

Kurzfassung

Epileptische Anfälle sind häufige neurologische Störungen des Kindesalters. Sie können als epileptische Einzelanfälle oder rezidivierend im Sinne einer Epilepsie auftreten. Der epileptische Anfall bewirkt die massive Freisetzung von Glutamat und die Dauerstimulation von Neuronen. Seine neurotoxische Wirkung besteht in einer Störung der zellulären Homöostase mit Anstieg des intrazellulären Kalziums und kann eine passive exzitotoxische sowie eine aktive apoptotische Komponente aufweisen. Die Epilepsie erfordert eine Therapie mit Antikonvulsiva, die über verschiedene Mechanismen die Aktivität exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter modulieren. Sowohl die Unterstimulation von NMDA-Glutamatrezeptoren, als auch die Wirkungsverstärkung von GABA können Apoptose im unreifen Gehirn bewirken. In dieser Arbeit ist untersucht worden, ob ein Pilocarpin-induzierter Status epilepticus im unreifen Rattenhirn zu einer verstärkten Neurodegeneration führt, welchen morphologischen Charakter diese Degeneration trägt, und in welcher Weise sie durch die zusätzliche Gabe des Benzodiazepins Diazepam beeinflusst wird. Dazu wurde 7-Tage alten Wistar-Ratten intraperitoneal Pilocarpin (200mg/kg), Diazepam (5mg/kg), Pilocarpin (200mg/kg) und im Intervall von 2 Stunden nach Auslösung eines Status epilepticus Diazepam (5mg/kg), sowie der Kontrollgruppe Aqua-Injektionslösung injiziert. Die Tiere wurden 3, 4, 6, 12 and 24 Stunden nach Injektion der Testsubstanz getötet. Es erfolgte die histologische (DeOlmos Silberfärbung) und morphologische (Elektronenmikroskopie) Aufarbeitung von Hirnschnitten. Mittels Western Blot wurde untersucht, ob die mit dem Status epilepticus assoziierten histologischen und morphologischen Veränderungen auf Proteinebene mit einer Beeinflussung der antiapoptotischen PI3K- und ERK1/2-Kaskade einhergehen, und wie dieser Effekt durch Diazepam modifiziert wird. Es konnte gezeigt werden, dass 24 Stunden nach einem Status epilepticus die Anzahl degenerierter Neurone im Gehirn der neugeborenen Ratte erhöht ist, und die zelluläre Degeneration morphologische Kriterien des exzitotoxischen und apoptotischen Zelltodes aufweist. Die Neurodegeneration wird potenziert, wenn im Anschluss an den Status epilepticus Diazepam verabreicht wird, während Diazepam allein keine Degeneration auslöst. Auf Proteinebene findet sich 4 Stunden nach Beginn des Status epilepticus ein deutlicher Anstieg der aktivierten Formen der antiapoptotischen Kinasen Akt, Raf-1 und ERK1/2. Diazepam bewirkt eine Unterregulation dieser antiapoptotischen Faktoren. In der Kombination beider Testsubstanzen zeigt sich, dass Diazepam den Status epilepticus-induzierten Kinaseanstieg mindert. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass GABA-Mimetika die Regulation antiapoptotischer Kaskaden während eines Status epilepticus ungünstig beeinflussen und den

neurotoxischen Effekt des Krampfanfalls im unreifen Gehirn der Ratte potenzieren. Ihre Verwendung beim Kleinkind sollte unter strenger Beachtung der medizinischen Indikation erfolgen.

Stichwörter: Gelegenheitsanfälle, Epilepsie, Status epilepticus, Antiepileptika, Diazepam, Apoptose, Exzitotoxizität

Abstract

Seizures are most common in young children, they may occur as occasional seizures or be manifestation of epilepsy. During epileptic discharges high levels of glutamate are released by excessively stimulated neurons and may cause neuronal damage due to disturbances of homeostasis and increase of intracellular calcium levels. Both, passive excitotoxic and active apoptotic forms of neuronal death may occur. Epilepsies are characterized by recurrent seizures. They are treated by antiepileptic drugs which modify the activity of excitatory and inhibitory neurotransmitters and/or ion channels. Either pharmacologic inhibition of NMDA-glutamate-receptors or stimulation of GABA-receptors may lead to apoptotic neuronal death in the immature brain. In this study we investigated whether pilocarpine-induced status epilepticus leads to neurodegeneration and examined its morphological features and modulation by diazepam. Seven day old Wistar-rats were intraperitoneally injected with pilocarpine (200mg/kg), diazepam (5mg/kg), pilocarpine (5mg/kg) followed by diazepam 2 hours after initiation of status epilepticus, or vehicle. Animals were killed 3, 4, 6, 12 and 24 hours after the injection of the compounds. Subsequently, brains were analyzed histologically (DeOlmos silver staining and electron microscopy). By Western Blot analysis we further investigated whether status epilepticus-associated histological and morphological changes were accompanied by regulation of antiapoptotic PI3K- and ERK1/2-pathways and if so, whether this regulation was modified by diazepam. We found that neurodegeneration in the immature rat brain is increased 24 hours after pilocarpine-injection and that this neurodegeneration has morphological features consistent with apoptotic and excitotoxic death. Additional application of diazepam potentiates apoptotic neurodegeneration, although diazepam alone does not trigger neurodegeneration. Four hours after the initiation of status epilepticus an increased activity of antiapoptotic kinases Akt, Raf-1 and ERK1/2 was shown. Diazepam decreases the activity of these protein-kinases. Diazepam given 2 hours after the initiation of status epilepticus compromises activation of antiapoptotic pathways by status epilepticus. It may be concluded that GABA-mimetics potentiate the neurotoxic effect of status epilepticus in the immature rat brain. Therefore, GABA-mimetic drugs should cautiously be used in young children.

Keywords: seizures, epilepsy, status epilepticus, antiepileptic drugs, diazepam, apoptosis, excitotoxicity

1 Einleitung

1.1 Formen epileptischer Anfälle im Kindesalter

Krampfanfälle zählen zu den häufigsten neurologischen Störungen des Kindesalters und betreffen nach US-amerikanischen Studien dort jährlich etwa 150 000 Kinder⁶⁰. Die Ursachen sind vielfältig und können zum einen in Hirnläsionen (tumorös, vaskulär, traumatisch, degenerativ, toxisch, hypoxisch, infektiös, entzündlich) und zerebralen Fehlbildungen bestehen, zum anderen Begleiterscheinung primär nicht zerebraler Erkrankungen (Stoffwechselerkrankungen, Erkrankungen mit Fieber) sein^{55, 108, 119, 143, 150}. Daneben spielen zahlreiche Medikamente sowie der Genuss oder Entzug von Alkohol und Drogen eine Rolle bei der Entstehung von Krampfanfällen^{44, 72, 108}. Ein Teil der epileptischen Anfälle, der vor allem die primär generalisierten Epilepsien betrifft, bleibt ätiologisch unklar¹⁰⁸. Es wird davon ausgegangen, dass die Voraussetzung für das Auftreten sowohl symptomatischer als auch unprovoked Anfälle eine anlagebedingt erhöhte Krampfbereitschaft ist, und dass diese bei bis zu 10 % aller Menschen besteht¹⁰⁸.

Epileptische Anfälle können im Rahmen einer Epilepsie, viel häufiger jedoch als epileptische Einzelanfälle auftreten. Als *Epilepsie* wird die chronische Form des Anfallsleidens bezeichnet, die durch das wiederholte Auftreten zumeist unprovoked Krampfanfälle gekennzeichnet ist^{59, 108}. Die Epilepsie tritt mit einer Inzidenz von 20-50/100 000 Einwohner pro Jahr auf, wobei die Erkrankung in 75 % der Fälle im Kindesalter beginnt^{59, 108}.

Epileptische *Einzelanfälle* treten einmalig oder in nur geringer Anzahl als Manifestation einer vorübergehend bestehenden Erkrankung auf, die das Gehirn primär oder sekundär betreffen kann. Als Ausdruck einer besonderen funktionellen Belastungssituation sistieren die Anfälle nach Ausheilung der Erkrankung^{59, 108}. Etwa 5 % der Bevölkerung erleiden mindestens einmal im Leben einen epileptischen Anfall, wobei überwiegend Kleinkinder im Rahmen fieberhafter Erkrankungen betroffen sind^{42, 59, 60, 108, 118}. Die Abgrenzung des Gelegenheitsanfalls von der chronischen Form des Anfallsleidens ist deswegen bedeutsam, weil der epileptische Einzelanfall mit Ausnahme des Status epilepticus keine medikamentöse Intervention erfordert, während die Epilepsie in der Mehrzahl der Fälle eine antikonvulsive Dauertherapie verlangt^{42, 56, 108}.

Jeder epileptische Anfall kann in einen *Status epilepticus* übergehen, bei dem der Patient mehrere Anfälle hintereinander erleidet bzw. ein Anfall länger als 30 Minuten anhält^{108, 150}. Im Status generalisierter Anfälle verliert der Patient das Bewusstsein, während der Status fokaler Anfälle ohne Bewusstseinsverlust ablaufen kann. Klinisch entspricht die Statussymptomatik der

Klinik des Anfalls, aus dem sich der Status entwickelt hat. Der Status epilepticus eines generalisierten Grand-mal Anfalls ist lebensgefährlich und durch die Gefahr von Aspiration, Hypoxie und Azidose mit dem Risiko bleibender neuronaler Schäden verbunden. Wird ein solcher Status nicht unterbrochen, entwickelt sich innerhalb von Stunden ein Hirnödem und es besteht die Möglichkeit, dass der Patient im zentralen Herz-Kreislauf-Versagen verstirbt^{59, 108, 150}. Die Mortalität im Status epilepticus liegt für Kinder bei 7%, für Erwachsene zwischen 40 und 60%¹⁴³.

1.2 Der epileptische Anfall im Experiment

1.2.1 Das Pilocarpin-Modell

Für die experimentelle Untersuchung der Pathophysiologie und Pathologie zerebraler Krampfanfälle wurden eine Reihe tierexperimenteller Modelle entwickelt⁴³, von denen hier das Pilocarpin-Modell vorgestellt wird.

Die Entwicklung des Pilocarpin-Modells geht auf Arbeiten von *Turski* und *Olney* zurück, die 1983 zeigten, dass die intrazerebrale^{96, 137} oder systemische^{135, 136} Injektion cholinergischer Agonisten zur Auslösung epileptischer Anfälle und damit verbundenen ausgedehnten Hirnschäden bei Ratten und Mäusen führt. Die cholinerge Induktion von Krampfanfällen kann sowohl über Agonisten des Acetylcholins, als auch über Inhibitoren der Acetylcholinesterase erfolgen^{133, 134}. Pilocarpin ist als Acetylcholinrezeptoragonist wirksam und führt über einen dreiphasigen Verlauf zur Entwicklung einer chronischen Krampfaktivität. Die systemische Verabreichung von Pilocarpin löst limbische Krampfanfälle aus, die sekundär generalisieren und in einen Status epilepticus übergehen können (Phase I). Klinisch äußern sich die Anfälle in olfaktorischen und gustatorischen Automatismen, Myoklonien der vorderen Gliedmaßen und Tremor des Kopfes. Der Status epilepticus verläuft als tonisch-klonischer Krampfanfall mit Hypersalivation und Fallneigung der Tiere^{133, 134}. Der Phase des akuten Anfalls folgt ein Intervall von etwa 40-50 Tagen, in dem klinisch keine Krampfaktivität nachweisbar ist (Phase II). Die dritte Phase umfasst eine Periode rezidivierender Krampfanfälle, wobei 2-3 Anfälle pro Woche auftreten^{25, 134}. Im Pilocarpin-Modell kann somit sowohl der epileptische Einzelanfall, als auch die Entwicklung eines chronischen Anfallsleidens nachgestellt und untersucht werden.

1.2.2 Erkenntnisse zu den zellulären Mechanismen epileptischer Anfälle

Auf zellulärer Ebene entspricht dem zerebralen Krampfanfall die plötzliche, zeitlich begrenzte, rhythmisch synchrone, hochfrequente Entladung neuronaler Zellen, wobei einzelne Verbände (fokaler Anfall) oder das gesamte Gehirn (primär/sekundär generalisierter Anfall) betroffen sein

können^{59, 108}. Die Variabilität in Lokalisation und Ausdehnung der pathologisch erregten Hirnareale bedingt dabei die vielfältigen klinischen Manifestationsformen epileptischer Anfälle^{59, 69, 108}. Als Ursache einer epileptischen Aktivität gelten u.a. eine anlagebedingte oder erworbene Senkung der Krampfschwelle, eine pathologische Erregungsbildung sowie eine unzureichende Begrenzung der Erregungsausbreitung¹⁰⁸.

1.2.2.1 Pathologische Erregungsbildung: Hirnläsionen und zerebrale Fehlbildungen als Schrittmacher der epileptischen Aktivität

Fokalen und sekundär generalisierenden Krampfanfällen liegen häufig Läsionen zugrunde, die physiologische Erregungsabläufe in der betroffenen Hirnregion stören und eine epileptische Aktivität bedingen können¹⁰⁸. Daneben kommen für die Entstehung epileptischer Anfälle heterotope Zellverbände im Rahmen kortikaler Dysplasien in Betracht. Diese Zellen weisen keine physiologische Funktion auf und können zu Schrittmacherzellen epileptischer Aktivität werden¹²¹. Heterotopien stellen eine Ursache therapieresistenter Epilepsien dar¹²².

1.2.2.2 Die gestörte Transmitterbilanz als Ursache pathologischer Erregungsbildung und insuffizienter Erregungsbegrenzung

Neben strukturellen Hirnläsionen werden für die Entstehung epileptischer Anfälle quantitative Veränderungen im Verhältnis exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter angenommen, in deren Folge die Erregbarkeit postsynaptischer Membranen gesteigert und inhibitorische Einflüsse gehemmt werden^{6, 7, 47, 59, 91, 108, 120}. Besonders wichtig für die Entstehung, Ausbreitung und Begrenzung neuronaler Erregung sind die Transmitter Glutamat, Acetylcholin und GABA¹.

1.2.2.2.1 Glutamat und Exzitotoxizität

Glutamat ist der quantitativ wichtigste erregende Transmitter des Gehirns und als Signalvermittler an exzitatorischen Synapsen für die Entstehung von Krampfanfällen von besonderer Bedeutung^{36, 47}. Die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt führt zur Bildung eines Aktionspotentials an der postsynaptischen Membran und zur schnellen Weiterleitung exzitatorischer Signale zwischen den einbezogenen Neuronen.

Rezeptoren

Entscheidend für die Wirkung von Glutamat ist die Wechselwirkung des Transmitters mit Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Unter den Glutamat-Rezeptoren sind ionotrope

¹ γ -Aminobuttersäure

(NMDA²-, AMPA³-, Kainat-Rezeptoren) und metabotrope Rezeptoren (G-Protein-gekoppelt) zu unterscheiden^{47, 120}. Von besonderer Bedeutung für die Pathophysiologie des Krampfanfalls ist die Wirkung von Glutamat an NMDA- und AMPA-Rezeptoren^{36, 47, 120}.

Der NMDA-Rezeptor

Beim NMDA-Rezeptor handelt es sich um einen ligandengekoppelten Ionenkanal, dessen Öffnung an der postsynaptischen Membran zum Natrium- und Kalziumeinstrom sowie zum Ausstrom von Kalium führt. Dies bewirkt die Anhebung des Membranpotentials mit Öffnung weiterer, spannungsabhängiger Natriumkanäle und die Entstehung eines Aktionspotentials. Eine strukturelle Besonderheit des NMDA-Rezeptors besteht in der vom Membranpotential abhängigen Blockade des an den Rezeptor gekoppelten Ionenkanals durch ein Magnesiumion. Die Bindung des Magnesiums wird durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran stabilisiert, eine Depolarisation führt zur Dissoziation des Ions. Da Glutamat erst nach der Dissoziation von Magnesium an den NMDA-Rezeptor binden kann, muss der Transmitter-Rezeptor-Interaktion bereits ein Anstieg des Membranpotentials vorausgehen. Für diese *Vordepolarisation* der postsynaptischen Membran ist der AMPA-Rezeptor wesentlich^{36, 47}.

Der AMPA-Rezeptor

Die Aktivierung des AMPA-Rezeptors durch exzitatorische Neurotransmitter, z.B. Glutamat, führt zur Öffnung von Ionenkanälen, durch die Natrium und z.T. auch Kalzium in die Zelle einströmt und Kalium aus der Zelle ausströmt^{36, 47}. Die Bindung eines passenden Liganden an den AMPA-Rezeptor führt zur primären Depolarisation der Zellmembran und zur Lösung der spannungsabhängigen Bindung von Magnesium im Ionenkanal des NMDA-Rezeptors. Nach der Dissoziation des Magnesium-Ions kann Glutamat an den NMDA-Rezeptor binden. Die Leitfähigkeit der AMPA-Rezeptor-gekoppelten Ionenkanäle ist deutlich geringer als die der NMDA-Kanäle und die Empfindlichkeit des Rezeptors für seine Liganden nimmt im zeitlichen Verlauf sehr schnell ab^{36, 47}. Dadurch ermöglicht die Aktivierung des AMPA-Rezeptors zwar die primäre Depolarisation, die Bildung eines Aktionspotentials an der postsynaptischen Membran erfordert jedoch die Stimulation von NMDA-Rezeptoren.

Die Eigenschaft der potenzialabhängigen Magnesiumblockade des NMDA-Rezeptors, die zur Aktivierung des Rezeptors eine gewisse Dauer und Intensität der synaptischen Stimulation

² N-Methyl-D-Aspartat

³ α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure

erfordert, ist entscheidend für seine Bedeutung bei der Umstrukturierung neuronaler Netzwerke. Diese spielt zum einen für Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung, zum anderen für die Neustrukturierung von Neuronenschaltkreisen im Zuge wiederkehrender epileptischer Anfälle eine tragende Rolle ^{47, 120}. Lernvorgänge stellen Strukturveränderungen des Gehirns dar, bei denen eine lang anhaltende, annähernd gleichzeitige Aktivität des afferenten und des nachgeschalteten Neurons zu einer verbesserten synaptischen Übertragung zwischen diesen beiden Zellen führt ¹²⁰. Schon die hochfrequente Aktivierung einer neuronalen Verbindung über Sekunden bewirkt dabei eine verbesserte synaptische Überleitung für Stunden. Aktive synaptische Verbindungen werden so zunehmend gefestigt, während über lange Zeit inaktive Verbindungen gelöst werden ¹²⁰. Für das Phänomen der aktivitätsabhängigen Verbesserung der synaptischen Übertragung wird der Begriff der „Langzeitpotenzierung“ verwendet, die als molekulare Grundlage der „synaptischen Plastizität“, d.h. der Wandelbarkeit synaptischer Verbindungen, gilt. Die erleichterte Ausbreitung der pathologischen Erregung in der Folge rezidivierender epileptischer Anfälle entspricht einem „pathologischen Lernprozess“, bei dem die anhaltend synchrone Erregung großer Neuronenverbände die synaptische Übertragung der während des Anfalls aktivierten neuronalen Verknüpfungen verbessert. Dadurch wird die Weiter- und Wiedernutzung dieser exzitatorischen Verbindungen in Form neuer Krampfanfälle gebahnt ^{66, 120, 133}.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren durch exzitatorische Transmitter nur ein vorübergehender Prozess. Glutamat wird schnell aus dem synaptischen Spalt entfernt, indem es von Astrozyten und präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen wird und führt somit nicht zu einer dauerhaften Stimulation der postsynaptischen Membran ^{36, 47}. Die präsynaptische Nervenzelle besitzt außerdem inhibitorische Autorezeptoren, die von exzitatorischen Transmittern erregt werden und die weitere Freisetzung von Glutamat verhindern. Im zerebralen Krampfanfall ist die Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt unphysiologisch hoch und seine Wirkung hält unphysiologisch lange an. Die exzessive Erregung postsynaptischer Neurone bewirkt eine Reihe intrazellulärer Prozesse, die zur Schädigung und letztlich zum Untergang der Nervenzelle führen können ^{13, 41, 85, 101}.

Exzitotoxizität: der neurotoxische Effekt glutamaterger Dauerstimulation

Im Tierexperiment wurde die neurotoxische Wirkung von Glutamat erstmals zu Beginn der siebziger Jahre beobachtet und *Olney* prägte für dieses Phänomen den Begriff der „Exzitotoxizität“ ^{95, 98, 99}. Entscheidend für den zytotoxischen Effekt der Dauerstimulation durch Glutamat ist die Wirkung des Transmitters am NMDA-Rezeptor ^{13, 36, 51, 106}. Die massive

Freisetzung von Glutamat im Krampfanfall führt über die Stimulation von AMPA-Rezeptoren zur Vordepolarisation und Lösung der Magnesiumblockade am NMDA-Rezeptor mit Öffnung des Kationenkanals. Natrium und Kalzium strömen in die Zelle ein und lösen ein Aktionspotential aus. Die andauernde Präsenz von Glutamat im synaptischen Spalt führt zum Depolarisationsblock mit anhaltendem Einstrom von Kationen, denen zum Ladungsausgleich Chloridionen folgen. Die Verschiebung des Ionengleichgewichtes zwischen intra- und extrazellulärem Raum bewirkt das Nachströmen von Wasser und die Schwellung der Zelle. Dieser Zustand ist potentiell reversibel, vorausgesetzt, die extrazelluläre Glutamatkonzentration nimmt wieder ab²⁷. Hält die Dauerdepolarisation der Zelle an, kann es durch den Einstrom des Wassers zur Membranruptur und Zytolyse mit Freisetzung des Zellinhaltes in den Extrazellularraum kommen³⁶. Neben der Störung des osmotischen Gleichgewichtes ist der intrazelluläre Kalziumanstieg ein wichtiger Aspekt der exzitotoxischen Reaktion. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration liegt unter physiologischen Bedingungen im Bereich um 10^{-7} M. Im Krampfanfall kommt es durch den Einstrom von Kalzium über Ionenkanäle (spannungsabhängige Kalziumkanäle, NMDA-Rezeptor-gekoppelter Kationenkanal), die gestörte Aktivität von Kalzium/Natriumaustauschern und die NMDA-Rezeptor-vermittelte Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern zu einem massiven Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies scheint der entscheidende und unumkehrbare Schritt der Exzitotoxizität zu sein, da die Entfernung des glutamatergen Stimulus zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zur Umkehr des Prozesses führt³⁶, die Entfernung von Kalzium aus dem extrazellulären Raum die Neurotoxizität glutamaterger Überstimulation aber verhindert²⁶. Die dauerhafte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert eine Reihe kalziumabhängiger Prozesse, die im Ergebnis die Zelle irreversibel schädigen (Aktivierung von Nukleasen, Zerstörung von Zytoskelett und Zellmembran durch kalziumabhängige Enzyme, Radikalbildung)^{26, 36, 61, 92, 106}. Infolge des Untergangs exzitotoxisch geschädigter Zellen, des gestörten Glutamatmetabolismus und der kalziumvermittelten Freisetzung von Glutamat aus synaptischen Vesikeln depolarisierter Nervenzellen steigt die extrazelluläre Transmitterkonzentration weiter an und die Anzahl der in den Prozess einbezogenen Neurone nimmt zu.

1.2.2.2.2 Acetylcholin

Acetylcholin ist ein weiterer exzitatorischer Neurotransmitter, der sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem zu finden ist⁴⁷.

Rezeptoren

Unter den Rezeptoren für Acetylcholin sind nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren zu unterscheiden⁴⁷. *Nikotinerge Rezeptoren* vermitteln die exzitatorische Transmitterwirkung über Kationenkanäle (Natriumeinstrom, Kaliumausstrom), während die *muskarinergen Rezeptoren* zu den metabotropen Rezeptoren zählen. Zu den muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren gehören M₁-, M₂- und M₃-Rezeptoren, wobei Acetylcholin seine exzitatorische Wirkung im ZNS vorrangig über die Interaktion mit dem M₁-Rezeptor vermittelt^{47, 120}. Der M₁-Rezeptor stimuliert über G-Proteine die Phospholipase C, wodurch es zur Aktivierung zytosolischer Proteine und zur Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommt. Der Effekt von Acetylcholin an zentralen Muskarin-Rezeptoren wurde als Grundlage der cholinergen Induktion von Krampfanfällen erkannt und, wie bereits erläutert, experimentell im Pilocarpin-Modell genutzt^{10, 21, 134}.

1.2.2.2.3 GABA

GABA ist der quantitativ wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und entsteht in den Nervenendigungen GABAerger Neurone durch Decarboxylierung aus Glutamat^{47, 120}.

Rezeptoren

GABA wirkt über zwei Arten von Rezeptoren, die als GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren bezeichnet werden. Der *GABA_A-Rezeptor* ist ein ligandengesteuerter Chloridionenkanal, der durch die Bindung von GABA geöffnet wird und zur Hyperpolarisation der Zellmembran führt¹²⁰. Der *GABA_B-Rezeptor* gehört zu den metabotropen Rezeptoren. G-Protein-vermittelt bewirkt GABA an diesem Rezeptor über die verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalziumkanälen und die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen ebenfalls eine Membranhyperpolarisation. Eine Vielzahl der Medikamente, die in der Behandlung von Anfallsleiden Verwendung finden, bindet an den GABA_A-Rezeptor. GABA hemmt die neuronale Aktivität und ist daher von entscheidender Bedeutung bei der Begrenzung der Erregungsausbreitung. Es wird angenommen, dass rezidivierende epileptische Anfälle die Umstrukturierung neuronaler Netze bewirken, bei der glutamaterge Projektionen verstärkt aktiv sind, während die GABA-vermittelte Inhibition gestört ist^{47, 120}. Wird eine pathologische Erregung im Bereich kortikaler oder subkortikaler Strukturen durch GABAerge Neurone nicht ausreichend inhibiert, kann die Erregung eines Neurons auf Zellen in der Nachbarschaft übergreifen. Es kommt zur Synchronisation von unter physiologischen Bedingungen differenziert und voneinander unabhängig tätigen Neuronen. Wird auf diese Weise eine

ausreichende Anzahl von Neuronen rekrutiert, entsteht die klinische Symptomatik des epileptischen Anfalls.

1.3 Therapie zerebraler Krampfanfälle

1.3.1 Allgemeine Prinzipien

Die Therapieprinzipien der Epilepsie umfassen primär die Behandlung einer eventuell zugrunde liegenden Grunderkrankung. Bei einem Teil der epileptischen Syndrome lässt sich das Auftreten von Krampfanfällen durch die Vermeidung anfallsauslösender Faktoren (z.B. Alkohol, Schlafentzug) verhindern. Kann auf diese Weise keine Anfallsfreiheit erreicht werden, besteht der nächste Schritt in einer medikamentösen Monotherapie in niedrigstmöglicher wirksamer Dosis. Treten weiter Anfälle auf, wird zunächst die Dosis des Medikaments bis zur maximal möglichen Dosierung gesteigert, bevor ein anderes Medikament verwendet wird. Sind die Krampfanfälle mit einer Monotherapie nicht beherrschbar, werden zwei oder mehr Medikamente kombiniert, wobei die Nebenwirkungen erheblich sein können. Bei weiter bestehender Therapieresistenz kann bei fokalen Epilepsien eine chirurgische Intervention erwogen werden, die darauf abzielt, den epileptischen Fokus zu entfernen¹⁰⁸.

1.3.2 Wirkung und Nebenwirkungen der antikonvulsiven Therapie

1.3.2.1 Wirkmechanismen

Der Wirkung von Antiepileptika liegen im Wesentlichen drei Mechanismen zugrunde: die Blockade von potentialabhängigen Natriumkanälen, die Wirkungsverstärkung von GABA und die Hemmung der Wirkung von Glutamat^{44, 45, 72, 93, 108}.

Natriumkanalblocker stabilisieren die inaktive Form spannungsabhängiger Natriumkanäle, wodurch der Einstrom von Natrium und die Ausbildung eines Aktionspotentials an der Nervenzellmembran verhindert werden. Vertreter dieser Gruppe von Antiepileptika sind Carbamazepin, Phenytoin und Lamotrigin. Valproat wirkt ebenfalls zum Teil über die Blockade von Natriumkanälen.

GABA-Mimetika verstärken die Wirkung von GABA auf verschiedenen Wegen. GABA-Agonisten fördern die Transmitterwirkung direkt durch ihre Wirkung am GABA_A-Rezeptor. Dieser besitzt Bindungsstellen für GABA, Benzodiazepine und Barbiturate. Primidon bindet ebenfalls an den GABA_A-Rezeptor. Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von GABA zu verstärken, besteht in der Hemmung der Wiederaufnahme von GABA in die präsynaptische Nervenzelle, wodurch die Verweildauer des Transmitters im synaptischen Spalt verlängert wird. Tiagabin ist auf diese Weise wirksam. Gabapentin und Valproat fördern die Aktivität der

Glutamat-Decarboxylase, die GABA durch Decarboxylierung aus Glutamat herstellt und erhöhen so die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt. Die Hemmung des Abbaus von GABA verlängert ebenfalls dessen Wirkdauer. Sie wird durch eine Inhibition der GABA-Transaminase, z.B. durch Vigabatrin, erreicht ^{16,93}.

Diazepam gehört zur Gruppe der Benzodiazepine. Es wirkt antikonvulsiv, anxiolytisch, sedierend und zentral muskelrelaxierend und wird zur Unterbrechung epileptischer Anfälle, aber auch bei psychischen Erregungszuständen, Schlafstörungen und in der Therapie der Spastik angewendet ^{44, 45, 46}. Für die Verwendung bei zerebralen Krampfanfällen ist Diazepam aufgrund seines schnellen Wirkungseintritts, der vielfältigen Applikationswege (p.o., rect., i.m., i.v.) und seines stark antikonvulsiven Effekts geeignet. Regelmäßige Anwendung führt zur Toleranzentwicklung gegenüber dem Medikament, weshalb es in der Dauertherapie der Epilepsie kaum Verwendung findet ⁹³. Benzodiazepine sind Medikamente mit großer therapeutischer Breite und eignen sich daher für die Anwendung in der Pädiatrie. Diazepam ist neben anderen Benzodiazepinen ein Medikament der Wahl im Status epilepticus bei Kindern ^{18, 150}.

Glutamat-Antagonisten inhibieren die Erregungsausbreitung über ihre Wirkung an Glutamatrezeptoren. Vertreter dieser Gruppe sind Felbamat, das antagonistisch am NMDA-Rezeptor wirkt, und Topiramamat, das neben seiner Glutamat-antagonistischen Wirkung am AMPA-Rezeptor auch als Natriumkanalblocker, GABA-Agonist und Carboanhydrase-Inhibitor wirkt.

1.3.2.2 Nebenwirkungen

Für die Anwendung der Antiepileptika sind eine Reihe systemischer und neurologischer Nebenwirkungen bekannt ^{64, 108}, die hier nur insoweit besprochen werden sollen, wie sie für den Schwerpunkt dieser Arbeit relevant sind. Bezüglich der Anwendung von Antikonvulsiva wird eine besondere Vulnerabilität des unreifen Gehirns für die Zeit des dritten Trimenons der Schwangerschaft und der ersten drei Lebensjahre vermutet, es sollen daher das teratogene und das neurotoxische Potential der Antiepileptika vorgestellt werden.

1.3.2.2.1 Antiepileptika in der Schwangerschaft: teratogenes Potential

Das Fehlbildungsrisiko für Feten epilepsiekranker, medikamentös behandelter Mütter liegt bei 1-2 % und ist damit im Vergleich zu Kindern gesunder Mütter um das Zwei- bis Vierfache erhöht ^{44, 64}. Die Veränderungen umfassen kardiale, gastrointestinale, urogenitale und skelettale Anomalien, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, kleinere faziale Dysmorphien, Neuralrohrdefekte,

Mikro- und Anenzephalie. Für die Benzodiazepine ist das Fehlbildungsrisiko nicht sicher erhöht, zumindest in der Monotherapie wirkt diese Medikamentengruppe nicht teratogen ¹¹³. Entscheidend für den teratogenen Effekt der Antiepileptika sind die Serumspitzenkonzentrationen, die durch Retardpräparate reduziert werden können. Das Risiko von Fehlbildungen ist stärker erhöht, wenn Antiepileptika mit verschiedenen Wirkmechanismen kombiniert werden und steigert sich auf 10 % bei der Kombination von zwei, auf 15 % bei drei Präparaten.

1.3.2.2.2 Neurotoxizität der Antikonvulsiva: proapoptotische Wirkung einer veränderten Transmitteraktivität im unreifen Gehirn

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Antiepileptika die Entwicklung des Gehirns beeinflussen. Für Barbiturate, Phenytoin, Valproat und Carbamazepin sind kleinere Kopfumfänge, Entwicklungsverzögerungen, eine beeinträchtigte Lernfähigkeit und verminderte intellektuelle Fähigkeiten bei der Anwendung beim Kleinkind und für die Neugeborenen epilepsiekranker, medikamentös behandelter Mütter beschrieben ^{1, 16, 33, 44, 113}.

Durch ihre Wirkung an NMDA- und GABA_A-Rezeptoren modulieren Antikonvulsiva die physiologische Aktivität von Glutamat und GABA. Besonders negativ wirkt der Einfluss auf die Transmitteraktivität während der Phase des schnellen Hirnwachstums, für die *Dobbing und Sands* den Begriff des „Brain growth spurt“ geprägt haben ³⁵. Dieses Stadium der Hirnentwicklung wird von verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten um die Geburt erreicht und umfasst beim Menschen das letzte Trimenon der Schwangerschaft sowie die ersten drei Lebensjahre. Die Überstimulation von NMDA-Rezeptoren während dieser Phase der Hirnentwicklung verursacht exzitotoxische Zelluntergänge ^{16, 34, 68, 100}. Sowohl die Unterstimulation von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat-Antagonisten als auch eine verstärkte GABA-Wirkung durch GABA-Mimetika bewirken eine apoptotische Zelldegeneration zu diesem Zeitpunkt der neuronalen Entwicklung. NMDA-Antagonisten und GABA-Mimetika zeigen dabei topographisch unterschiedliche Schädigungsmuster, die sich bei der kombinierten Anwendung der Substanzen addieren ^{16, 34, 68, 100}. Die Schädigung des kindlichen Gehirns durch eine veränderte Neurotransmitterfunktion betrifft nicht nur die Antiepileptika-Exposition, sondern auch die Anwendung von Sedativa, Anästhetika oder Drogen mit gleichem Wirkmechanismus ^{68, 100}. Der proapoptotische Effekt dieser Substanzen beschränkt sich im Tierversuch auf die Phase des rapiden Hirnwachstums, nach Abschluss dieser Periode reagiert das Gehirn nicht mehr mit Apoptose ^{16, 68, 100}. Das Gehirn erwachsener Tiere unterscheidet sich in seiner Reaktion auf externe Stimuli deutlich vom unreifen Gehirn: NMDA-Antagonisten

provozieren im reifen Gehirn exzitotoxische Zelluntergänge und GABA-Mimetika können im Gegensatz zu ihrer proapoptotischen Wirkung auf das unreife Gehirn vor dieser Exzitotoxizität schützen¹⁰⁰.

1.4 Apoptose als Form des Zelluntergangs im unreifen Gehirn

1.4.1 Definition, Bedeutung

Apoptose ist die „programmierte“ Form des Zelltodes. Angestoßen durch ein externes oder internes Todessignal, wird ein in jeder Zelle vorliegendes genetisches Programm aktiviert, das über eine Reihe von Prozessen den Zelltod herbeiführen kann. Die Zelle durchläuft dabei morphologisch charakteristische Stadien, deren Beschreibung erstmals von *Kerr, Wyllie und Curie* für den apoptotischen Zelltod von Körperzellen vorgenommen wurde⁷⁵.

Der apoptotische Zelluntergang besteht in seiner frühen Phase in Veränderungen des Zellkerns^{34, 100}. Es kommt zur Kondensation und Verklumpung des Chromatins, das sich in Kugelform in der Nähe der Kernmembran anreichert. Später zeigen sich Diskontinuitäten in der nukleären Membran, deren Fragmentierung schließlich zur Auflösung des Kernkompartiments mit Vermischung von Kerninhalt und Zytoplasma führt. Parallel zu den Veränderungen der Kernmembran zeigen sich späte Merkmale des apoptotischen Zelltodes: die Schwellung von Mitochondrien sowie die Auftreibung und Fragmentierung der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Die residualen Bestandteile der Zellorganellen sammeln sich in der Nähe der Zellmembran. Die Zelle beginnt insgesamt zu schrumpfen und es erscheinen Ausstülpungen der Zytoplasmamembran („membrane blebbing“), mit deren Abschnürung die charakteristischen apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) entstehen. Diese werden von umgebenden Phagozyten aufgenommen oder im extrazellulären Raum abgebaut^{34, 85, 100, 141}.

Die physiologische Bedeutung von Apoptose liegt in der Regulation der Zellzahl von Geweben²⁰. Während der embryonalen Entwicklung sind bestimmte Zellverbände nur von vorübergehender Bedeutung und werden in späteren Entwicklungsstadien eliminiert. Desweiteren ermöglicht Apoptose die Selektion geschädigter Zellen zum Schutz des Gesamtorganismus. Die fehlerhafte Regulation von Apoptose ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen festzustellen, die mit einer erhöhten (Herzinsuffizienz, chronische Hepatitis C, Transplantatabstoßung) oder erniedrigten (Epstein-Barr-Virus-Infektion, Tumoren) Apoptoserate einhergehen^{2, 23, 70, 79, 89, 127}.

1.4.2 Regulation

1.4.2.1 Proapoptotische Signalwege: Caspasen⁴, Bcl-2-Proteine⁵, Cytochrom C

Es gibt drei Wege zur Initiation von Apoptose: den extrinsischen Weg über die Aktivierung zellulärer Todesrezeptoren, den intrinsischen Weg über die Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranösen Kompartiment des Mitochondriums und einen Kalzium-abhängigen Aktivierungsweg.

Zentrale Effektorenzyme proapoptotischer Signalwege sind die *Caspasen*^{62, 141}. Sie bewirken die Mehrzahl der morphologischen Veränderungen von Apoptose, experimentell lässt sich Apoptose durch Caspaseinhibitoren verhindern^{39, 62}. Zu den Zielproteinen der Caspasen zählen Nukleasen, die die zelluläre DNA in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren spalten („DNA-Fragmentierung“). Dieser Schritt in der Apoptosekaskade ist irreversibel, da die Fragmentierung der zellulären DNA die Zelle nachhaltig schädigt¹⁴¹. Caspasen spalten auch die Kernmembran und Proteine des Zytoskeletts. Sie bewirken dadurch die Auflösung des Kernkompartiments und den Formverlust der Zelle, beides morphologische Kriterien des apoptotischen Zelltodes⁶². Die Aktivierung von Caspasen erfolgt zum einen durch die Wechselwirkung mit Membranrezeptoren, so genannten Todesrezeptoren. Diese werden durch Liganden (Apo-Protein, Fas-Ligand, Tumornekrosefaktor) aktiviert und vermitteln über Adaptermoleküle die Akkumulation von Procaspasemolekülen, die sich gegenseitig aktivieren können. Daneben spielen Kofaktoren eine Rolle bei der Aktivierung von Caspasen (u.a. Apaf-1-Protein im Rezeptor-Caspase-Initiatorkomplex). Ein dritter Mechanismus ist die proteolytische Aktivierung von Effektorcaspasen durch übergeordnete Initiatorcaspasen^{62, 141}.

Die Mitglieder der *Bcl-2-Familie* bilden eine Gruppe apoptoseregulierender Faktoren, von denen einige proapoptotisch (u.a. Bad), andere antiapoptotisch (u.a. Bcl-2, Bcl-X_L) wirksam sind. Bcl-2 Faktoren bilden Heterodimere, wobei diese aus zwei synergistisch oder zwei antagonistisch wirksamen Faktoren bestehen können und sich dementsprechend in ihrer Funktion verstärken oder hemmen^{62, 141}. Proapoptotische Faktoren der Bcl-2-Familie bewirken die Freisetzung von *Cytochrom C*, das eine proapoptotische Eigenwirkung hat und ein Aktivator für Caspase 9 ist. Caspase 9 aktiviert weitere Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), deren Zielproteine Nukleasen sind. Die Wirkung antiapoptotischer Bcl-2-Faktoren beruht auf der verminderten Freisetzung

⁴ Cysteinyl-Aspartasen

⁵ B-Zell-Lymphom-Proteine

von Cytochrom C durch die Stabilisierung der mitochondrialen Membran.

Die dritte Variante der Apoptoseinitiation besteht in der *Freisetzung von Kalzium* aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die intrazelluläre Akkumulation von Kalzium stört die Homöostase der Zelle und bewirkt neben der Aktivierung von Caspasen (Caspase 12) die Stimulation einer Reihe weiterer Kalzium-abhängiger Proteine, die wichtige Zellprozesse stören⁶².

1.4.2.2 Antiapoptotische Signalwege: PI3K⁶- und ERK1/2-Kaskade⁷

Die PI3K- und die ERK1/2-Kaskade können sowohl die Aktivierung von Caspasen, als auch die Wirkung proapoptotischer Faktoren auf das Mitochondrium verhindern. Neben ihrer Bedeutung für das Überleben von Zellen haben zahlreiche Untersuchungen die wichtige Funktion dieser Signaltransduktionswege für Differenzierungsprozesse während der embryonalen Entwicklung^{53, 79, 105, 116, 146}, aber auch für die Entstehung von Tumoren^{28, 79, 127, 140, 151} gezeigt.

1.4.2.2.1 PI3K-Kaskade

Die PI3K ist ein aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit gebildetes Heterodimer mit Protein- und Lipidkinaseaktivität⁷⁹. Die Aktivierung der Kinase erfolgt über rezeptorassoziierte Tyrosinkinase, die ihrerseits durch die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen aktiviert werden. Substrate der PI3K sind Phosphoinositide aus Membranen, die das Enzym in D3-Position am Inositolring phosphoryliert. Die Phospholipide können zum einen direkt mit Proteinen des Zytoplasmas interagieren, sind daneben aber Substrate der Phospholipase C, die sie hydrolytisch in Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol (DAG) spaltet⁷⁹. DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die weitere antiapoptotische Signalkaskaden stimulieren kann. Durch direkte Interaktion können die Phospholipide auch Akt (Proteinkinase B) und weitere, so genannte phosphoinositidabhängige Kinasen (PDK) aktivieren. PDKs sind eine Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, die zum einen Akt, zum anderen die PKC stimulieren⁷⁹. *P-Akt* wirkt antiapoptotisch durch die Hemmung von Caspase-9 und Bad. Die Inhibition von Bad verhindert die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. P-Akt wirkt darüber hinaus stimulierend auf die ERK1/2-Kaskade^{79, 141}. In ihrer Funktion als Proteinkinase aktiviert die PI3K G-Proteine, wie z.B. Ras, einen Aktivator der ERK1/2-Kaskade. Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs nimmt damit gleichzeitig Einfluss auf den zweiten

⁶ Phosphatidylinositol-3-kinase

⁷ Extracellular signal-regulated kinase

wichtigen antiapoptotischen Signalweg, die ERK1/2-Kaskade.

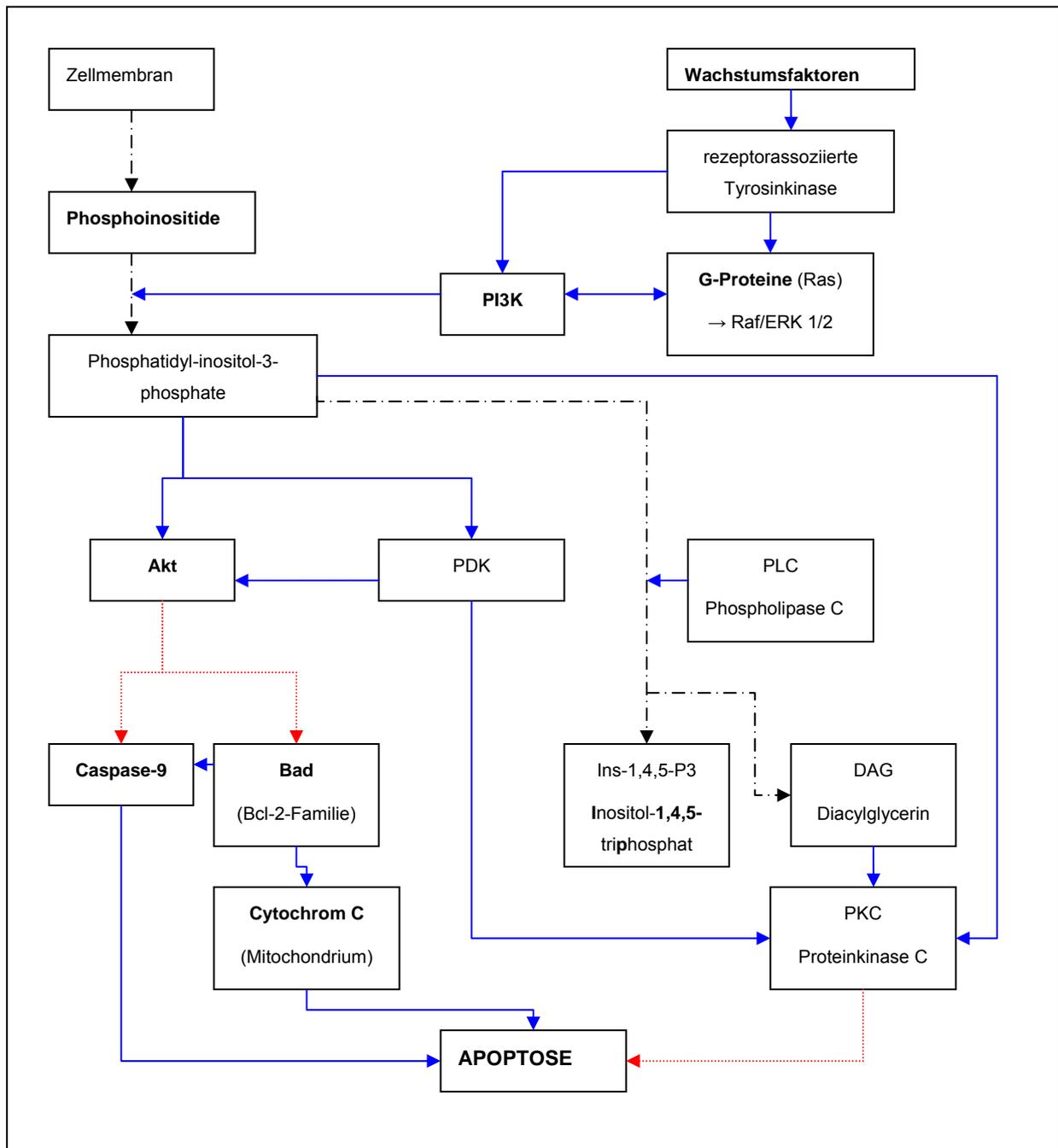


Abb. 1: Übersicht zur PI3K-Kaskade:.....entsteht aus, ___fördert,hemmt

1.4.2.2.2 ERK1/2-Kaskade

Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen werden auch als mitogen aktivierte Proteinkinasen oder MAP-Kinasen bezeichnet. Sie bilden eine Gruppe von Tyrosinkinasen, die über die Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten im aktiven Zentrum des Enzyms stimuliert werden ¹⁰⁵. ERK werden durch übergeordnete Kinasen, die als MAP/ERK-Kinasen oder MEK

bezeichnet werden, aktiviert. MEK sind Substrate der MEK-Kinasen oder MEKK. Zu den MEKK gehören eine Vielzahl von Proteinen mit Kinaseaktivität, die sowohl strukturell als auch in ihrem Aktivierungsmodus völlig unterschiedlich sind. Effektoren der ERK sind Membranproteine, zytoplasmatische Proteine, Proteine des Zytoskeletts und Kernproteine.

ERK1/2 sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 43 und 41 kDa. Die Enzyme werden ubiquitär exprimiert, wobei die Verteilung in den Geweben unterschiedlich ist: ERK 2 dominiert in Immunzellen; in Zellen des Neuroendokriniums kommen beide Formen gleichermaßen vor¹⁰⁵. ERK1/2 werden von MEK1/2 aktiviert. Zu den MEK1/2 aktivierenden Kinasen gehören die Isoformen des Raf-Proteins. Es werden a-Raf, b-Raf und c-Raf unterschieden, wobei c-Raf (Raf-1) die am besten untersuchte Kinase ist. *Raf-1* kommt ubiquitär vor. Für die MEKK existieren eine Vielzahl von Aktivatoren, zu denen einerseits über rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen aktivierte G-Proteine, wie z.B. Ras, zählen. Andererseits kann Raf-1 direkt über Proteinkinasen wie Proteinkinase C oder Akt aktiviert werden^{79, 105}. Raf-1 liegt als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes vor, der das Protein sowohl in seiner aktiven als auch in seiner inaktiven Form stabilisiert. Störungen der Funktion einzelner Proteine des Komplexes verhindern die Wirkung von Raf-1 auf untergeordnete Kinasen. Die Vielzahl von Bindungsstellen innerhalb des Proteinkomplexes erklärt die Wirksamkeit der zahlreichen, strukturell verschiedenen Aktivatoren des Raf-1-Proteins. Die Bindung diverser Aktivatorproteine zeigt qualitative Unterschiede in der Stimulation von Raf-1, für das dadurch ein weites Spektrum an Aktivitätszuständen existiert¹⁰⁵. ERK1/2 aktivieren untergeordnete Kinasen, zu denen z.B. die „Rsk⁸-Familie“ zählt. Zur Gruppe der ERK-aktivierten Kinasen gehören Rsk1, Rsk2 und Rsk3. Rsk2 inaktiviert Bad und kann dadurch Apoptose verhindern¹⁷. Rsk3 sind auch in die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB⁹ involviert, der die Expression antiapoptotischer Gene induziert¹⁷. Desweiteren reduzieren ERK1/2 die Aktivität von Caspasen². Neben der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren besteht eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Genexpression durch ERK1/2 in der Aktivierung von Histonen über intermediäre Proteinkinasen¹⁰⁵. Histone sind basische Proteine, die über ihre Seitenketten DNA binden. Es kommt zu einer Aufwicklung der DNA um die kugeligen Proteine, wodurch die dreidimensionale Struktur („Tertiärstruktur“) der DNA entsteht. Diese erschwert die Transkription von Genen, da Transkriptionsfaktoren ihre DNA-Bindungsstellen nicht erreichen können. Die Phosphorylierung von Histonen löst die

⁸ pp90-ribosomale-S6-Kinase

⁹ cAMP response proteine-binding element

DNA-Tertiärstruktur, wodurch die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich wird ¹⁰⁵.

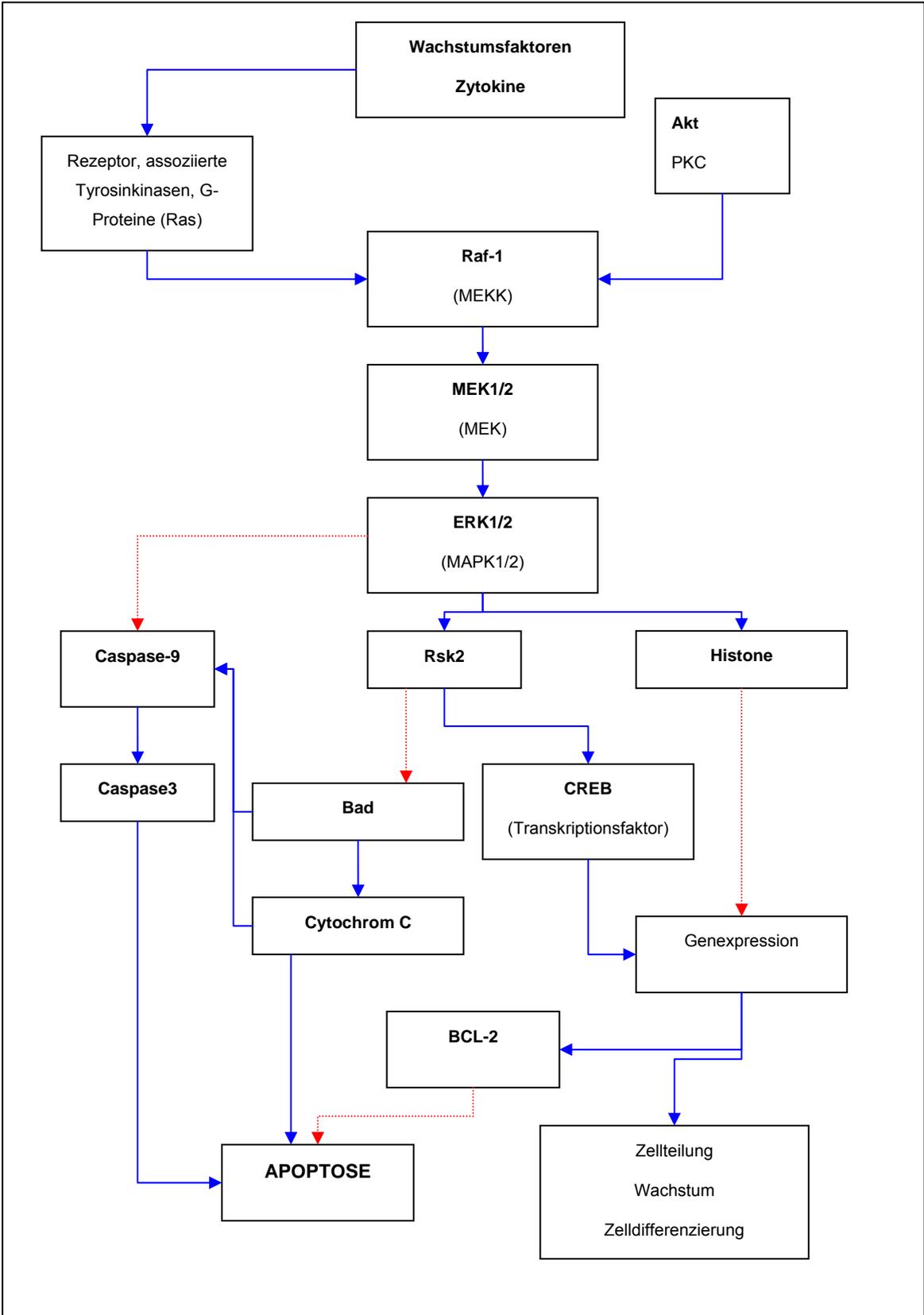


Abb. 2: Übersicht zur ERK1/2-Kaskade: _____ aktiviert, _____ hemmt

1.5 Zielstellung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass tierexperimentell sowohl der epileptische Anfall, als auch gängige Antikonvulsiva einen zytotoxischen Effekt auf das unreife Gehirn zeigen. In beiden Fällen beruht dieser Effekt auf einer Veränderung der Neurotransmitteraktivität. Während die Auswirkung von Krampfanfällen und die Wirkung antiepileptischer Medikamente auf das unreife Gehirn gut untersucht sind, ist wenig über die Veränderungen unter Kombination beider Einflüsse bekannt, die klinisch relevant wird, wenn einem Kind während oder in der Folge eines epileptischen Einzelanfalls ein Antiepileptikum verabreicht wird. Theoretisch ist für diese Kombination von Krampfanfall und Medikament die Summation der exzitotoxischen Wirkung glutamaterger Dauerstimulation und der proapoptotischen Wirkung der medikamentösen Transmitterinhibition anzunehmen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Antikonvulsiva die neurotoxische Wirkung eines Pilocarpin-induzierten Krampfanfalls im unreifen Gehirn modifizieren. Als Parameter dienen dabei eine mögliche Neurodegeneration und die Regulation antiapoptotischer Signaltransduktionskaskaden. Dazu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt der Pilocarpin-induzierte Status epilepticus im Gehirn der 7 Tage alten Ratte zu einer Neurodegeneration und wenn ja, welchen Charakter hat diese Degeneration?
- Wie beeinflusst Diazepam in primär nicht-toxischer Dosierung mögliche degenerative Veränderungen durch den Krampfanfall?
- Hat der Status epilepticus Einfluss auf die Regulation von Apoptose? Wirkt der Pilocarpin-induzierte Status epilepticus auf die Regulation von PI3K- und ERK1/2-Kaskade und wenn ja, wie verhält sich die Aktivität der Kaskaden im zeitlichen Verlauf?
- Beeinflusst Diazepam die Regulation dieser Kaskaden und wenn ja, kommt es zu einem Summationseffekt bei der Kombination von Status epilepticus und Medikament?
- Welche Schlussfolgerungen für den Umgang mit GABA-mimetischen Antikonvulsiva ergeben sich?