alten IRAK-4 (-/-) Mäusen untersucht. Mäuse vom Wildtyp C57/BL6 zeigen histologisch nach 24 Stunden 80%iger Hyperoxie eine diffuse neuronale Zellschädigung, welche sehr dem beobachteten hyperoxie-bedingten Hirnschaden der Ratten gleicht. Mäuse vom Typ IRAK-4 (-/-) hingegen weisen in allen Hirnregionen deutlich geringere Zellschäden nach Exposition des Hyperoxie-Schädigungsmodells auf (Abbildung 3.15.). Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der kumulativen Apoptosescores (Abbildung 3.14.). Die physiologischen neuronalen Apoptosescores zwischen Wildtyp C57/BL6 und IRAK-4 (-/-)-Mäusen weisen keine signifikanten Unterschiede auf.



**Abbildung 3.14.:** IRAK-4 (-/-) Mäuse zeigen im Hyperoxiemodell geringere Neurodegeneration.

IRAK-4 (-/-) Mäuse sind gegenüber einer Behandlung mit 80%igem Sauerstoff über 24 Stunden weniger vulnerabel als Kontrolltiere vom Wildtyp ( $n = 7$ ,  $***p < 0,0001$ ). Die physiologische Apoptoserate (perforierte Linie) unterscheidet sich zwischen Wildtyp und IRAK-4 (-/-) nicht.



**Abbildung 3.15.:** IRAK-4 (-/-) Mäuse zeigen im Hyperoxiemodell geringere Neurodegeneration – Histologischer Nachweis.

**A)** Der Gewebsschnitt des Thalamus eines sechs Tage alten Kontrolltieres (IRAK-4 +/+), welches über 24 Stunden einer Hyperoxie von 80% ausgesetzt war, zeigt deutlich hell angefarbte degenerierte Zellen (Fluoro-Jade-B Färbung, Schnittdicke 5  $\mu$ m, Vergrößerung: 20fach).

**B)** Thalamus einer sechs Tage alten IRAK-4 (-/-) Maus, die 24 Stunden 80%igem Sauerstoff ausgesetzt war (Fluoro-Jade-B Färbung, Schnittdicke 5  $\mu$ m, Vergrößerung: 20fach). Histologisch ist eine im Vergleich zum Kontrolltier geringere Neurodegeneration erkennbar.