

4. Ergebnisse

4.1. Dosis- und zeitabhängige neuroprotektive Wirkung von Corticosteron in der durch AF64A-induzierten Apoptose

Um den optimalen Zeitpunkt und die wirksame Dosis für die Behandlung mit Glucocorticoiden für die weiteren Versuche festzustellen, wurden zunächst die primären neuronalen Zellkulturen mit dem Glucocorticoid Corticosteron zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Neurotoxingabe behandelt. Die Corticosterondosis lag im Bereich von 1-50 μM . Unter der Einwirkung des Neurotoxins AF64A kam es erst nach 48 Stunden zu einer Schädigung der Neurone, gemessen an der Erhöhung der LDH-Freisetzung, die nach 72 Stunden ihr Maximum erreichte. Die Corticosteron-behandelten neuronalen Zellen zeigten einen dosis- und zeitabhängigen Schutz vor einer AF64A-induzierten Apoptose. Während 1 μM Corticosteron 20 Stunden und 1 Stunde vor AF64A-Gabe gegeben die Apoptose nicht verhinderte, konnten 10 μM und 50 μM Corticosteron bei einer Applikation 20 Stunden und 1 Stunde vor Neurotoxingabe die AF64A-induzierte LDH-Freisetzung nach 48 und 72 Stunden signifikant reduzieren (**Abbildung 3**).

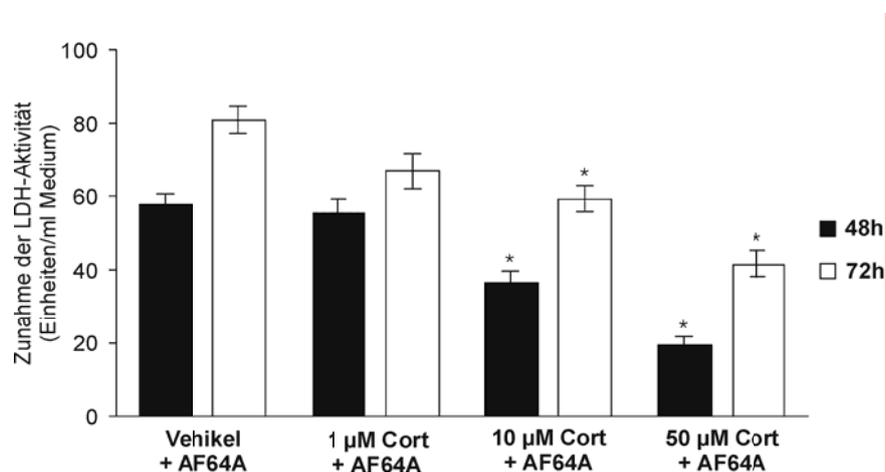


Abbildung 3: Einfluss von Corticosteron (Cort) auf die AF64A-induzierte Apoptose 48h und 72h nach AF64A-Applikation. Verschiedene Dosen von Corticosteron wurden 20h + 1h vor AF64A (40 μM) gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: $108,2 \pm 2,2$; Cort: $116,8 \pm 3,9$; 72h Kontrollen: Vehikel: $134,1 \pm 3,3$; Cort: $146,7 \pm 4,76$ Einheiten/ml Medium), Angaben als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,001$ vs. AF64A, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; $n=24-68$ für jede Gruppe, erhoben in 2-6 unabhängigen Experimenten.

Außerdem wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt die Behandlung mit Corticosteron durchgeführt werden musste, um eine neuroprotektive Wirkung zu erzielen. Corticosteron wurde in einer Konzentration von 50 µM zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der AF64A-Exposition appliziert. Dabei zeigte sich, dass eine maximale Neuroprotektion bereits bei einer einmaligen Dosis 20 Stunden vor AF64A erzielt wurde. Dieser Effekt konnte auch durch eine wiederholte Gabe von Corticosteron 1 Stunde vor AF64A nicht wesentlich verstärkt werden. Die neuroprotektive Wirkung nahm jedoch kontinuierlich ab, wenn Corticosteron erstmalig 1 Stunde vor oder 6 bzw. 12 Stunden nach AF64A verabreicht wurde. Bei Gabe von Corticosteron 18 Stunden nach AF64A war keinerlei Protektion mehr zu erkennen. (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Einfluss des Applikationszeitpunktes von Corticosteron auf die AF64A-induzierten neuronalen Apoptose

	AF64A	Corticosteron vor AF64A			Corticosteron nach AF64A		
		20 + 1h	20h	1h	6h	12h	18h
48h, Δ LDH	77.9 ± 4.9	21.7 ± 6.5***	25.2 ± 3.7***	32.0 ± 4.6***	49.1 ± 4.4**	50.6 ± 6.5**	78.7 ± 10.8
72h, Δ LDH	122.0 ± 8.3	60.5 ± 8.2***	66.9 ± 5.7***	68.0 ± 7.0***	93.8 ± 4.8*	86.1 ± 7.4**	114.4 ± 8.1

Corticosteron (50 µM) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach AF64A (40 µM) eingesetzt. Angaben der Δ LDH-Freisetzung in Einheiten/ml Medium. Basale LDH-Freisetzung der 48h Kontrollen: Vehikel: 103,9 ± 2,8; Cort: 112,3 ± 4,8 und der 72h Kontrollen: Vehikel: 146,7 ± 6,2; Cort: 153,1 ± 11,1 Einheiten/ml Medium, Angaben als Mittelwert ± SEM, *p<0,05 vs. AF64A; **p<0,01 vs. AF64A; ***p<0,001 vs. AF64A, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n=8-16 für jede Gruppe, erhoben in 1-2 Experimenten.

In **Abbildung 4** sind Phasenkontrastaufnahmen und Hoechst 33258-Kernfärbung primärer neuronaler kortikaler Kulturen unter Kontrollbedingungen und nach AF64A mit und ohne Vorbehandlung mit Corticosteron dargestellt. Die Neuronen wurden mit Corticosteron 20 Stunden vor AF64A behandelt und 48 Stunden nach Toxingabe fixiert und mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. AF64A führte zu den morphologischen Kennzeichen der Apoptose mit Degeneration der Neuriten, Zellschrumpfung und Membranblebbing, die durch Corticosteron stark reduziert werden konnten. In zwei unabhängigen Experimenten wurden 230 Zellen/Plättchen unter dem

Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der Anteil der apoptotischen Zellen in den Kontrollkulturen betrug 12,8%, in den mit Corticosteron-behandelten Kulturen 17,8%. Unter AF64A war eine deutliche Zunahme des Anteils der apoptotischen Zellen 34,1% zu verzeichnen, die durch Corticosteronvorbehandlung (23,5%) reduziert werden konnte.

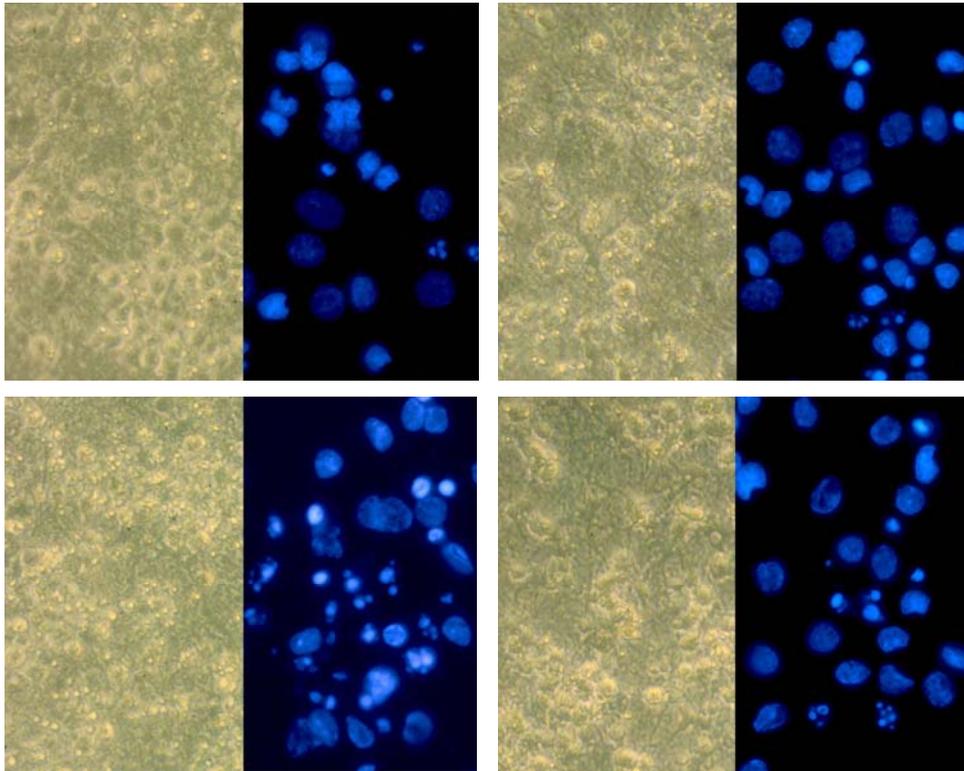


Abbildung 4: Phasenkontrastaufnahmen (links, Vergrößerung x40) und Hoechst 33258-Färbung (rechts, Vergrößerung x100). Dargestellt sind primäre neuronale Zellkulturen nach 48 Stunden mit und ohne AF64A und Vorbehandlung mit Corticosteron; a) Vehikel-behandelte Kontrollen (12,8% apoptotische Zellen); b) Corticosteron-behandelte Kulturen (17,8% apoptotische Zellen) c) AF64A-behandelte Kulturen (40µM; 34,1% apoptotische Zellen) d) AF64A-behandelte Kulturen, die 20 Stunden zuvor mit 50µM Corticosteron behandelt wurden (23,5% apoptotische Zellen).

4.2. Biphasischer Effekt von Dexamethason auf die AF64A-induzierte neuronale Schädigung

Als weiteres Glucocorticoid wurde Dexamethason, das bevorzugt am GR wirkt, eingesetzt. Die primären kortikalen Neurone wurden mit Dexamethason 20 Stunden und 1 Stunde vor AF64A-Gabe vorbehandelt. Es wurden verschiedene Dosen von 1-50 µM eingesetzt. Der

durch das Neurotoxin AF64A-induzierte Zelltod konnte durch 1 und 10 μM Dexamethason nach 48 und 72 Stunden signifikant vermindert werden. Dagegen zeigte die Behandlung mit der hohen Dosis von 50 μM eine Exazerbation des Schadens nach 72 Stunden. (**Abbildung 5**).

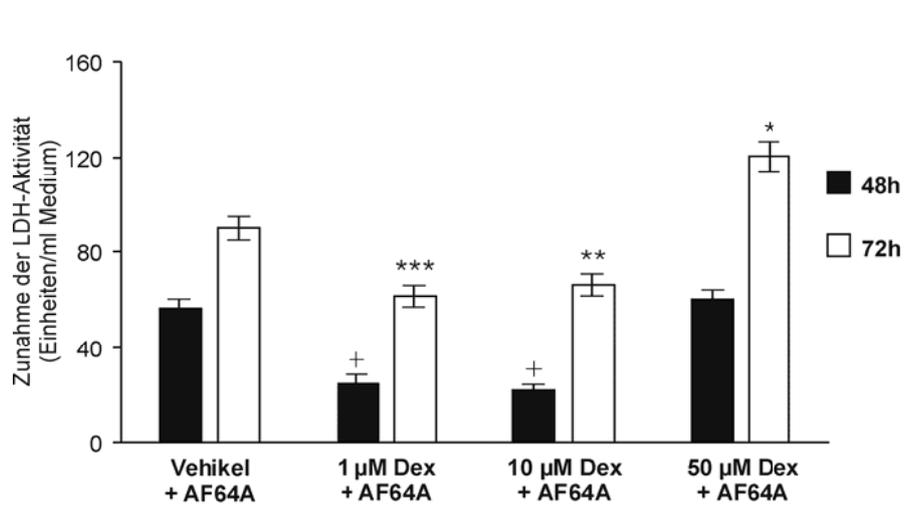


Abbildung 5: Einfluss von Dexamethason auf die AF64A-induzierte LDH-Freisetzung 48h und 72h nach AF64A-Applikation. Verschiedene Dosen von Dexamethason (Dex) wurden 20h + 1h vor AF64A gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: $122,1 \pm 2,2$; Dex: $118,0 \pm 3,9$; 72h Kontrollen: Vehikel: $151,4 \pm 4,1$; Dex: $150,2 \pm 4,7$ Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM; 48h: ⁺ $p < 0,05$ vs. AF64A, one way ANOVA, Dunn's posthoc-Test; 72 h: ^{***} $p = 0,001$ vs. AF64A, ^{**} $p = 0,003$ vs. AF64A, ^{*} $p = 0,017$ vs. AF64A, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; $n = 8-36$ für jede Gruppe, erhoben in 2-3 unabhängigen Experimenten.

4.3. Einfluss von Corticosteron auf andere neuronale Schadensmodelle

Als nächstes wurde untersucht, ob Corticosteron auch in anderen Apoptosemodellen eine neuroprotektive Wirkung entfalten kann. Nach Staurosporin-gabe, einem Mycotoxin, erfolgte der LDH-Anstieg bereits nach 24 Stunden. Vorbehandlung mit 50 μM Corticosteron (20 und 1 Stunde vor der Staurosporin-gabe gegeben) konnte die Staurosporin-induzierte LDH-Freisetzung nach 24 und 48 Stunden signifikant vermindern (**Abbildung 6**). Der Effekt von Corticosteron war aber weniger ausgeprägt als im AF64A-Apoptosemodell.

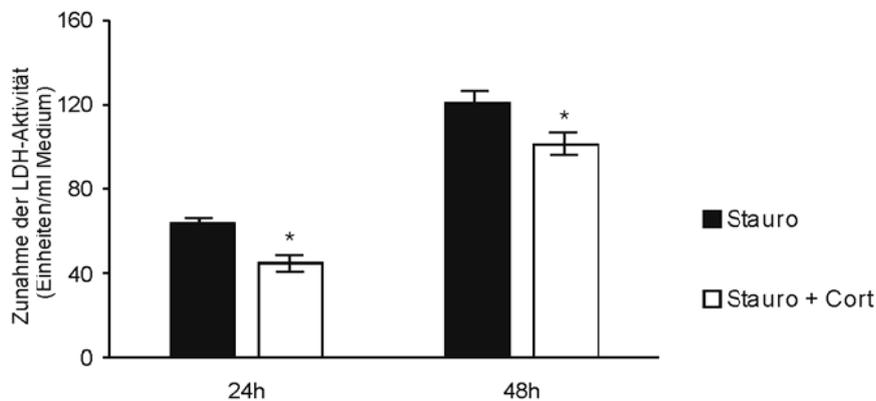


Abbildung 6: Einfluss von Corticosteron auf die Staurosporin-induzierte Apoptose 24h und 48h nach Staurosporin-Applikation. Corticosteron (Cort; 50 μ M) wurde 20h und 1h vor Staurosporin (Stauro; 300 nM) der Kultur zugegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrollkultur angegeben (basale LDH-Freisetzung 24h Kontrollen: Vehikel: 112,4 \pm 4,6; Cort: 110,6 \pm 5,0; 48h Kontrollen: Vehikel: 121,0 \pm 5,3; Cort: 124,1 \pm 5,5 Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM, * p <0,01 vs. Stauro, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test: n =28-32 für jede Gruppe, erhoben in 3 unabhängigen Experimenten.

Camptothecin, ein Topoisomerase I-Inhibitor, löst ebenfalls neuronale Apoptose aus. Neuronen, die diesem Neurotoxin ausgesetzt waren, zeigten ebenfalls einen Anstieg der LDH nach 24 Stunden auf 53,8 \pm 3,4 Einheiten/ml Medium und nach 48 Stunden auf 97,0 \pm 4,5 (angegeben als Differenz zur basalen LDH-Freisetzung). Hier konnte Corticosteron zu keinem Zeitpunkt den neuronalen Zelltod verhindern. Nach 24 Stunden stieg die LDH-Freisetzung der Corticosteron-behandelten Kulturen ebenso auf 51,9 \pm 3,4 und nach 48 Stunden auf 93,6 \pm 4,7 an. In den Kontrollkulturen war eine basale LDH-Freisetzung von 90,1 \pm 4,0 nach 24 Stunden und 110,5 \pm 4,3 Einheiten/ml Medium nach 48 Stunden zu verzeichnen. Eine vergleichbare Ausschüttung zeigte sich bei den Corticosteron-behandelten Kontrollkulturen (24 Stunden: 85,5 \pm 2,4 und 48 Stunden: 94,5 \pm 4,5 Einheiten/ml Medium).

Nachdem Corticosteron in verschiedenen Apoptosemodellen untersucht worden war, stellte sich nun die Frage, ob es auch gegen exzitotoxischen Schaden schützen kann. Neuronenkulturen, welche 30 Minuten der exzitatorischen Aminosäure Glutamat (100 μ M) exponiert waren, zeigten einen LDH-Anstieg nach 24 Stunden und einen weiteren nach 72 Stunden. Corticosteron konnte den Zellschaden nach 24 Stunden nicht verhindern, aber

schützte die Neuronen in der späten Phase des Glutamat-induzierten Zelltodes signifikant. (**Abbildung 7**).

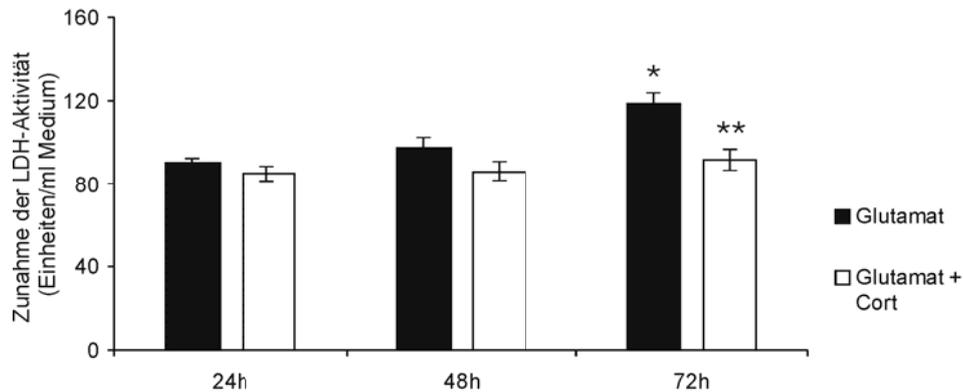


Abbildung 7: Einfluss von Corticosteron auf den Glutamat-induzierten Zelltod 24h, 48h und 72h nach Glutamatexposition. Corticosteron (Cort; 50 μ M) wurde 20h vor und 30min nach Glutamat (100 μ M) der Kultur zugegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrollkultur angegeben (basale LDH-Freisetzung 24h Kontrollen: Vehikel: 81,8 \pm 4,1; Cort: 80,6 \pm 3,0; 48h Kontrollen: Vehikel: 95,0 \pm 3,8; Cort: 92,1 \pm 4,2; 72h Kontrollen: Vehikel: 95,1 \pm 2,1; Cort 93,1 \pm 2,7 Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM, * p <0,01 vs. Glutamat 24h und 48h, ** p <0,01 vs. Glutamat 72h, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n =16 für jede Gruppe, erhoben in 2 unabhängigen Experimenten.

Als Schlaganfallmodell *in vitro* diente der OGD-induzierte Zelltod. Die neuronalen Zellen wurden 90 Minuten unter Sauerstoff- und Glukoseentzug gehalten. 24 Stunden nach der OGD kam es zum Anstieg der LDH auf 88,2 \pm 4,3 Einheiten/ml Medium und nach 48 Stunden auf 100,5 \pm 9,8 (angegeben als Differenz zur basalen LDH-Freisetzung). Eine Corticosteronbehandlung konnte zu keinem Zeitpunkt den Anstieg der LDH signifikant beeinflussen (24 Stunden: 94,3 \pm 5,5 und 48 Stunden: 119,6 \pm 7,3 nach OGD). Die basale LDH-Freisetzung in den Kontrollkulturen betrug nach 24 Stunden 74,5 \pm 6,1 und nach 48 Stunden 99,5 \pm 9,8 Einheiten/ml Medium. Eine signifikant veränderte LDH-Ausschüttung in den Corticosteron-behandelten Kontrollen konnte nicht festgestellt werden (24 Stunden: 82,1 \pm 5,8 und 48 Stunden: 118,5 \pm 9,6 Einheiten/ml Medium).

4.4. Rolle der Glucocorticoidrezeptoren bei der neuronalen Protektion

In einer neuen Serie von Experimenten wurden mögliche Mechanismen untersucht, die in der Vermittlung der Corticosteron-induzierten Neuroprotektion involviert sind. Insbesondere sollte hierbei die Beteiligung von GR und MR untersucht werden. Um zwischen den beiden Rezeptortypen differenzieren zu können, wurden der MR-Antagonist Spironolacton und der GR-Antagonist Mifepriston eingesetzt. Spironolactongabe erfolgte 2 Stunden vor Gabe des Corticosterons, Corticosteron wurde einmalig 20 Stunden vor AF64A appliziert. Es zeigte sich, dass Spironolacton die Neuroprotektion von Corticosteron nach 48 und 72 Stunden komplett antagonisieren konnte (**Abbildung 8**).

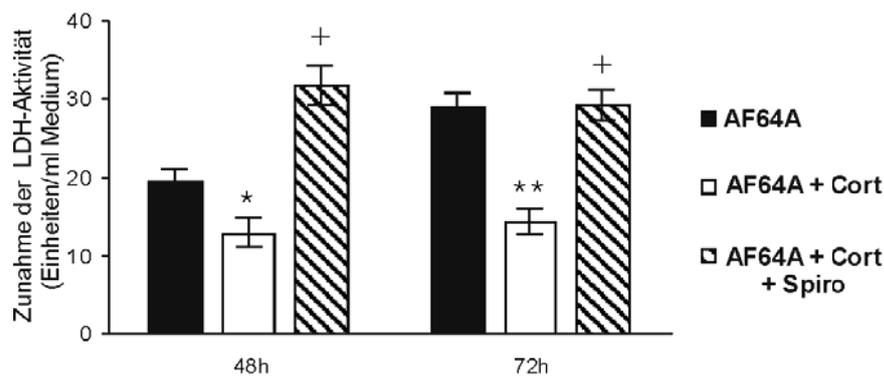


Abbildung 8: Aufhebung der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion durch Spironolacton (Spiro, 50 μ M) 48h und 72h nach AF46A. Corticosteron (Cort; 50 μ M) wurde 20h und Spironolacton 22h vor AF64A (40 μ M) gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: $33,7 \pm 1,8$; Cort + Spiro: $53,5 \pm 3,5$; 72h Kontrollen: Vehikel: $35,5 \pm 2,7$; Spiro: $34,8 \pm 0,6$; Cort + Spiro: $46,6 \pm 2,5$ Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs. AF64A, * $p < 0,001$ vs. AF64A + Cort, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; $n = 14-16$ für jede Gruppe, erhoben in 2 unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung mit Mifepriston (10 μ M) erfolgte 2 Stunden vor der Corticosterongabe. Corticosteron wurde einmalig 20 Stunden vor der AF64A-Gabe appliziert. Durch die Anwesenheit des GR-Antagonisten wurde nicht nur die Wirkung des Glucocorticoids aufgehoben, es resultierte auch ein wesentlich höherer Schaden als unter AF64A allein (**Abbildung 9**).

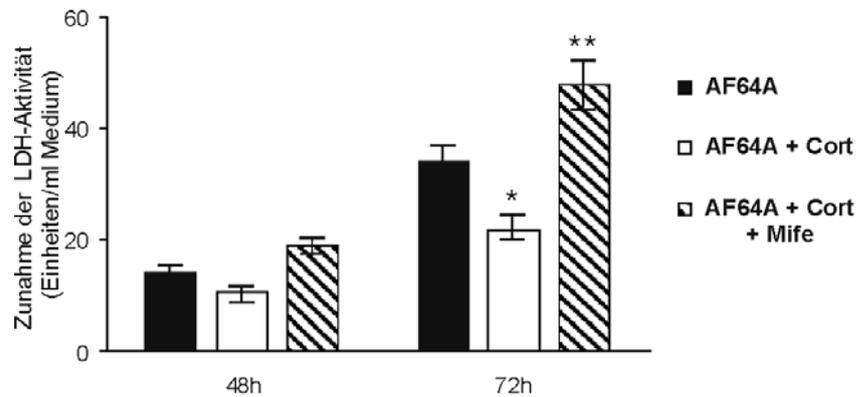


Abbildung 9: Einfluss von Mifepriston (Mife; 10 μ M) auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion 48h und 72h nach AF64A-applikation. Corticosteron (Cort; 10 μ M) wurde 20h und Mifepriston 22h vor AF64A (40 μ M) gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: $32,0 \pm 2,0$; Cort + Mife: $37,5 \pm 3,5$; 72h Kontrollen: Vehikel: $41,5 \pm 1,4$; Mife: $35,7 \pm 2,6$; Cort + Mife: $52,7 \pm 3,8$ Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. AF64A, ** $p < 0,001$ vs. AF64A + Cort, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n=16 für jede Gruppe, erhoben in 2 unabhängigen Experimenten.

4.5. Rolle der Eiweißsynthese bei der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion

Da die Transkription möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Neuroprotektion durch Glucocorticoide spielt, wurde der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid eingesetzt. Cycloheximid in einer Dosis von 500 ng/ml wurde 20 Stunden vor AF64A hinzugefügt, Corticosteron 20 und 1 Stunde vorher. Durch die Hemmung der Proteinsynthese konnte die schützende Wirkung des Corticosteron aufgehoben werden. Cycloheximid führte in Kombination mit AF64A zu einer Erhöhung der AF64A-induzierten neuronalen Schädigung (**Abbildung 10**).

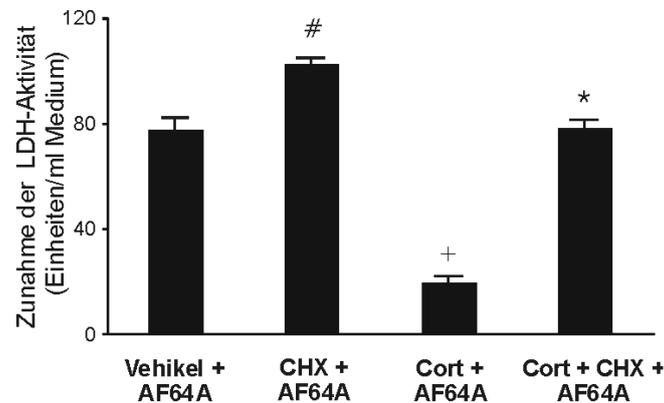


Abbildung 10: Einfluss von Cycloheximid auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion 72h nach AF46A. Corticosteron (Cort; 10 μ M) wurde 20h + 1h vor AF64A und Cycloheximid (CHX; 500 ng/ml) 20h vor AF64A (40 μ M) gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur entsprechenden Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung der 72h Kontrollen: Vehikel: $142,1 \pm 2,5$; Cort: $152,8 \pm 5,7$; CHX: $76,6 \pm 6,0$; Cort + CHX: $93,5 \pm 2,5$ Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.001$ vs. AF64A + Cort, + $p < 0.001$, # $p < 0.001$ vs. AF64A one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n=12-23 aus 2 unabhängigen Experimenten.

4.6. Involvierung des Cdk-Inhibitor p27 und des antiapoptischen Proteins Bcl₂ in der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion

In vorhergehenden Studien konnte in ischämischen Modellen nachgewiesen werden, dass unter AF64A eine Zellzyklusaktivierung vor Beginn einer nachweislichen Zellschädigung initiiert wird (Harms et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass der endogene Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk-Inhibitor) p27 schon nach 6 Stunden reduziert ist. Wir untersuchten daher, ob die neuroprotektive Wirkung von Corticosteron mit einer Unterbrechung der Zellzyklusaktivierung verknüpft ist. Mittels Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis des Cdk-Inhibitors zu verschiedenen Zeitpunkten; als House-keeping-Protein für Neurone diente Synaptophysin. Corticosteron konnte den Abfall von p27 nach 6 und 12 Stunden jedoch nicht verhindern (**Abbildung 11**).

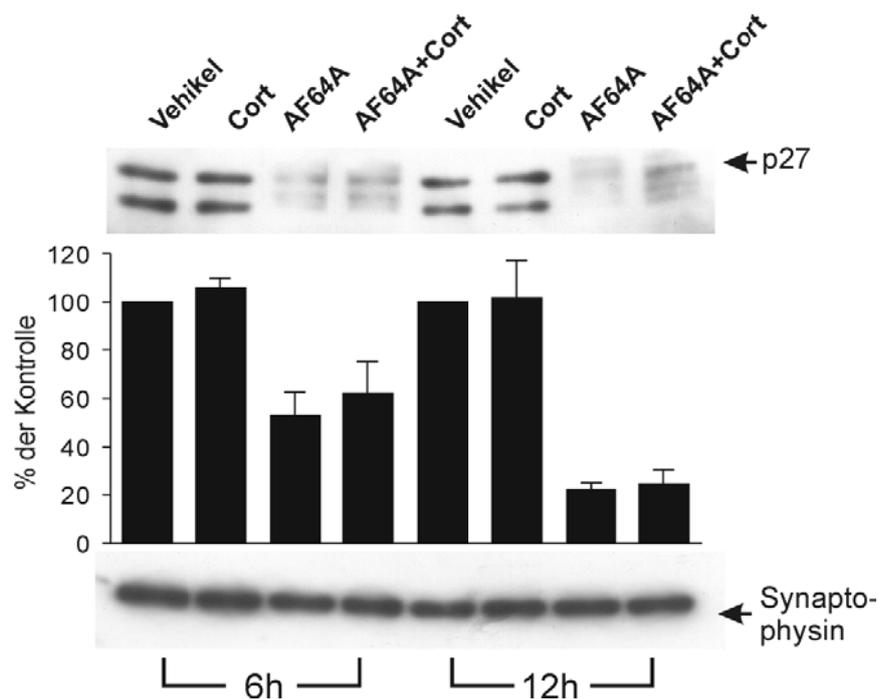


Abbildung 11: Einfluss von Corticosteron auf die Zellzyklusaktivierung unter AF64A. Corticosteron (Cort; 50 μ M) wurde 20h + 1h vor AF64A appliziert. Der Verlust des Cdk-Inhibitors p27 nach 6h und 12h in AF64A-behandelten Neuronen konnte durch die Vorbehandlung mit Corticosteron nicht reduziert werden. Synaptophysin dient als House-keeping-Protein.

Die Expression oder Aktivierung von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl₂ spielen bei verschiedenen neuroprotektiven Substanzen wie z.B. Estradiol (Harms et al., 2001) eine Rolle. Wir untersuchten daher, ob eine vermehrte Expression von Bcl₂ auch an der neuroprotektiven Wirkung von Corticosteron beteiligt ist. Bcl₂ wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Western-Blot-Analyse gemessen. Die Neuronen wurden mit Corticosteron 20 und 1 Stunde vorbehandelt. Corticosteron beeinflusste weder die basale Expression von Bcl₂, noch den unter AF64A-induzierten Anstieg von Bcl₂ nach 6 bis 48 Stunden (**Abbildung 12**).

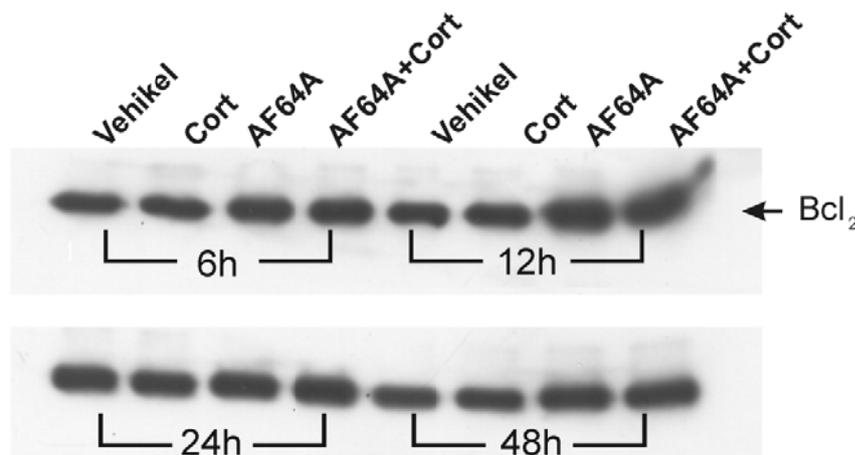


Abbildung 12: Einfluss von Corticosteron und AF64A auf die Expression von Bcl₂. Unter Corticosteron (Cort; 50 µM 20h + 1h vor AF64A) wurde die basale Konzentration von Bcl₂ nicht verändert. AF64A (40 µM) führte zu einer zeitabhängigen Erhöhung des Bcl₂-Spiegels mit einem Maximum nach 12h. Dieser Anstieg wurde durch Cort nicht beeinflusst.

4.7. Rolle der Caspasen bei der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion

Bei der Apoptose kann es über verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von Caspasen kommen; 1) durch direkte Aktivierung über Todesrezeptoren, gefolgt von einer Mitochondrien-unabhängigen Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3, 2) über Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien mit nachfolgender Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 oder 3) über die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum mit Aktivierung der Caspase-12.

Durch AF64A erfolgt eine Aktivierung der Caspase-3 (Harms et al., 2004). Unter Corticosteron konnte der durch AF64A ausgelöste Anstieg der Caspase-3-Aktivität nach 24 Stunden signifikant reduziert werden (**Abbildung 13**).

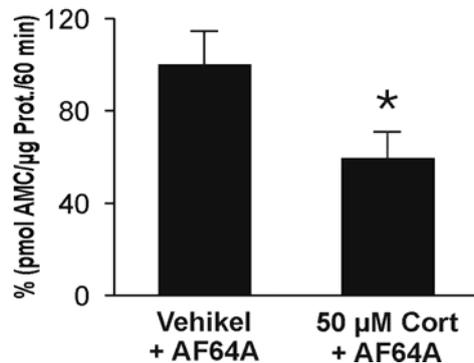


Abbildung 13: Einfluss von Corticosteron auf die Caspase-3-Aktivität, prozentual angegeben. Unter Corticosteronbehandlung (Cort; 50 µM 20h + 1h vor AF64A) kam es zur signifikanten Reduzierung der Caspase-3-Aktivität nach 24h. Basale Caspase-3-Aktivität Kontrollen: Vehikel: $3,3 \pm 5,3$; Cort: $4,9 \pm 6,8$ pmol AMC/µg Protein/60min). * $p=0.021$ vs. AF64A, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; $n=6$ für jede Gruppe, erhoben in 2 unabhängigen Experimenten.

4.8. Rolle des Phosphoinositid 3-Kinase-Systems in der neuroprotektiven Wirkung von Corticosteron

Einer der Überlebensmechanismen, die in vielen verschiedenen Zelltypen eine Apoptose-Abwehr vermitteln, ist die Aktivierung des PI 3-Kinase Weges. Uns interessierte daher die Bedeutung dieses Systems in der antiapoptotischen Wirkung von Corticosteron. So konnte durch die Behandlung mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor LY 294002, welcher einmalig gemeinsam mit Corticosteron 20 Stunden vor AF64A verabreicht wurde, der neuroprotektive Effekt von Corticosteron 48 Stunden nach der AF64A-Gabe aufgehoben werden. Die Hemmung der PI 3-Kinase führte jedoch nicht zur Verstärkung der AF64A-Wirkung (**Abbildung 14**).

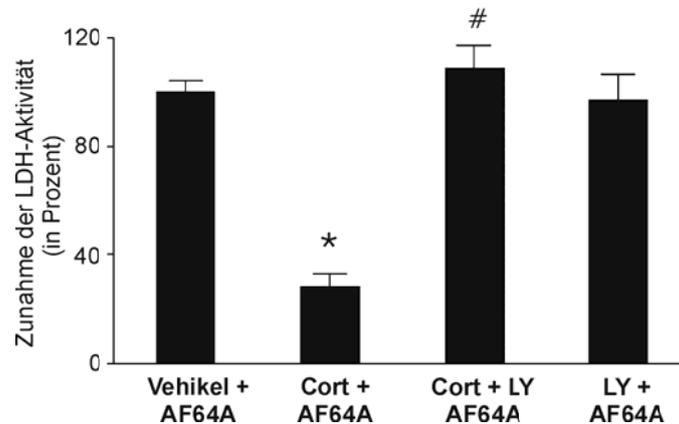


Abbildung 14: Einfluss des PI 3-Kinase-Inhibitors LY 294002 auf die Corticosteron vermittelte Neuroprotektion 48h nach AF64A. Corticosteron (Cort; 50 μ M) und LY 294002 (LY; 5 μ M) wurden 20h vor AF64A (AF64A; 40 μ M) gegeben. Die LDH-Freisetzung ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: 71,3 \pm 4,8; Cort + LY: 67,0 \pm 7,8 Einheiten/ml Medium). Der Anstieg der LDH-Freisetzung unter AF64A wurde als 100% berechnet. Angaben als Mittelwert \pm SEM, * p <0,001 vs. AF64A, # p <0,001 vs. AF64A + Cort, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n =19-27 für jede Gruppe, erhoben in 3 unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich außerdem, dass nur die Langzeitvorbehandlung mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor die schützende Wirkung von Corticosteron 48 Stunden nach AF64A antagonisieren konnte. Wurde LY 294002 hingegen 20 Stunden nach Corticosteron, d.h. gleichzeitig mit AF64A appliziert, konnte die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion nicht mehr beeinflusst werden (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Einfluss von LY 294002 auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion

	Vehikel + AF64A	Cort + AF64A	LY 0h + AF64A	LY 20h + AF64A	Cort + LY 0h + AF64A	Cort + LY 20h + AF64A
48h, Δ LDH	17,5 \pm 1,4	7,8 \pm 0,1*	20,0 \pm 2,4	23,0 \pm 2,5	11,6 \pm 1,7	18,9 \pm 1,97**
72h, Δ LDH	44,1 \pm 4,3	14,9 \pm 1,1***	41,8 \pm 3,6	31,6 \pm 5,6	18,1 \pm 4,0	24,0 \pm 3,0

Corticosteron (Cort; 50 μ M) wurde 20h vor AF64A (40 μ M), LY 294002 (LY; 5 μ M) wurde entweder 20h vor (LY 20h) oder gleichzeitig mit AF64A (LY 0h) gegeben. Die LDH-Freisetzung (Δ LDH) ist als Differenz zur vehikel-behandelten Kontrolle angegeben (basale LDH-Freisetzung 48h Kontrollen: Vehikel: 32,3 \pm 0,1; Cort + LY: 45,9 \pm 5,4; 72h Kontrollen: Vehikel: 50,1 \pm 1,8; Cort + LY: 61,6 \pm 7,9 Einheiten/ml Medium). Angaben als Mittelwert \pm SEM; * p =0,009, *** p =0,001 vs. AF64A, ** p =0,003 vs. Cort + AF64A, one way ANOVA, Tukey's posthoc-Test; n =8 für jede Gruppe, erhoben in einem Experiment.