

4 Diskussion

4.1 Auswirkung des Status epilepticus auf das unreife Rattenhirn

4.1.1 Apoptotische Neurodegeneration nach Status epilepticus

In der Auswertung der nach de Olmos und Ingram gefärbten Hirnschnitte konnte gezeigt werden, dass in der Folge eines Pilocarpin-induzierten Status epilepticus im Gehirn der 7 Tage alten Ratte die Anzahl degenerierter Neurone im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant ansteigt. Hierbei erwies sich der Thalamus 24 Stunden nach Auslösung des Status epilepticus als die am stärksten betroffene Hirnregion.

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigten die Zellen morphologische Charakteristika des apoptotischen Zelltodes: Kondensation und Verklumpung des Chromatins mit Anreicherung entlang der Kernmembran, Fragmentierung der nukleären Membran mit Auflösung des Kernkompartiments und Vermischung von Kerninhalt und Zytoplasma, Ansammlung des Zellinhalts in der Nähe der Zytoplasmamembran und Abschnürung von Apoptosekörpern. Daneben zeigten Zellen der Pilocarpin- und der Pilocarpin/Diazepam-Gruppe Dendritenschwellungen, die ein Merkmal der exzitotoxischen Zellschädigung darstellen.

Es konnte demonstriert werden, dass im Pilocarpin-Modell der 7-Tage alten Ratte der Status epilepticus eine vermehrte Neurodegeneration bewirkt, und dass diese Degeneration eine apoptotische und eine exzitotoxische Komponente aufweist.

4.1.1.1 Probleme bei der Bestimmung der Form des Zelluntergangs im Status epilepticus

Der Nachweis neurodegenerativer Veränderungen im Anschluss an einen Status epilepticus steht im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die sich mit den Mechanismen zerebraler Schädigung durch Krampfanfälle beschäftigt haben ^{9, 37, 49, 67, 130, 134, 138, 144, 145}. Zelluntergänge infolge von Krampfanfällen und Status epilepticus wurden in zahlreichen Hirnregionen gezeigt und akute neuronale Schäden im Rahmen einer exzitotoxischen Reaktion sind unumstritten. Unklar ist dagegen weiterhin, in welchem Modus sich der Untergang der betroffenen Zellen vollzieht. *Bengzon und Mitarbeiter* untersuchten den exzitotoxischen Zelltod im Kindling- und Kainat-Modell und fanden apoptotische Zelluntergänge im Gyrus dentatus erwachsener Sprague-Dawley-Ratten ⁸. *Kubová et al.* beschrieben die thalamische Neurodegeneration im Lithium-Pilocarpin-Modell der 12 Tage alten Ratte als nekrotisch ⁸⁰. *Fujikawa und Mitarbeiter* beobachteten unter Anwendung des gleichen Modells nekrotische Zelluntergänge im Gehirn erwachsener Wistar-Ratten ^{50, 51}. Andere Autoren sprechen vom gleichzeitigen Auftreten nekrotischer ^{9, 30} und apoptotischer Zelluntergänge ^{9, 30}. Auch Formen des

Zelluntergangs, die morphologisch weder eindeutig dem apoptotischen noch dem nekrotischen Zelltod entsprechen, sind diskutiert worden^{34, 100, 101, 133}. Es wird angenommen, dass diesen unterschiedlichen Erkenntnissen zur Form des Zelltodes im Status epilepticus eine Alters- und Modellabhängigkeit der zellulären Reaktion auf exzitotoxische Stimuli zugrunde liegt und auch durch die Intensität des Stimulus verschiedene Formen des Zelluntergangs getriggert werden^{29, 37, 114, 123, 130, 145}. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Auswahl der Methode, die zur Bestimmung der Form des Zelluntergangs angewendet wird. Bisher hat sich nur die ultrastrukturelle Untersuchung der Zellen als zuverlässiger Nachweis für Apoptose bewährt, während eine Reihe häufig verwendeter biochemischer Methoden (TUNEL, DNA-Fragment-Gelelektrophorese) sich als apoptoseunspezifisch erwiesen haben^{34, 100}.

4.1.2 Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden im Status epilepticus

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Status epilepticus im Pilocarpin-Modell der neugeborenen Ratte zu einer verstärkten Aktivierung der PI3K- und der ERK1/2-Kaskade führt. Die stärkste Aktivierung für die Elemente Raf-1, ERK1/2 und Akt zeigten sich hierbei vier Stunden nach Auslösung des Status epilepticus. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer Autoren, die sich mit der Auswirkung von Krampfanfällen auf die Regulation antiapoptotischer Kaskaden beschäftigt haben: *Funke und Mitarbeiter* beschreiben die verstärkte Aktivierung von Tyrosinkinasen im Pilocarpin-induzierten Status epilepticus bei der erwachsenen Wistar-Ratte⁵². Dabei wurde die stärkste Aktivierung 3 und 5 Stunden nach dem Krampfanfall in verschiedenen Regionen des Hippocampus beobachtet. Unter den aktivierten Tyrosinkinasen fand sich auch eine Kinase mit dem Molekulargewicht von 21 kDa und die Autoren vermuten hier die Aktivierung von Ras, einem Aktivatorprotein von Raf-1. *Berkeley und Mitarbeiter* untersuchten die Regulation der ERK1/2-Kaskade unter dem Einfluss von Pilocarpin im Gehirn 5 bis 6 Wochen alter Mäuse. Hierbei zeigte sich eine Aktivierung der ERK1/2-Kaskade in zahlreichen Hirnregionen, wobei Hippokampus und Gyrus dentatus am stärksten betroffen waren¹⁰.

4.1.2.1 Mechanismen der Aktivierung antiapoptotischer Signaltransduktionswege im Status epilepticus

4.1.2.1.1 Aktivierung über den M₁-Muskarin-Rezeptor

Untersuchungen zu den biochemischen Grundlagen Pilocarpin-induzierter Krampfanfälle haben ergeben, dass sowohl die Auslösung von Krampfanfällen, als auch die Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden über den M₁-Muskarin-Rezeptor vermittelt wird^{10, 11, 12, 21, 83, 84}.

^{134, 148}. Grundlegend waren hierbei Arbeiten zu M₁-Rezeptor Knockout-Mäusen. Tiere, denen der M₁-Cholinrezeptor fehlt, überleben hohe Dosen Pilocarpin, während die gleiche Dosis bei Kontrolltieren mit M₁-Rezeptor schwerste Krampfanfälle auslöst, die von einer hohen Letalität begleitet sind ^{21, 58}. Untersuchungen zur ERK1/2-Aktivierung im Pilocarpin-induzierten Status epilepticus der Maus zeigten, dass die Aktivierung der Kaskade unabhängig von der Induktion des Status epilepticus erfolgt und keine Rolle für die Initiation des Krampfanfalls spielt ¹⁰. So wurde eine Aktivierung von ERK1/2 unter dem Einfluss subkonvulsiver Pilocarpin-Dosen beobachtet, während umgekehrt die Hemmung der ERK1/2-Kaskade durch den MEK-Inhibitor SL 327 keinen Einfluss auf die Entstehung eines Status epilepticus ausübte. Es handelt sich somit bei der cholinergen Induktion von Krampfanfällen und der Aktivierung von ERK1/2 über Cholinomimetika um zwei voneinander unabhängige Prozesse, die durch unterschiedliche Mechanismen über den M₁-Muskarin-Rezeptor vermittelt werden.

4.1.2.1.2 Aktivierung über Glutamat

Neben der Aktivierung der ERK1/2-Kaskade über muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren wurde die Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden durch Glutamat gezeigt ^{10, 31, 86, 87, 104, 142, 149}. Dabei sind sowohl die ionotropen Glutamat-Rezeptoren als auch der metabotrope Rezeptor von Bedeutung ³¹. Erhöhte Glutamat-Konzentrationen scheinen über die Aktivierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren und den verstärkten Einstrom von Kalzium in die Zelle zunächst die PI3K-Kaskade zu aktivieren, die dann über die Aktivierung des Ras-Proteins die ERK1/2-Kaskade stimulieren kann ^{31, 86, 87, 126, 149}. Daneben beschreiben *Yang und Mitarbeiter* einen Kalzium-unabhängigen Weg, bei dem die ERK1/2-Kaskade ohne die vorangehende Aktivierung des PI3K-Signalwegs auch direkt über den NMDA- und den metabotropen Glutamat-Rezeptor stimuliert wird ¹⁴⁹. Im Ergebnis der Aktivierung antiapoptotischer Signalwege kommt es neben der Inhibition proapoptotischer Faktoren zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die eine verstärkte Expression antiapoptotischer Proteine bewirken. Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über NMDA-Rezeptoren ist dabei häufig die Bedeutung von CREB dargestellt worden, das u.a. mit einer gesteigerten BDNF^{1 0}-Synthese assoziiert ist ^{74, 86, 110}.

4.1.2.1.3 Aktivierung durch Neurotrophine

Es ist darüber hinaus dokumentiert, dass die Entwicklung eines Status epilepticus mit dem

^{1 0} Brain-derived neurotrophic factor

Anstieg neurotropher Faktoren verbunden ist, die wesentlich für die Entwicklung des Nervensystems, das Überleben von Nervenzellen und die Etablierung neuronaler Netzstrukturen sind^{14, 16, 128}. Mehrere Arbeitsgruppen haben die Regulation von BDNF im Status epilepticus untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Hirnregion 2 bis maximal 6 Stunden nach Auslösung eines Status epilepticus ein Anstieg von BDNF-mRNA induziert wird^{14, 78, 115, 128}. BDNF gilt als wichtiger Aktivator antiapoptotischer Kaskaden und könnte ein weiterer Mechanismus bei der Aktivierung von ERK1/2- und PI3K-Kaskade im Status epilepticus sein.

4.1.2.2 Bedeutung der Aktivierung von ERK1/2- und PI3K-Kaskade: Neuroprotektion im Status epilepticus

Es ist vielfach beschrieben worden, dass die Aktivierung antiapoptotischer Kaskaden mit einem stärkeren Überleben von Zellen korreliert und die Anzahl apoptotischer Zelluntergänge vermindert^{16, 63, 111, 117, 147}. Umgekehrt ist die Apoptoserate eines Gewebes unter dem Einfluss toxischer Stimuli (Ischämie, Trauma, Status epilepticus) erhöht, wenn die Aktivität der ERK1/2- oder PI3K-Kaskaden experimentell gehemmt wird^{10, 16}.

Berkeley und Mitarbeiter beobachteten im Pilocarpin-Modell der Maus, dass die Inhibition der ERK1/2-Aktivierung im Status epilepticus sehr viel schwerere Krampfanfälle verursacht und die Mortalität im Status um das Sechsfache erhöht¹⁰. Für ERK1/2 ist neben dem antiapoptotischen Effekt auch ein Einfluss auf den Verlauf und die Schwere des Krampfanfalls anzunehmen. In diesem Zusammenhang ist gezeigt worden, dass ERK1/2 einen speziellen Kalium-Kanal phosphoryliert, über den die Kaskade offenbar direkt den neuronalen Erregungszustand beeinflussen kann¹⁰. Der „Kv4.2“-Kalium-Kanal ist ein nur kurzzeitig aktivierbarer Ionenkanal, der in der postsynaptischen Membran von Neuronen lokalisiert ist und deren Aktivitätszustand modifiziert. Nimmt die Aktivität von ERK1/2 cholinerg und glutamaterg vermittelt im Gebiet des Krampfanfalls zu, würde der Kv4.2-Kanal in Abhängigkeit vom neuronalen Erregungszustand verstärkt in den vom Krampf betroffenen Neuronen aktiv sein. ERK1/2 würde somit über einen direkten Mechanismus die Krampfaktivität modulieren. Versuche, die diesen Erklärungsansatz stützen, zeigten eine deutlich niedrigere Krampfschwelle in Tieren mit verminderter Funktionsfähigkeit des Kv4.2-Kanals²⁴. 24 Stunden nach einem Status epilepticus lässt der Anstieg von Kv4.2-mRNA die vermehrte Expression des Kanals im Sinne einer neuroprotektiven Reaktion vermuten⁴⁸.

Wu und Mitarbeiter zeigten an der Neuronenkultur, dass die Stimulation von AMPA-Rezeptoren

über die Aktivierung der PI3K- und der ERK1/2-Kaskade zu einem Anstieg von BDNF-mRNA führt, der Neurone vor glutamaterger Exzitotoxizität schützt¹⁴⁷. BDNF wirkt neuroprotektiv und erhöht die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen in Gegenwart neurotoxischer Stimuli^{14, 111, 128, 147}. Wird der Anstieg der BDNF-Expression im Status epilepticus gehemmt, kommt es zu einer lang anhaltenden Krampfaktivität mit dauerhaften, ausgedehnten Zellschäden auch im unreifen Gehirn der Ratte¹²⁸. Auch über die Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren kommt es zur Stimulation von ERK1/2. Vielfach ist in diesem Zusammenhang die glutamaterge Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB gezeigt worden, der die Expression antiapoptotischer Gene induziert und mit einem stärkeren Überleben neuronaler Zellen assoziiert ist^{74, 86, 110}.

Die cholinerg und glutamaterg vermittelte Aktivierung der PI3K- und der ERK1/2-Kaskade während eines Status epilepticus ist als neuroprotektive Gegenregulation zu interpretieren, die einer apoptotischen Neurodegeneration im Rahmen der exzitotoxischen Reaktion entgegenwirkt. Der protektive Effekt der Kaskaden besteht dabei einerseits in ihrer hemmenden Wirkung auf Caspasen und andere proapoptotische Faktoren^{83, 84}, andererseits in der gesteigerten Expression antiapoptotischer Gene. Ein wichtiger Endpunkt der Signalwege ist der Transkriptionsfaktor CREB, der u.a. die Expression des Neurotrophins BDNF induziert.

4.1.3 Neurodegeneration trotz Aktivierung antiapoptotischer Kaskaden?

Obwohl diese und andere Arbeiten zeigen konnten, dass im Status epilepticus über mehrere Mechanismen eine antiapoptotische Gegenregulation angestoßen wird, fand sich in der hier durchgeführten histologischen und ultrastrukturellen Untersuchung eine im Vergleich zum physiologischen Zustand verstärkte apoptotische Neurodegeneration. In der Versuchsgruppe der Pilocarpin-Tiere wurde die stärkste Konzentration aktivierter Faktoren der PI3K- und ERK1/2-Kaskade 4 Stunden nach der Auslösung des Krampfanfalls gefunden. Danach nimmt die Kinaseaktivität ab und Normalwerte waren ca. 24 Stunden nach der Pilocarpininjektion erreicht. Histologisch wurden apoptotische Zelluntergänge 24 Stunden nach dem Pilocarpin-induzierten Status epilepticus sichtbar. Der hier dokumentierte zeitliche Verlauf in der Regulation antiapoptotischer Kaskaden lässt vermuten, dass die Aktivierung der Kaskaden möglicherweise nicht lange genug anhält, um das unreife Gehirn vor Zelluntergängen zu schützen. *Rossler und Mitarbeiter* zeigten, dass für die antiapoptotische Wirksamkeit von ERK1/2 eine Aktivierung dieser Kinasen über ein gewisses Zeitintervall notwendig ist¹¹¹. Nach den Erkenntnissen der vorliegenden und anderer Arbeiten kommt es aber nur innerhalb eines engen Zeitfensters (3 bis 6 Stunden) zu einer Aktivierung von PI3K- und ERK1/2-Kaskade. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der antiapoptotischen Reaktion interessant. *Biagini et al.*

zeigten einen Anstieg der BDNF-mRNA-Konzentration nach Auslösung eines Status epilepticus durch Pilocarpin, fanden aber parallel dazu einen Abfall der Konzentration an BDNF-Protein, der bis zu 16 Stunden nach Induktion des Krampfanfalls anhielt. Die Autoren vermuten, dass der Verbrauch an BDNF-Protein während des Status stark ansteigt, der BDNF-Pool relativ schnell erschöpft ist, und eine gesteigerte Neusynthese von BDNF notwendig wäre, um die neuroprotektive Wirkung des Proteins aufrecht zu erhalten. Der hohe Bedarf an BDNF übersteigt die während eines Status epilepticus möglicherweise *veränderte Proteinsynthesekapazität* der Zelle, wodurch trotz des Anstiegs an BDNF-mRNA nicht genügend funktionstüchtiges Protein nachgebildet werden kann ¹⁴. Die Abnahme der BDNF-Konzentration könnte sich auch auf die Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden auswirken, da BDNF ein wesentlicher Aktivator der Kaskaden ist. Dies würde eine Erklärung für die nur kurzzeitig gesteigerte Aktivierung von PI3K- und ERK1/2-Kaskade während des Krampfanfalls bieten. Zum anderen würde eine global beeinträchtigte Proteinsyntheseleistung der Zelle während des Status auch die Synthese adäquater Kinasmengen verhindern und die Effektivität der antiapoptotischen Gegenregulation mindern. Somit wäre eine verminderte zelluläre Proteinsynthesekapazität mit unzureichender Expression neurotropher Faktoren und deren abhängiger Kinasen eine mögliche Ursache für den unzureichenden Schutz vor neuronaler Apoptose im Status epilepticus.

Andere Autoren vermuten, dass der über die Aktivierung der Kaskaden vermittelte antiapoptotische Effekt in Abhängigkeit von der *Intensität des Stimulus* Zelluntergänge durch Apoptose nicht ausreichend effektiv verhindern kann. *Schmidt-Kastner und Mitarbeiter* zeigten ebenfalls, dass die Induktion von Krampfanfällen mit hohen Pilocarpin-Dosen zwar zu einem Anstieg an BDNF-mRNA im Gehirn der Ratte führt, ausgedehnte Zellschäden dennoch nicht verhindert werden können ¹¹⁵. Erklärend hierfür mag zum einen die oben geschilderte Annahme einer beeinträchtigten Proteinsynthese-Kapazität sein. Zum anderen könnte während des Status auch der primäre BDNF-mRNA-Anstieg, u.a. stimuliert durch den Transkriptionsfaktor CREB, quantitativ unzureichend sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Aktivierung von CREB über NMDA-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Intensität des exzitatorischen Stimulus unterschiedlich ausfällt ¹¹⁰. Die exzessive, lang anhaltende Erhöhung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt führt dabei neben der Erregung synaptischer NMDA-Rezeptoren überwiegend zur Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren. Beide Rezeptorformen aktivieren den ERK1/2-Signalweg, aber nur bei der Erregung synaptischer NMDA-Rezeptoren kommt es zu einer dauerhaften Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB. Extrasynaptische Rezeptoren aktivieren den Transkriptionsfaktor nur unzureichend,

was eine insuffiziente Expression antiapoptotischer Gene mit einer vermehrten Apoptoseanfälligkeit neuronaler Zellen bedingen könnte. Die Aktivierung antiapoptotischer Kaskaden ist nach diesen Erkenntnissen abhängig von der Intensität der glutamatergen Stimulation, wobei der neuroprotektive Effekt der Kinasen bei exzessiven Glutamatkonzentrationen nicht suffizient umgesetzt wird.

4.2 Wirkung von Diazepam auf das unreife Rattenhirn

4.2.1 Keine apoptotische Neurodegeneration durch Diazepam

Für die Gruppe der Diazepam-Tiere ergab die histologische Untersuchung der Hirnpräparate mittels Kupfer-Silberfärbung keine gesteigerte Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die wenigen markierten Zellen trugen morphologische Merkmale des physiologischen Zelltodes. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Diazepam in Dosierungen von 5mg/kg Körpergewicht gegenüber dem physiologischen Zustand keine verstärkten Zelluntergänge im gesunden Gehirn neugeborener Ratten hervorruft („primär nicht-toxische Dosis“).

4.2.2 Diazepam reduziert die Aktivierung von PI3K- und ERK1/2-Kaskade

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Diazepam die Aktivierung von ERK1/2 und PI3K auf Proteinebene reduziert. Minimalwerte wurden dabei 3 bzw. 4 Stunden nach Applikation des Benzodiazepins gemessen. Die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege korreliert mit einem besseren Schutz vor apoptotischer Neurodegeneration^{16, 63, 111, 147}, umgekehrt besteht bei einer verminderten Aktivierung eine verstärkte Anfälligkeit der Zellen für Apoptose. Im Ergebnis führt Diazepam in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht somit zwar nicht zu einer histologisch nachweisbaren Zunahme neurodegenerativer Veränderungen, beeinflusst aber auf molekularbiologischer Ebene die Regulation von Apoptose. Die Unterregulation antiapoptotischer Kaskaden, die eine verstärkte Anfälligkeit der Zellen für Apoptose bedingen kann, kommt dabei möglicherweise erst unter dem additiven Effekt eines weiteren neurotoxischen Stimulus zum Tragen. Diese Ergebnisse gelten für das nicht vorgeschädigte Gehirn der 7 Tage alten Ratte.

Über welchen Mechanismus Diazepam seinen Einfluss auf die Regulation von Apoptose nimmt, ist weiter unklar. *Bittigau und Mitarbeiter* zeigten, dass Phenytoin, Phenobarbital, Valproat und Diazepam alters- und dosisabhängig apoptotische Zelluntergänge im unreifen Rattenhirn (P0-P14) triggern¹⁶. Der neurotoxische Effekt von Diazepam konnte durch Flumazenil verhindert werden und ließ sich damit eindeutig der Wirkung des Medikaments zuschreiben. Für Phenytoin,

Phenobarbital und Valproat wurde auch der Effekt auf die Expression von Neurotrophinen untersucht und dabei reduzierte Mengen mRNA für BDNF und NT3 gefunden. Auf Proteinebene konnten weiter Konzentrationsminderungen für p-Akt, p-ERK1/2 und p-Raf-1 gezeigt werden ¹⁶. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Erklärung für die Neurotoxizität der Antikonvulsiva in der Unterregulation neurotropher Faktoren und ihrer abhängigen Kinasen besteht und auch Diazepam möglicherweise über diesen Weg die Aktivierung von PI3K- und ERK1/2-Kaskade hemmt.

4.3 Kombinierte Wirkung von Status epilepticus und Antiepileptikum

4.3.1 Diazepam potenziert die Neurotoxizität des Status epilepticus

Die zentrale Problemstellung dieser Arbeit bestand in der Frage nach einem möglichen neurotoxischen Summationseffekt bei der Gabe eines Antikonvulsivums im Anschluss an einen Pilocarpin-induzierten Status epilepticus. Die Kupfer-Silber-Färbung ergab für die Tiere dieser Versuchsgruppe eine massive Zunahme der apoptotischen Neurodegeneration sowohl im Vergleich zu den Kontrolltieren, als auch im Vergleich zu den Tieren, denen im Anschluss an den Status epilepticus kein Diazepam appliziert wurde. Da die Versuchsbedingungen für alle Versuchsgruppen gleich waren und der Unterschied ausschließlich in der zusätzlichen Gabe von Diazepam bestand, ist davon auszugehen, dass die Zunahme degenerierter Zellen auf die Verabreichung des Medikaments zurückzuführen ist.

4.3.2 Diazepam hemmt die antiapoptotische Gegenregulation

In der Gruppe der Pilocarpin/Diazepam-Tiere zeigte sich eine vermehrte Aktivierung der Kinasen Akt und ERK1/2 4 Stunden nach Auslösung des Status epilepticus bzw. 2 Stunden nach der Injektion von Diazepam. Quantitativ erreichte diese Aktivierung nicht das Niveau der Tiere, die nach Induktion des Status kein Diazepam erhielten. Diese Ergebnisse auf Proteinebene repräsentieren die Kombination der Einzeleffekte der Pilocarpin- und Diazepam-Gruppe: durch den Status epilepticus kommt es zur Stimulation antiapoptotischer Signalwege, die in ihrer Ausprägung durch den Einfluss des Diazepams aber geringer ausfällt. Wie im vorhergehenden Abschnitt berichtet, konnte für die isolierte Gabe von Diazepam (5mg/kg Körpergewicht) histologisch keine gesteigerte Neurodegeneration nachgewiesen werden, wohl aber eine Unterregulation von Kinasen mit antiapoptotischem Effekt. Die Ergebnisse für die beiden Versuchsgruppen lassen daher vermuten, dass Diazepam in der hier verwendeten Dosierung solange keinen sichtbaren Effekt auf das sich entwickelnde Gehirn erzielt, wie kein weiterer toxischer Stimulus wirksam ist, auf den das unreife Gehirn mit Apoptose reagieren würde. Wirkt dagegen ein solcher Stimulus in Form eines Status epilepticus auf das Gehirn, wird die

verminderte Aktivierbarkeit antiapoptotischer Signalkaskaden relevant. Da schon ohne den Einfluss von Diazepam die durch den Status induzierte vermehrte Aktivierung von PI3K- und ERK1/2-Kaskade nicht ausreicht, um eine Zunahme der Neurodegeneration vollständig zu verhindern, muss unter der zusätzlichen Wirkung des Diazepams von einer noch weniger effizienten antiapoptotischen Reaktion ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch die histologisch nachgewiesene, deutlich gesteigerte Neurodegeneration in der Versuchsgruppe mit kombinierter Pilocarpin/Diazepam-Gabe gestützt.

Für die These, dass primär nicht-toxische Dosen eines Medikaments unter bestimmten Bedingungen eine apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn auslösen können, sprechen auch Untersuchungen zur antikonvulsiven Kombinationstherapie. Dabei ist gezeigt worden, dass die Kombination verschiedener Antiepileptika unter Anwendung nicht-toxischer Einzeldosen zu apoptotischen Zelluntergängen im Gehirn der 7 Tage alten Ratte führt, weil sich die neurotoxische Schwelle der Medikamente unter kombinierter Anwendung offenbar verändert¹⁶.

4.4 Bedeutung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseregulation

Die Untersuchung der aktivierten Kinasen 3, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn haben die stärkste Regulation der Kaskaden zwischen 3 und 12 Stunden nach der Injektion der Testsubstanzen gezeigt. 24 Stunden nach Versuchsbeginn kehren in fast allen Versuchsgruppen die Proteinmengen in den physiologischen Bereich zurück. Es kann daher angenommen werden, dass der Einfluss des Status epilepticus auf die Apoptoseregulation auf den kurzen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach dem Ereignis beschränkt ist. Arbeiten zum Einfluss der ERK1/2-Aktivierung auf die Langzeitfolgen von Krampfanfällen haben gezeigt, dass die Aktivierung der Kaskade weder einen Effekt auf die Aussprossung von Moosfasern, noch auf die Entstehung eines chronischen Anfallsleidens hat¹⁰. Tiere, bei denen ERK1/2 experimentell gehemmt wurde, zeigen diese Langzeitfolgen ebenso wie Tiere, bei denen die Kinase aktiv war. Dagegen wurde nachgewiesen, dass es durch eine Hemmung von ERK1/2 während des Status epilepticus zu sehr schweren Krämpfen mit hoher Mortalität kommt¹⁰. Die Bedeutung der Aktivierung von ERK1/2 und PI3K scheint daher eher in der Modulation und Begrenzung des Krampfgeschehens sowie der Modifizierung proapoptotischer Signale während und unmittelbar nach dem Status epilepticus zu liegen, als in der Beeinflussung von Langzeitveränderungen.

4.5 Übertragbarkeit der Ergebnisse

4.5.1 Akut- und Langzeitschäden

Obwohl 24 Stunden nach einem Status epilepticus neurodegenerative Veränderungen im Gehirn unreifer Ratten nachweisbar sind, ist immer wieder berichtet worden, dass zu späteren Zeitpunkten keine dauerhafte Hirnschädigung im Sinne eines signifikanten Neuronenverlustes nachweisbar ist ^{65, 66, 88, 131}. Trotz einer hohen Empfindlichkeit für die Initiation von Krampfanfällen scheint das unreife Gehirn im Gegensatz zum Gehirn erwachsener Tiere relativ unempfindlich gegenüber neuronalen Zelluntergängen zu sein. Als dauerhafte Schäden durch einen Status epilepticus werden heute die Umstrukturierung neuronaler Netze und eine veränderte Funktion der durch den Krampfanfall geschädigten Neurone angesehen. Zu den fassbaren Veränderungen infolge eines Status epilepticus oder rezidivierender Krampfanfälle zählen im Tiermodell die Aussprossung von Moosfasern und die Entwicklung eines chronischen Anfallsleidens ^{6, 7, 82, 91}. Die Transmitterthese zur Entstehung einer Epilepsie beim Menschen geht von einem Ungleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Transmitter im Gehirn von Epilepsiepatienten aus ^{91, 108}. Tierexperimentell lassen sich Erklärungsansätze für die Entstehung dieses Ungleichgewichtes finden. Die Moosfasersprossung stellt eine Zunahme exzitatorischer Verbindungen zwischen der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und dem Hippocampus dar und ist gleichbedeutend mit einer Zunahme glutamaterger Projektionen infolge des Status epilepticus. Desweiteren beschreiben einige Autoren den Untergang von Neuronenpopulationen im mediodorsalen Thalamuskern ⁸⁰. Bei diesen Neuronen handelt es sich um glutamaterg stimulierte Interneurone, die selbst GABAerge Projektionen bilden und die ihnen nachgeschalteten Neurone inhibieren. Der Verlust dieser Neurone durch die exzitotoxische Wirkung des Krampfanfalls bewirkt den Verlust inhibitorischer Einflüsse mit modulierender Wirkung auf die neuronale Aktivität und trägt zur Senkung der Krampfschwelle bei. Die Abnahme GABAerger Projektionen (Verlust inhibitorischer Interneurone) bei gleichzeitiger Zunahme glutamaterger Verbindungen (Moosfasersprossung) führt zum einen zu einer gesteigerten Suszeptibilität des Gehirns für konvulsive Reize, zum anderen zu einer erleichterten Ausbreitung der Erregung im epileptischen Anfall.

Im Tiermodell rufen diese strukturellen Veränderungen die Entstehung einer Epilepsie, eine Beeinträchtigung des Hirnwachstums und der motorischen Entwicklung sowie Störungen des Verhaltens und der Gedächtnisfunktion hervor, wobei das Ausmaß der Veränderungen mit der Schwere der Krampfanfälle korreliert ^{10, 66, 80, 81, 112, 125, 145}.

Deutliche Unterschiede bezüglich der Hirnschädigung im Status epilepticus zeigen sich bei

Versuchen mit erwachsenen Tieren. In beiden Altersgruppen zeigen ähnliche Neuronenpopulationen eine vergleichbare Vulnerabilität für limbische Krampfanfälle. Im Gegensatz zu den genannten Veränderungen des unreifen Gehirns sind jedoch im entwickelten Gehirn eindeutig dauerhafte Zellverluste nachweisbar ^{125, 131}.

Inwieweit fördern die Untersuchungen am Tiermodell das Verständnis für epileptische Anfälle beim Menschen? Die Ergebnisse der Tierversuche zu den Langzeitveränderungen epileptischer Anfälle bestätigen eine Reihe von klinischen Beobachtungen an Epilepsiepatienten und sprechen für eine gewisse Gültigkeit dieser Ergebnisse bezüglich Ätiologie und Pathogenese von Anfallsleiden beim Menschen. Das Schädigungspotential eines einzelnen Krampfanfalls scheint beim Menschen zumindest in Hinblick auf langfristige Folgen relativ gering zu sein ^{4, 77, 82, 118, 143}. Die intellektuellen Fähigkeiten von Kindern mit Epilepsie oder Patienten, die während ihrer Kindheit einzelne Krampfanfälle erlitten haben, unterscheiden sich häufig nicht von denen gesunder Kontrollpersonen ⁴⁰. Therapieresistente oder schlecht beherrschbare Epilepsien mit häufigen Anfällen bedingen jedoch schlechtere kognitive Fähigkeiten ^{38, 40, 102, 139}. Präparate operativ behandelter Epilepsiepatienten haben die verstärkte Moosfaseraussprossung infolge epileptischer Anfälle auch beim Menschen bestätigt, wobei die morphologischen Veränderungen überwiegend in Hippocampus und Amygdala lokalisiert sind ⁸⁸.

4.5.2 Krampfinduktion

Das Pilocarpin-Modell ist ein in der Erforschung von Krampfanfällen sehr häufig verwendetes Tiermodell, da es die Untersuchung der klinischen, morphologischen und physiologischen Grundlagen sowohl des epileptischen Einzelanfalls und Status epilepticus, als auch der Entstehung eines chronischen Anfallsleidens ermöglicht. Die Auslösung von Krampfanfällen erfolgt dabei durch die Injektion des Cholinergikums Pilocarpin und es stellt sich die Frage, ob cholinerge Mechanismen auch für die Krampfinduktion beim Menschen relevant sind.

Für die Beteiligung von Acetylcholin an der Entstehung epileptischer Anfälle beim Menschen gibt es einige Argumente. Zum einen kommt Acetylcholin im menschlichen Gehirn vor und ist wie Glutamat als exzitatorischer Transmitter an der postsynaptischen Neuronenmembran wirksam ⁴⁷. M₁-Muskarin-Rezeptoren, die im Tiermodell die konvulsive Wirkung des Pilocarpins vermitteln, sind auch im menschlichen Gehirn in Hirnregionen lokalisiert, die am stärksten mit der Entstehung von Krampfanfällen assoziiert sind ^{10, 21, 58, 134}. Die Entwicklung eines Status epilepticus im Tiermodell geht mit einer vermehrten Freisetzung von Acetylcholin in Kortex und Hippocampus einher und spricht für seine Beteiligung an der epileptischen Aktivität ⁷¹. Im Liquor von Patienten mit häufigen epileptischen Anfällen konnten erhöhte Acetylcholin-

Konzentrationen nachgewiesen werden¹³², wobei höhere Konzentrationen acetylcholinmetabolisierender Enzyme für einen veränderten Metabolismus des Transmitters im Gehirn von Epilepsiepatienten sprechen^{76, 107}. Diese Daten legen nahe, dass Acetylcholin bei der Entstehung epileptischer Anfälle auch beim Menschen involviert ist. Pathophysiologisch wird seine Bedeutung dabei vor allem in der Initiation der Krampfaktivität gesehen, da Antagonisten des Acetylcholins die Entstehung von Krampfanfällen verhindern können^{97, 133}. Ein etablierter epileptischer Anfall lässt sich dagegen nicht durch Anticholinergika beenden¹³³, weshalb dem Transmitter offenbar keine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Krampfaktivität zukommt. Acetylcholin verstärkt NMDA-Rezeptor-vermittelte Ionenströme und seine Funktion während des Anfalls scheint in der Wirkungsverstärkung von Glutamat zu liegen, das für die Dauerdepolarisation von Neuronen im epileptischen Anfall verantwortlich ist^{10, 21, 22}. Im Gegensatz zu Glutamat konnte für Acetylcholin kein neurotoxisches Eigenpotential nachgewiesen werden^{98, 124, 133}. Die im Pilocarpin-Modell beobachteten Hirnveränderungen können daher nicht auf die Wirkung des Pilocarpins zurückgeführt werden, sondern sind als Folge des Status epilepticus zu betrachten. Das Schädigungsmuster Pilocarpin-induzierter Krampfanfälle ähnelt dem der menschlichen Temporallappenepilepsie und betrifft überwiegend Hippocampus mit Gyrus dentatus und Amygdala.

Das Pilocarpin-Modell stellt einige pathophysiologische Mechanismen nach, die auch für epileptische Anfälle beim Menschen eine Rolle spielen. Die mit Hilfe des Modells gewonnenen Erkenntnisse zu den Grundlagen der Entstehung und Wirkung von Krampfanfällen im unreifen Gehirn sollten daher zumindest Hinweise für die Verhältnisse beim Menschen liefern.

4.6 Schlussfolgerungen

Im Ergebnis konnte diese Arbeit zeigen, dass im Gehirn der 7 Tage alten Ratte 24 Stunden nach Induktion eines Status epilepticus mit Pilocarpin apoptotische und exzitotoxische Zelluntergänge nachweisbar sind. Die Neurodegeneration wird verstärkt, wenn im Anschluss an den Status Diazepam (5mg/kg Körpergewicht) verabreicht wird, wobei Diazepam allein keine gesteigerte Neurodegeneration provoziert. Auf Proteinebene konnte 4 Stunden nach der Verabreichung von Pilocarpin eine verstärkte Aktivierung antiapoptotischer Kinasen festgestellt werden, während Diazepam zu einer Unterregulation dieser Kinasen führte. In der Kombination beider Substanzen zeigte sich, dass Diazepam den Status epilepticus-induzierten Kinaseanstieg mindert und somit die Regulation antiapoptotischer Kaskaden während des Status ungünstig beeinflusst. Diese Ergebnisse gelten für die Phase des rapiden Hirnwachstums, die beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft beginnt und bis ins 3. Lebensjahr reicht. Obwohl gezeigt werden

konnte, dass im akuten Stadium des Status epilepticus Regulationsprozesse zum Schutz von Neuronen aktiviert und diese unter dem Einfluss von Diazepam gehemmt werden, erlaubt die vorliegende Arbeit keine Schlussfolgerungen zu den Langzeitfolgen dieser Unterregulation. Inwieweit die einmalige bzw. gelegentliche Anwendung von Diazepam im oder im Anschluss an einen epileptischen Einzelanfall zu klinisch relevanten Einschränkungen der individuellen Entwicklung führt, bleibt somit offen. Das neurotoxische Eigenpotential der Antikonvulsiva und ihre negative Wirkung auf die Entwicklung kognitiver und sozialer Fähigkeiten in der Langzeittherapie der Epilepsie bei Kindern sind aber hinreichend bekannt. Während es zur Anwendung von Antikonvulsiva im Status epilepticus oder als Dauermedikation bei einer manifesten Epilepsie im Kindesalter keine Alternative gibt, sollte die Anwendung bei kurz dauernden Einzelanfällen gut abgewogen werden. Die prophylaktische Anwendung von Antiepileptika nach Einzelanfällen, wie z.B. Fieberkrämpfen, vermindert weder das Rezidivrisiko noch das Risiko eines chronischen Anfallsleidens^{3, 5, 19, 77, 90, 94, 103, 109, 118, 129}. Bei der Verwendung der Benzodiazepine, die bei sehr guter antikonvulsiver Wirksamkeit ein vergleichsweise günstiges Nebenwirkungsprofil zeigen, sollten die sich vom reifen Gehirn unterscheidenden Verhältnisse beim Neugeborenen und Kleinkind beachtet werden. Die potentiell neurotoxische Wirkung der Benzodiazepine besteht in einer modifizierten Transmitteraktivität, die im Gegensatz zu späteren Lebensphasen während der Zeit des rapiden Hirnwachstums proapoptotisch wirkt. Für diesen Effekt ist eine Dosisabhängigkeit gezeigt worden, unter Beachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss allerdings davon ausgegangen werden, dass der neurotoxische Schwellenwert in Abhängigkeit vom gleichzeitigen Auftreten weiterer potentiell neurotoxischer Einflüssen variiert. Die Definition einer für das unreife Gehirn toxischen Dosis ist somit nicht möglich und dem schädlichen Effekt durch eine bloße Dosisanpassung nicht zu begegnen. Die Anwendung der Antikonvulsiva bei Kindern bis zum 3. Lebensjahr sollte daher stets unter kritischer Risiko-Nutzen-Abwägung und nur bei medizinisch bestehender Indikation erfolgen. Diese Indikation umfasst den drohenden oder manifesten Status epilepticus sowie die nur medikamentös beherrschbare Epilepsie. In allen anderen Situationen, in denen die Verabreichung von Antikonvulsiva eher dem Sicherheitsbedürfnis der Eltern und des Arztes als der medizinischen Notwendigkeit zur Intervention entspricht, sollte von der Anwendung der Medikamente abgesehen werden. Besteht eine medizinische Indikation zur antikonvulsiven Therapie, sollten gängige Therapieprinzipien (Monotherapie, niedrigste wirksame Dosis) Beachtung finden. Desweiteren sollten Hinweise auf potentiell neuroprotektiv wirkende Substanzen weiter verfolgt und gegebenenfalls in der antiepileptischen Therapie zur Anwendung gebracht werden. So konnte (zunächst experimentell)

gezeigt werden, dass die Injektion von β -Estradiol die apoptotische Neurodegeneration nach Phenobarbital oder Diazepam reduzieren kann ¹⁶.

Die Anwendung von Diazepam während der Schwangerschaft, etwa als Tokolytikum bei vorzeitiger Wehentätigkeit, ist mit Blick auf seine potentielle Neurotoxizität insbesondere deshalb kritisch zu betrachten, weil die Tokolysetherapie häufig im dritten Trimenon notwendig wird und daher mit der Zeit des rapiden Hirnwachstums zusammenfällt.

Neben der Empfehlung eines risikobewussten Umgangs mit Antikonvulsiva ist generell die Entwicklung neuer Antiepileptika wünschenswert, die bezüglich ihrer Wirkung auf das unreife Gehirn ein günstigeres Wirkprofil zeigen.