

1. Einleitung

Die Fortschritte in den medizinischen Wissenschaften haben in den letzten Jahrzehnten zu einer erheblichen Verbesserung der Überlebenschancen Frühgeborener und Säuglinge geführt. Während aber zum Beispiel pulmonale oder gastrointestinale Probleme in diesem Lebensalter zunehmend besser behandelt werden können, so ist die Therapie neurologischer Erkrankungen noch oft unbefriedigend. Der Schutz des unreifen Gehirns vor Folgeschäden einer Erkrankung oder auch den Behandlungsfolgen selbst kann nur mit einem umfangreichen Wissen der pathophysiologischen Besonderheiten des heranwachsenden Gehirns erfolgen, von denen in dieser Arbeit einige spezielle näher beschrieben werden.

1.1. Ursachen einer perinatalen Hirnschädigung

Häufigste Ursachen einer Schädigung des unreifen Gehirns sind ein perinataler Sauerstoffmangel, Hirnblutung, Infektionen, metabolische Störungen, Trauma, Intoxikationen und Fehlbildungen. Im Folgenden werden drei wichtige Schädigungsursachen näher untersucht, sie sind Thema der experimentellen Arbeiten.

1.1.1. Trauma

In den USA erleiden jährlich 1,5 Millionen Menschen ein Hirntrauma und von diesen tragen rund 85.000 oder 6% dauerhafte Schäden davon (Thurman et al., 1999).

Damit stellen Hirntraumen eine der führenden Ursachen der Morbidität und Mortalität der Bevölkerung dar. Am häufigsten betroffen sind Kinder im Alter von bis zu 6 Jahren (Diamond, 1996; Adelson und Kochanek, 1998). Innerhalb der

pädiatrischen Population differieren Ursachen, Häufigkeit, Alter der Kinder und neurologischer Ausgang nach einem Hirntrauma. Während bei Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen Blutungen, ischämische Insulte und Kindesmisshandlung zu einem Hirntrauma führen, stehen bei älteren Kindern Unfälle im Straßenverkehr und Stürze im Vordergrund (Volpe, 2001; Deputy, 2003; Hawley et al., 2003; Keenan et al., 2003). Die Prognose der Kinder unter 4 Lebensjahren ist insgesamt schlechter als die der Schulkinder und Erwachsenen (Koskiniemi et al., 1995; Thakker et al., 1997; Noppens und Brambrick, 2004). So leiden jüngere Kinder mit einem Hirntrauma infolge Kindesmisshandlung häufiger unter Residualschäden wie Krampfleiden (45%) oder mentalen Defiziten (5%) als ältere Kinder mit einem Hirntrauma infolge eines Unfalls (Ewing-Cobbs et al., 1998). Nach einem Hirntrauma ist die Prognose eines betroffenen Säuglings schlechter als die des Schulkindes. Die Pathophysiologie des Traumas im unreifen Hirn unterscheidet sich also von der des reifen Hirns.

In den Gehirnen verstorbener misshandelter Kinder werden überwiegend neuronale Schäden und weniger axonale Schäden beobachtet, die nur bei multiplen Schädelfrakturen oder im Bereich des kraniocervicalen Überganges auftreten (Geddes et al., 1999; 2001a; 2001b). Hingegen stehen bei erwachsenen Unfallopfern diffuse axonale Schäden im Gehirn ganz im Vordergrund (Niess et al., 2002; Pittella und Gusmao, 2003). Die Unterschiede in der Neuropathologie traumatisierter Patienten sind nur zum Teil durch die noch unvollständige Myelinisierung des kindlichen Gehirns erklärbar, da auch bei Kindern bis zu 8 Jahren, bei denen die Myelinisierung abgeschlossen ist, diffuse axonale Schäden selten zu beobachten waren (Geddes et al., 2001b). Zur Charakterisierung der Besonderheiten eines Hirntraumas im sich entwickelnden Gehirn ist die Etablierung eines Tiermodells notwendig.

1.1.2. Antiepileptika

Seit den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts ist bekannt, dass von den Müttern während der Schwangerschaft eingenommene Antiepileptika nicht nur zu Malformationen des Neuralrohrs, des Mittelgesichts, der Finger und des Gaumens führen können, sondern auch zu schweren Entwicklungsstörungen des ZNS, die nicht selten schon im Neugeborenenalter der Betroffenen durch eine konsekutive Mikrozephalie offensichtlich sind (Jones et al., 1989; Holmes et al., 2001; Dean et al., 2002; Kaaja et al., 2003). In unserer Bevölkerung haben große Fehlbildungen eine Prävalenz von 0,8% der Lebendgeburten ohne und rund 3,5% mit intrauteriner Antikonvulsiva-Exposition (Jick und Terris, 1997; Kaaja et al., 2003). 5% aller Kinder mit einer pränatalen Valproat-Exposition, 1% aller Neugeborenen nach Carbamazepin-Exposition und 0,1% aller Neugeborenen ohne Antikonvulsiva-Exposition leiden unter einer Spina bifida (Omtzigt et al., 1992; Ray et al., 2002;).

Eine wesentliche Ursache der Neuralrohrdefekte nach Antikonvulsiva-Exposition ist ein Folsäuremangel, der durch eine mangelnde intestinale Aufnahme oder einen beschleunigten Abbau erklärt werden kann (Ono et al., 1997; Karabiber et al., 2003). Andere Malformationen, die speziell nach Phenytoin-Exposition als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Medikamenten beobachtet wurden, sind die knöchernen Fehlbildungen des Mittelgesichtes und der distalen Phalangen, die auf eine Vitamin-K-Defizienz zurückgeführt werden können (Kelly et al., 1984; Howe et al., 1995; Orup und Holmes, 1997; Pennell, 2002). Die Kombinationstherapie mit verschiedenen Antiepileptika stellt einen zusätzlichen Risikofaktor für die Entstehung von Fehlbildungen dar (Dessens et al., 2000; Dean et al., 2002).

Die pränatale Antikonvulsiva-Exposition führt auch zu mentalen Defiziten. So liegt der Intelligenzquotient bei Menschen, die pränatal Antikonvulsiva ausgesetzt waren, in entsprechenden Leistungstests um 7 bis 11 Punkte unter dem der

entsprechenden Vergleichsgruppen (VanOverloop et al., 1992; Reinisch et al., 1995; Thorp et al., 1999; Dean et al., 2002). Im Säuglings- und frühen Kindesalter therapeutisch verabreichte Barbiturate beeinflussen ebenfalls die mentale Entwicklung negativ (Farwell et al., 1990; Reinisch et al., 1995; Sulzbacher et al., 1999). Eine Fieberkrampfprophylaxe mit Phenobarbital, die den Patienten zwischen dem 8. und 36. Lebensmonat verabreicht wurde, führte sechs Monate nach Beendigung der Medikation zu einem messbaren Abfall des Intelligenzquotienten, der bei den Patienten 5,2 Punkte niedriger ausfiel als in der Placebo-Kontrollgruppe (Farwell et al., 1990). Ein Teil der Kinder konnte rund vier Jahre später erneut untersucht werden und wies nach dieser langen Behandlungspause gehäuft Störungen im verbalen Bereich auf, die behandelten Kinder hatten weiterhin ein 3,7 IQ-Punkte-Defizit, das jedoch nicht mehr signifikant war (Sulzbacher et al., 1999). Während einige der teratogenen Wirkungen der Antiepileptika aufgeklärt sind (Orup und Holmes, 1997; Karabiber et al., 2003), herrscht über die Ursachen der mentalen Retardierung und der Verhaltensstörungen nach prä- und postnataler Antiepileptika-Exposition noch weitgehende Unklarheit.

1.1.3. Äthanol und andere Suchtmittel

Der Missbrauch von Drogen wie Alkohol, Marihuana, Kokain aber auch seltener gebrauchter Drogen wie „special K“ (Ketamin) oder „Angel dust“ (Phencyclidin) in der Schwangerschaft stellt eine ernste Gefährdung des Feten dar. Alkohol zählt zu den am meisten missbrauchten Drogen während der Schwangerschaft (Abel und Sokol, 1987). Auf Befragen gaben in einer Studie von Burd und Mitarbeitern 4% der Frauen an, in der Schwangerschaft Alkohol getrunken zu haben; in einer anderen Studie liegt der Anteil der Alkohol-konsumierenden Schwangeren sogar bei 14,6 %, wobei 2,1% der befragten Frauen Alkohol häufig tranken. (Ebrahim et al., 1998;

Burd et al., 2003). Die transplazentare Äthanol-Exposition des Fetus kann zu schweren morphologischen und neuropathologischen Veränderungen des zentralen Nervensystems führen. Diese sind kraniofaziale Malformationen, reduziertes Hirngewicht und neuropsychologische Störungen, die von Hyperaktivität und Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom sowie Lernstörungen in der Kindheit bis zu depressiven und psychotischen Erkrankungen des Erwachsenenalters reichen (Jones und Smith, 1973; Famy et al., 1998; Streissguth und O'Malley, 2000; Sokol et al., 2003). Die ausgeprägte, schwere Form mit kraniofazialen Fehlbildungen und neuropsychologischen Störungen wird als Fetales Alkoholsyndrom (FAS) bezeichnet. Die fetotoxischen Effekte des Alkohols können sich aber auch ohne kraniofaziale Fehlbildungen mit neuropsychologischen Störungen allein manifestieren, die dann als Fetale Alkohol-Effekte (FAE) oder Alkohol-abhängige Entwicklungsstörungen (Alcohol Related Neurodevelopmental Disorder, ARND) bezeichnet werden (Sampson et al., 1997). Die Angaben über die Häufigkeit differieren stark und reichen von mit ca. 1,4 bis 1,9 pro 1000 Lebendgeburten für das FAS bis zu 9,1 pro 1000 Lebendgeburten für die Fetalen Alkohol-Effekte oder ARND (Abel und Sokol, 1987; Sampson et al., 1997).

„Angel dust“, „Special K“ oder Marihuana führen zu fetalen Entwicklungsstörungen, die noch bei Jugendlichen nachweisbar waren (Wachsman et al., 1989; Deutsch et al., 1998; Fried et al., 2003;). Zwischen 1996 und 1998 konsumierten in den USA 2,8% der schwangeren Frauen Marihuana, von denen 54% auch gleichzeitig Alkohol einnahmen (Ebrahim und Gfroerer, 2003).

Die Ursachen der zentralnervösen Fehlbildungen nach pränataler Alkohol- oder Drogen-Exposition sind bislang nur unvollständig aufgeklärt. In entsprechenden Tierexperimenten führte die pränatale Applikation von Äthanol zu einem reduzierten Dendriten- und Neuronenwachstum und Hirngewicht (Mooney und Miller, 2001; Granato und Van Pelt, 2003). Pränatal Äthanol-exponierte Kinder weisen verschiedene Fehlbildungen im Bereich des Zentralnervensystems auf, von denen

eine Hypoplasie des Vermis, der Kleinhirnhemisphären, des Hippocampus und/oder des Corpus callosum die häufigsten waren (Mattson et al., 2001; Autti-Ramo et al., 2002). Es wird vermutet, dass die Ausprägung der morphologischen Veränderungen mit dem Ausmaß der intellektuellen Schädigung korreliert (Clark et al., 2000a). Die Pathomechanismen der morphologischen Veränderungen und der intellektuellen Störungen betroffener Kinder und Erwachsener nach perinataler Drogenexposition sind jedoch weitgehend unklar. Für die Aufklärung dieser Ursachen und Vorgänge sind ebenfalls Untersuchungen an einem geeigneten Tiermodell notwendig.

1.2. Modelle zur Untersuchung der Pathomechanismen nach perinataler und frühkindlicher Hirnschädigung

1.2.1. Die Phase des raschen Hirnwachstums beim Menschen und in anderen Spezies

Das Säugerhirn durchläuft in seiner Entwicklung eine Phase sehr raschen Wachstums, die „brain growth spurt period“. Diese setzt bei den verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Lebenszeiten ein (Dobbing, 1974, Dobbing und Sands, 1979). Beim Menschen beginnt sie im sechsten Schwangerschaftsmonat und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres (Dobbing und Sands, 1974). Die Hirnwachstumsgeschwindigkeit verläuft glockenförmig und ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten. Bei der Ratte erreicht diese Phase ihr Maximum postnatal am 6. Lebenstag, hält bis zum 10. Lebenstag an und endet mit etwa 21 Lebenstagen. Die neonatale Ratte eignet sich daher gut als Modell zur Untersuchung von Vorgängen, die während einer vergleichbaren ontogenetischen Phase beim Menschen prä- und postnatal stattfinden. Während der Phase des rapiden Hirnwachstums finden so wichtige Vorgänge wie die Migration und Differenzierung

von Nervenzellen, die Synaptogenese aber auch der physiologische (programmierte) Zelltod statt. Alle Prozesse der Neuro- und Synaptogenese sind genetisch determiniert. Man geht davon aus, dass an der Neurogenese der ca. 10^{11} Neurone und der mehr als 10^{12} Synapsen des Menschen etwa 30.000 Gene beteiligt sind (Lagercrantz und Ringstedt, 2001).

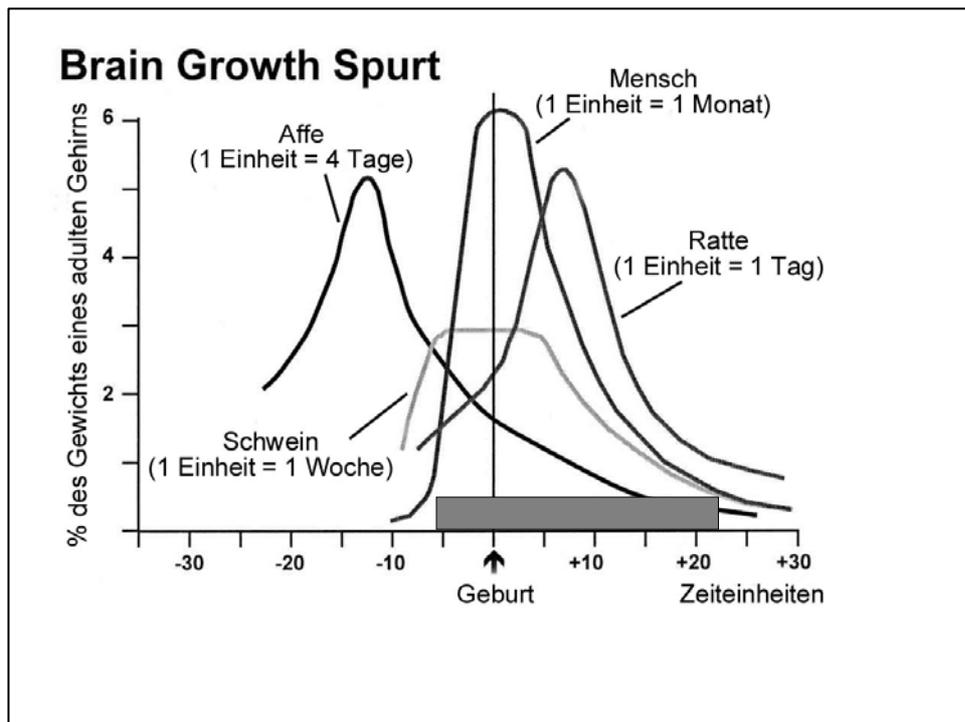


Abbildung 1: Brain growth spurt (modifiziert nach Dobbing und Sands, 1974)

Während der Hirnwachstumsphase ist das Gehirn besonders vulnerabel. Bereits 1974 wies Dobbing nach, dass das Gehirn während des raschen Wachstums empfindlich auf Noxen wie Mangelernährung reagiert (Dobbing, 1974).

1.2.2. Neurotransmittersysteme während der Entwicklung

Antiepileptika (1.1.2.) und Suchtmittel (1.1.3.) entfalten ihre Wirkung über die Beeinflussung des Aktivitätszustandes der Neurone, der seinerseits über Neurotransmittersysteme oder Ionenkanäle gesteuert wird. Die Antiepileptika Phenobarbital, Diazepam und Clonazepam sowie Äthanol sind Agonisten am GABA_A-Rezeptor, indirekt wirken auch die Medikamente Vigabatrin und Valproat agonistisch am GABA_A-Rezeptor, indem sie den Abbau der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) hemmen. Darüber hinaus wirken Äthanol und Valproat hemmend auf den NMDA-Rezeptor, Äthanol direkt als Antagonist und Valproat indirekt über die Hemmung der Freisetzung des natürlichen Agonisten Glutamat (Valproat). Auch die Drogen „Special K“ (Ketamin) und Phencyclidine („angel dust“) sind NMDA-Antagonisten. Neben der Modifikation der Neurotransmittersysteme können Antiepileptika auch auf spannungsabhängige Ionenkanäle Einfluss nehmen. Typische Vertreter sind Phenytoin, Carbamazepin und Lamotrigin, die spannungsabhängige Natriumkanäle blockieren. Exemplarisch sollen hier kurz die exzitatorischen Glutamatrezeptoren und die inhibitorischen GABA-Rezeptoren beschrieben werden.

Exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat sind wichtige Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) der Säuger. Sie werden von 40 % der präsynaptischen Endigungen freigesetzt, vermitteln über die Aktivierung von Rezeptoren höhere kognitive Funktionen, Gedächtnisformierung, Motorik und Sensibilität und beeinflussen die Plastizität neuronaler Synapsen.

Die exzitatorische Wirkung des Glutamats und anderer exzitatorischer Aminosäuren werden über die Aktivierung ionotroper oder metabotroper Rezeptoren vermittelt.

Ionotrope Rezeptoren sind an Ionenkanäle gekoppelt und lassen sich in N-Methyl-D-aspartat-(NMDA) und die non-NMDA-Rezeptoren α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure- (AMPA-) und Kainat-Rezeptoren einteilen. Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluRI-III leiten ihr Signal mit Hilfe von G-

Proteinen ins Zellinnere weiter.

Der NMDA-Rezeptor, der an einen Kalziumkanal gekoppelt ist, hat eine pentamere Struktur. Der Zeitverlauf des NMDA-Rezeptor-vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Stromflusses (EPSCs; excitatory postsynaptic currents) und die Affinität des Rezeptors für Glutamat hängen von der Zusammensetzung des NMDA-Rezeptors aus den NR1- und NR2-Untereinheiten ab, sie bestimmen die physikalischen Eigenschaften des Ionenkanals (McBain und Mayer, 1994; Cull-Candy et al., 2001). Wichtige Antagonisten am NMDA-Rezeptor sind MK801 (Dizocilpin), Phencyclidin, Ketamin und Äthanol.

AMPA-Rezeptoren sind an Ionenkanäle gekoppelt, die eine schnelle Öffnungskinetik aufweisen und permeabel für Natrium- und Kaliumionen sind. Der AMPA-Rezeptor ist aus vier Untereinheiten GluR1-GluR4 zusammengesetzt, deren Anteile regional und altersabhängig variieren (Franciosi, 2001).

Kainat-Rezeptoren, die dritte Gruppe der Glutamat-Rezeptoren, sind prä- und postsynaptisch lokalisiert und in die Regulation präsynaptischer Transmitterfreisetzung und Plastizitätsvorgänge involviert (Huettner, 2003; Lerma, 2003).

Die Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des Säugergehirns. Sie ist an mehr als 40% der inhibitorischen Synapsen des Zentralnervensystems nachweisbar. GABA reguliert über seine Rezeptoren GABA_A, B und C physiologische Prozesse wie die neuronale Erregung, den Schlaf, die Aufmerksamkeit, Angst, Emotionen, Schmerz, Sucht und Muskelspannung.

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Ionenkanal-Rezeptor, der an einen Chloridkanal gekoppelt ist. Er ist ein transmembranöses pentameres Protein, dessen Untereinheiten-Kombinationen regional und im Laufe der Entwicklung im Hirn differieren (Rabow et al., 1995; Mehta und Ticku, 1999).

Je nach Art und Zusammensetzung der Untereinheiten sind auch die

pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors verschieden. Agonisten am GABA_A-Rezeptor sind Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide, Ethanol, verschiedene Anästhetika und Antiepileptika sowie Muscimol. Wichtige Antagonisten sind Bicucullin und Flumazenil. Die Bindung eines Agonisten an den GABA_A-Rezeptor führt zur Öffnung des Chloridkanals, zum Einstrom von Chlorid-Ionen und zur Hyperpolarisation der Zelle. Unterschiedliche Agonisten können verschiedene Öffnungskinetiken bedingen. So führt die Bindung von Diazepam zu einer Erhöhung der Öffnungsfrequenz, die Bindung des Phenobarbitals hingegen zu einer Verlängerung der Öffnungsdauer des Chloridkanals (Twyman et al., 1989).

Im unreifen Gehirn wird dem GABA_A-Rezeptor auch eine gemischt inhibitorische und exzitatorische Funktion zugeschrieben. Gezeigt wurde diese aktivierende Wirkung vorwiegend an Hippocampus-Schnitten, aber auch für das visuelle und auditive System (Weliky und Katz, 1999; Lu und Trussel, 2001; Khazipov et al., 2004). Eine mögliche Ursache für die exzitatorische Wirkung des GABA_A-Rezeptors ist die späte Expression eines Chlorid-Transporters, der eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Chlorid bedingt. (Ben-Ari, 2002). Die Arbeitsgruppe um Ben-Ari konnte eine depolarisierende Wirkung durch Aktivierung des GABA_A-Rezeptors im Hippocampus in den ersten 2 Lebenswochen nachweisen (Ben-Ari et al.; 1997; Leinekugel et al., 2002).

Der GABA_B-Rezeptor gehört zur Familie der GTP-Bindungs-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist mit präsynaptischen Kalzium- und postsynaptischen Kalium-Kanälen verbunden (Kaupmann et al., 1998; Couve et al., 2000). Agonisten am GABA_B-Rezeptor, wie zum Beispiel Baclofen, führen zur Aktivierung der Second-Messenger-Systeme Phospholipase C und Adenylatzyklase (Bowery, 1993; Chebib und Johnston, 1999).

Erst seit einigen Jahren ist die Existenz des GABA_C-Rezeptors, eines Ionenkanal-Rezeptors, bekannt (Enz und Cutting, 1999).

1.2.3. Traumamodelle

Zum Studium der Folgen eines Hirntraumas an Säugetieren haben sich drei Methoden einer Verletzung unter kontrollierten Bedingungen durchgesetzt: die durch Flüssigkeits-Druckerhöhung (fluid percussion model; McIntosh et al., 1989) oder Druckpistole (controlled cortical impact model; Dixon et al., 1991) und die durch ein fallendes Gewicht (weight drop model; Allen, 1911; Feeney et al., 1981), die auch zur Auslösung von Verletzungen des Rückenmarks verwendet wird.

Alle Modelle eignen sich zum Studium an erwachsenen Nagetieren, oder, im Falle des Flüssigkeits-Druckerhöhungs-Modell, auch an Schweinen und Katzen. Im juvenilen Gehirn wurde von den Arbeitsgruppen Prins und Hovda sowie Adelson das Flüssigkeits-Druckerhöhungs-Modell und ein Modell des geschlossenen Hirntraumas an die Altersgruppe der 17-Tage alten Ratten adaptiert (Marmarou et al., 1994; Prins et al., 1996; Adelson et al., 1996; 1997; Prins und Hovda, 2003).

Zum Studium eines Hirntraumas während der Phase des raschen Hirnwachstums wurde in unserer Arbeitsgruppe das Hirntrauma-Modell eines fallenden Gewichtes nach Feeney et al., (1981) modifiziert und etabliert. Nach Fixierung der narkotisierten Tiere in einem stereotaktischen Apparat und Öffnen der Kopfhaut wird ein perforierter Metallzylinder mit einem beweglichen Stempel am unteren Ende auf der rechten Parietalschuppe platziert. Ein aus definierter Höhe fallendes 20g-Gewicht führt zur Bewegung des Stempels in Richtung Gehirn um 1,5 mm und so zu einem moderaten mechanischen Hirntrauma auf dem rechten parietalen Kortex.

1.3. Der Aktive Zelltod

1.3.1. Der programmierte Zelltod während der Hirnentwicklung

Der Begriff Apoptose beschreibt ursprünglich zum Beispiel das Abfallen der Blätter im Herbst, es ist eine aktive, energieabhängige Form des Zelltodes (Kerr et al., 1972; Sloviter, 2002). Der Tod von mehr als der Hälfte der während der Ontogenese entstandenen Nervenzellen ist eine wichtige Komponente einer normalen Hirnentwicklung (Oppenheim, 1991; Burek und Oppenheim, 1996). Überschüssig gebildete Neurone sterben ebenso ab, wie Nervenzellen, die keine normale Vernetzung (fehlerhafte Synaptogenese) mit anderen Nervenzellen aufbauen konnten, deren Migration nicht zielgenau verlief oder deren Funktion während der Entwicklung des ZNS transient war (Eichler und Porter, 1981; Burek und Oppenheim, 1996).

Nach neueren Empfehlungen zur Nomenklatur sollte für den physiologischen Prozess des Zelltodes während der Entwicklung der Begriff „programmierter Zelltod“ verwandt werden (Beranek, 2002; Sloviter, 2002).

Kennzeichen des programmierten Zelltodes sind eine primäre DNA-Fragmentation in ca. 180-Basenpaar-große Stücke. Elektronenmikroskopisch nachweisbar sind in der Frühphase der Apoptose die Kondensation von Nukleo- und Zytoplasma bei erhaltener Plasma- und Kernmembran, in späteren Phasen die Bildung apoptotischer Körperchen nach Einstülpung und Verformung der Plasma- und Kernmembran. Am Ende des Prozesses wird der so entstandene Zelldebris aus Kernbestandteilen und kondensiertem Zytoplasma mit augenscheinlich noch intakten Zellorganellen phagozytiert, ohne dass proinflammatorische Zellbestandteile freigesetzt werden. Eine Entzündungsreaktion in der Umgebung bleibt aus (Clarke, 1990). Diese morphologischen Veränderungen wurden zum ersten Mal von Kerr und Mitarbeitern in Leberzellen beschrieben (Kerr et al., 1972).

Ishimaru et al. (1999) studierten im Gehirn zwei Tage alter Ratten den Ablauf der ultrastrukturellen Veränderungen von Neuronen, die im Rahmen des physiologischen programmierten Zelltodes degenerierten. Die ersten Veränderungen werden im Nukleoplasma sichtbar. Die ursprünglich homogene Masse verklumpt und flockt aus. Es bilden sich Chromatinkugeln, indem sich „Chromatinklumpen“ aneinander legen. Parallel dazu zerfällt die Kernmembran, so dass Zyto- und Nukleoplasma sich vermischen können und die Chromatinkugeln aus dem Nukleus sich in der ganzen Zelle verteilen können. Der Aufbau der Kernmembran aus zwei Schichten bleibt weiter erkennbar.

Die Organellen des Zytoplasmas bleiben weitgehend unbeeinträchtigt von diesen Vorgängen, lediglich die Mitochondrien schwellen etwas an. Zuletzt schnürt die Zelle Zellfragmente, die sogenannten apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) ab, die im Neuropil verbleiben und dort abgebaut werden (Ishimaru et al., 1999).

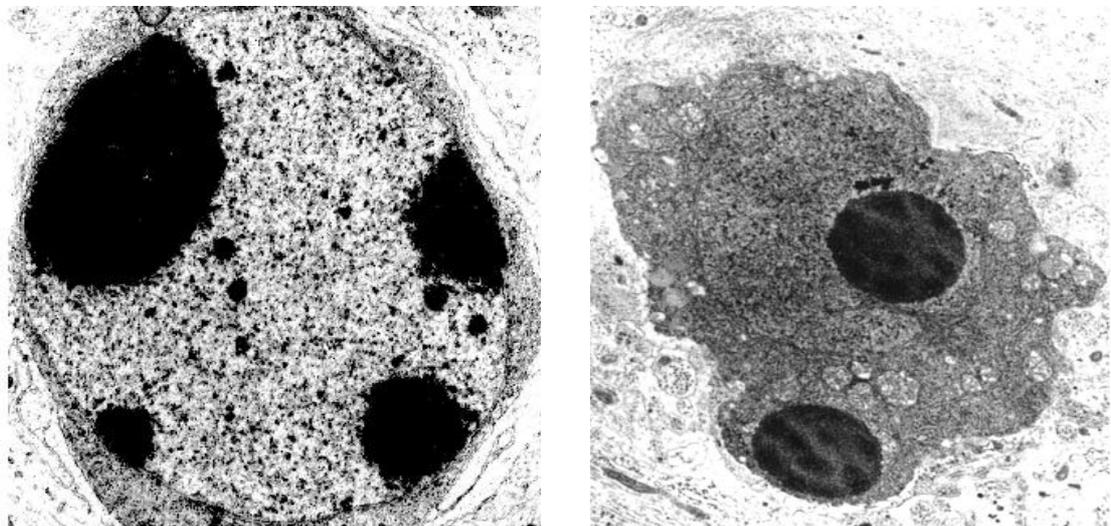


Bild 1: ultrastrukturelle Darstellung eines apoptotisch zugrunde gehenden Neurons in einer frühen Phase und einer späten Phase der Apoptose

In der frühen Phase der Apoptose verklumpt das Chromatin, die Kernmembran zerfällt und Nukleoplasma und Zytoplasma vermischen sich. In der Spätphase der Apoptose schnüren sich die Zellorganellen am Rand zu apoptotischen Körperchen ab, die dann phagozytiert werden. (Ishimaru et al., 1999)

1.3.2. Die apoptotische Signalkaskade

Der genetisch programmierte Zelltod verläuft aktiv. Andere, teilweise ähnlich aktive Zelltodformen finden bei Hirnschädigungen unterschiedlicher Genese, wie Ischämie, Trauma oder metabolische und neurodegenerative Erkrankungen statt. Beschrieben sind bisher je ein extrinsischer und ein intrinsischer Mechanismus der Initiierung aktiver Zelltodformen sowie ein alternativer Weg über das endoplasmatische Retikulum mit Aktivierung der Caspase 12, dem beim Menschen eine Rolle bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer zugeschrieben wird und der im Tierversuch auch nach mechanischem Hirntrauma aktiviert wird (Hengartner, 2000; Nakagawa et al., 2000; Fischer et al., 2002; Larner et al., 2004).

Die grundlegenden Erkenntnisse über die genetische Regulation des programmierten Zelltodes wurden an dem Nematoden *C. elegans* gewonnen und später die orthologen Gene bei Säugetieren nachgewiesen.

Der extrinsische Weg des programmierten Zelltodes beginnt mit der Aktivierung der „Todes“-Rezeptoren, von denen die klassischen, bekannten Rezeptoren zur FAS-/CD95-/TNF-Rezeptor-Familie gehören (Nagata, 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998; Krammer, 2000; Wajant, 2002). Nach Bindung der spezifischen Liganden an ihren Rezeptor kommt es intrazellulär zur Bildung eines Signalkomplexes (death-inducing signaling complex, DISC), der Proteine enthält, die die autoproteolytische Aktivierung einer Kaskade von Caspasen (Cystein-Aspartasen) ermöglicht. Im Falle einer Aktivierung des CD95-Rezeptors wird durch Interaktion der Todesdomänen (death domain, DD) des CD95-Rezeptors und der Proteine FADD/MORT1 die Todeseffektordomäne (death effector domain, DED) des FADD-Moleküls in die Lage versetzt, die Procaspase-8 in die aktivierte Caspase-8 autokatalytisch zu spalten (Krammer, 2000).

Der intrinsische Weg des programmierten Zelltodes wird nach Induktion von DNA-Strangbrüchen durch radioaktive Bestrahlung, oxidativen Stress, Stickstoffmonoxid oder Störungen in der Kalzium-Homöostase durch Freisetzung von Cytochrom C initiiert. Cytochrom C bildet mit dem Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor (apoptosis protease activating factor, Apaf-1), dATP und der Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom, das nach Aktivierung der Caspase-9 die Effektor-Caspase-3 aktiviert (Green und Reed, 1998; Hengartner, 2000; Cory und Adams, 2002). Alternativ kann die Freisetzung des Cytochrom C und die damit verbundene Signaltransduktion des aktiven Zelltodes auch nach Aktivierung der Todesrezeptoren und Caspase-8-assoziiierter Veränderung der mitochondrialen Membran durch das Protein Bid erfolgen (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Bid gehört neben Bax, Bad, Bid und Bcl-2 zur Gruppe der Bcl-2-Familie, Proteinen, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirksam sein können und so zur Regulation des programmierten Zelltodes beitragen. Weitere wichtige Modulatoren der apoptotischen Kaskade sind Wachstumsfaktoren, wie die Neurotrophine, die rezeptorvermittelt direkt und transkriptional Einfluss zum Beispiel auf die Mitglieder der bcl-2-Gruppe nehmen können (Miller und Kaplan, 2001).

Im späteren Verlauf der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Protein-Kinasen, zur Phosphorylierung von Transkriptions-Faktoren und Aktivierung von Caspasen, einer Gruppe von Cystein-Proteasen, welche die Zellzerstörung vollstrecken (Thornberry und Lazebnik, 1998). Intrazelluläre Proteine, wie zum Beispiel Proteine der bcl-2 Gruppe, können anti- oder proapoptotisch wirken und somit den Vorgang des programmierten Zelltodes hemmen oder begünstigen (Adams und Cory, 1998).

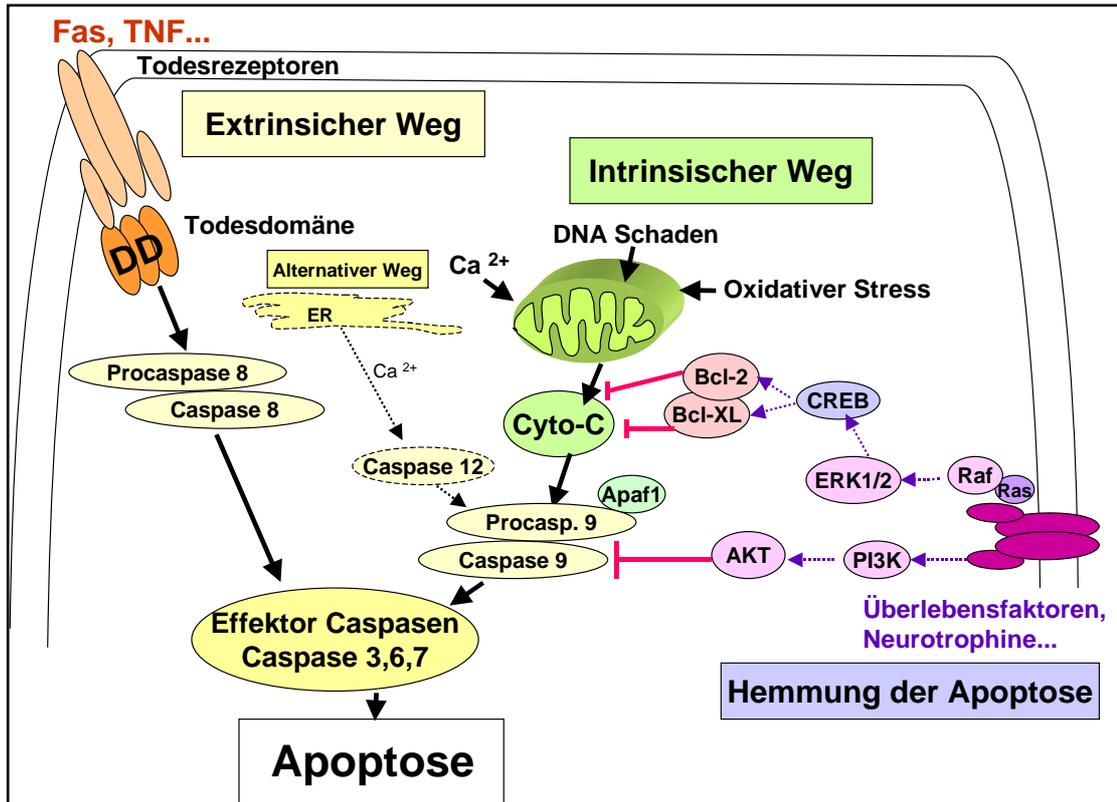


Abbildung 2: Schematische Darstellung der apoptotischen Kaskade

Die Apoptose kann extrinsisch durch die Aktivierung von Todesrezeptoren wie FAS oder TNF oder intrinsisch nach einer spezifischen Schädigung der Mitochondrien durch die Freisetzung von Cytochrom C ausgelöst werden. Ein alternativer Weg der Apoptoseauslösung ist durch die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Es folgt intrazellulär konsekutiv die Aktivierung einer Kaskade von Caspasen. Regulatorisch können Mitglieder der Bcl-2-Gruppe in diesen Mechanismus eingreifen. Überlebensfaktoren, Hormone und Neurotrophine und von ihnen abhängige Signalproteine sind bekannte antiapoptotische Faktoren.

1.3.3. Apoptose als Zelltodform im unreifen Gehirn

Anders als das reife reagiert das unreife Gehirn der Säugetiere auf Insulte verstärkt mit Apoptosen. Die Insulte können unterschiedlicher Natur sein, so wurde im unreifen Gehirn ein apoptotischer Zelltod nach einem Hirntrauma, nach Ischämie, Entzündungen, epileptischen Anfällen, aber auch nach Gabe verschiedener Drogen oder Medikamente oder dem Entzug von Wachstumsfaktoren beobachtet (Jevtovic-Todorovic et al., 1998; 2003; Berger et al., 2002; Moulder et al., 2002; Olney, 2002a;

2002b; Wasterlain et al., 2002; Blomgren et al., 2003).

Morphologische Kennzeichen und genetische Regulation des apoptotischen Zelltodes unterscheiden sich nicht vom physiologischen programmierten Zelltod, es wird jedoch angenommen, daß Reifungsgrad der Neurone und Art der Stimuli modifizierend Einfluss nehmen auf einzelne Faktoren der Stoffwechselwege, die zu einer Apoptose führen (Oppenheim et al., 2001; Zaidi et al., 2001).

1.4. Der passive Zelltod

1.4.1. Exzitotoxizität

Nervenzellen können aufgrund akuter, starker toxischer Reize, wie sie zum Beispiel bei einem starken Trauma oder einer akuten Ischämie vorkommen, auch passiv degenerieren (Bonfoco et al., 1995; Nicotera et al., 1999).

Der von Olney 1969 geprägte Begriff der Exzitotoxizität beschreibt einen neurotoxischen Effekt exzitatorischer Aminosäuren (zum Beispiel Glutamat oder Aspartat) durch eine Aktivierung exzitatorischer Glutamat-Rezeptoren (Olney, 1969). Die Exzitotoxizität ist der Prototyp des passiven Unterganges oder der Nekrose der Nervenzelle. Eine Aktivierung verschiedener Glutamat-Rezeptor-Typen, der ionotropen Rezeptoren (NMDA, AMPA, Kainat) oder der metabotropen Rezeptoren (mGluRI-III), kann eine exzitotoxische Neurodegeneration auslösen. Eine strikte Trennung zwischen passiver Nekrose und aktiver Apoptose wurde in den letzten Jahren verlassen, vielmehr sind die Übergänge zwischen beiden Zelltodmechanismen fließend (Nicotera et al., 1999; Sloviter, 2002). Es gibt zahlreiche Hinweise, wonach wichtige Regulatoren der Apoptose auch an nekrotischen oder exzitotoxischen Prozessen beteiligt sind, hierzu gehören zum Beispiel die Proteine Bax (Miller et al., 1997; Wang et al., 2003) und Bcl-2 (Martinou et al., 1994; Barbu et al., 2002) sowie die Caspasen, deren Hemmung auch bei

ischämischen Insulten eine neuroprotektive Wirkung hat (Benchoua et al., 2001).

Die akute Komponente der Glutamat-Toxizität wird durch einen massiven Einstrom von Natrium- und Chlorid-Ionen in die Zelle vermittelt. Die verzögerte Komponente der Glutamat-Neurotoxizität ist abhängig von Kalziumionen und wird zumindest teilweise durch eine Aktivierung Kalzium-abhängiger Proteasen vermittelt. Calpaine und andere Proteasen, Lipasen wie die Phospholipase A₂ sowie die Bildung der Botenstoffe Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO⁻) sind an der späten Phase der kalzium-aktivierten exzitotoxischen Kaskade beteiligt. Es kommt anschließend zur Peroxidation von Membranlipiden, Hydroxylierung und Nitrierung aromatischer Aminosäuren, Sulfhydryl-Oxidation von Proteinen, Aufspaltung zytosolischer, mitochondrialer und nukleärer Enzymen, Erschöpfung intrazellulärer Glutathion-Reserven und schließlich Schädigung der DNA und Herabsetzung des NAD- und ATP-Gehaltes der Zelle.

Die ersten makroskopischen Beschreibungen des nekrotischen Zelltodes stammen von Rudolf Virchow 1858. Olney und Mitarbeiter beschrieben lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Veränderungen im Gehirn von Nagetieren und Primaten nach subkutaner Applikation von Natriumglutamat (Olney, 1969; Olney und Sharp, 1969; Ishimaru et al., 1999). Zunächst schwellen die Neurone an, das Chromatin verklumpt und der Kern schrumpft pyknotisch ein. Elektronenmikroskopisch sind erste dilatative Veränderungen an den Dendriten sichtbar, während die Axone unverändert bleiben. Das endoplasmatische Retikulum vakuolisiert und zerfällt. Die Mitochondrien schrumpfen zunächst, später schwellen auch sie ödematös an.

Die Kernbestandteile verändern sich zum Schluss: Das Chromatin verklumpt, wandert zur Kernmembran und verschmilzt zu einer elektronendichten Masse. Am Ende des exzitotoxischen Prozesses werden die Zellen von benachbarten Makrophagen phagozytiert.

1.5. Überlebensstrategien und neurotrophe Faktoren im unreifen Gehirn

1.5.1. Die Beeinflussung der apoptotischen Signalkaskade

Aktive Zelluntergänge sind an der Pathophysiologie einer Vielzahl von degenerativen und entzündlichen Krankheiten des Zentralnervensystems beteiligt. Bereits früh nach Aufklärung der Transduktionswege apoptotischer Signale wurden Untersuchungen zu deren Beeinflussung mit dem Ziel vorgenommen, den Krankheitsverlauf neurodegenerativer Erkrankungen zu beeinflussen (Thompson, 1995). Die Hemmung der Caspasen, die kaskadenartig im Verlauf der Apoptose aktiviert werden, war zunächst Ziel der Forschung. Es wurden Caspase-Hemmer entwickelt, die in Tiermodellen *in vivo* und *in vitro* jeweils signifikant den aktiven Zelltod, zum Beispiel nach Ischämie, Entzündung, Trauma oder in Modellen der Neurodegeneration vermindern konnten (Loddick et al., 1996; Hara et al., 1997; Holtzman und Deshmukh, 1997; Braun et al., 1999; Ona et al., 1999; Clark et al., 2000b; Gianinazzi et al., 2003; Toulmond et al., 2004). Untersuchungen am Menschen fehlen bislang. Andere mögliche Ansätze zur Beeinflussung aktiver Zelltodkaskaden sind molekulargenetische Ansätze mit dem Ziel der Überexpression bestimmter antiapoptotischer Gene, wie des *APAF-1-DN* (Apoptose-Protease aktivierender Faktor-1-Dominant-negativer Inhibitor) in einem Tiermodell des M. Parkinson (Mochizuki und Mizuno, 2003) oder des antiapoptotischen Gens *bcl-2* in einem Schlaganfall-Modell (Yenari et al., 2003). Eine Gentherapie zur Beeinflussung der apoptotischen Kaskade ist bislang mit Ausnahme der Behandlung maligner Erkrankungen nicht in die Humanmedizin eingeführt.

1.5.2. Neurotrophe Faktoren

Neurotrophine, eine Familie strukturell verwandter Wachstumsfaktoren, sind essentiell für das Überleben von Neuronen in frühen Entwicklungsphasen, sie

fördern die Differenzierung und den Funktionserhalt (Rabacchi et al., 1999, Huang und Reichardt, 2001). Zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien ist das Verständnis der intrazellulären Wirkmechanismen der Neurotrophine eine Voraussetzung. Nach Bindung der Neurotrophine BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT-3 (Neurotrophin 3), NT-4/5, und NGF (nerve growth factor) an ihre spezifischen Oberflächenrezeptoren Trk (tropomyosin-related kinase) A (NGF), B (BDNF, NT-4/5) und C (NT-3) werden intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, die das Überleben der Nervenzellen fördern (Lee et al., 2001). So führt zum Beispiel die Bindung des BDNF an seinen spezifischen Rezeptor Trk B zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des Ras/ERK-(extracellular signal regulated kinase)-Protein-Kinase-Weges und des Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-(PI3K)/Akt-Kinase-Weges (Patapoutian und Reichardt, 2001). Beide Signaltransduktionswege sind durch eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der Kinasen gekennzeichnet. Wichtige Mitglieder des ERK-Signaltransduktionsweges sind die Kinasen Ras/Raf, MAPK (mitogen-activated-protein kinase)/ERK1/2 und die intranukleäre Kinase CREB (c-AMP-response-element-binding protein), deren aktivierte Form in der Lage ist, antiapoptotische Gene wie z. B. *bcl-2* regulatorisch zu beeinflussen (Walton und Dragunow, 2000). Das Schlüsselprotein des PI3K-Signaltransduktionsweges ist die Kinase Akt, die direkt regulatorisch auf die Expression antiapoptotischer Gene Einfluss nehmen kann oder die Aktivierung proapoptotischer Gene hemmt (Miller und Kaplan, 2001; Patapoutian und Reichardt, 2001).

Neurotrophine wie BDNF wirken nach Ischämie/Hypoxie (Han und Holtzman, 2000; Galvin und Oorschot, 2003) sowie in Epilepsie- und Trauma-Modellen in vivo neuroprotektiv (Tandon et al., 1999; Zhou und Shine, 2003). Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose, dem Morbus Alzheimer und Morbus Huntington sowie der diabetischen oder HIV-assoziierten Neuropathie wurde die Wirksamkeit neurotropher Faktoren untersucht.

Diese Studien waren auf Grund mangelnder Wirkung der Medikamente und/oder erheblicher Nebenwirkungen wenig überzeugend (Thoenen und Sendtner, 2002). An Kindern wurden keine Therapiestudien durchgeführt.

1.5.3. Östrogene

Das weibliche Sexualhormon Östrogen weist *in vitro* und *in vivo* neuroprotektive Eigenschaften auf. Neben der klassischen Bindung des Östrogens an seinen nukleären Rezeptor und den daraus resultierenden Aktivierungsvorgängen von Transkriptionsfaktoren sind alternative Wirkmechanismen des Östrogens beschrieben, die die neuroprotektiven Eigenschaften erklären helfen (Gruber et al., 2002). So sind bestimmte Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Insulin oder der Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in der Lage, über Proteinkinasen den Östrogenrezeptor zu aktivieren. Entscheidend in diesem Zusammenhang scheint aber die Bindung von Östrogen an solche Oberflächenrezeptoren zu sein, die konsekutiv neuroprotektive Signaltransduktionswege wie der ERK1/2-Kinase aktivieren (Kato et al., 1995; Collins und Webb, 1999). Östrogen ist damit offensichtlich in der Lage, die gleichen überlebensfördernden Signalkaskaden zu aktivieren wie dies von den Neurotrophinen länger bekannt ist.

Bei Mäusen vermindert nach ischämischem Insult die Gabe von Östrogen das Infarkt-Volumen (Wise et al., 2000). Auch bei Tieren mit einer Epilepsie werden neuroprotektive Wirkungen des Östrogens beobachtet (Veliskova et al., 2000). In der Humanmedizin sind positive Effekte des Östrogens bei psychiatrischen (Schizophrenie) und neurodegenerativen (Morbus Alzheimer) Erkrankungen bekannt (Asthana et al., 2001; Kulkarni et al., 2001). In der Pädiatrie beschränkt sich der Einsatz des Östradiol bisher auf die Gabe an Frühgeborene mit dem Ziel einer besseren Knochenmineralisation (Trotter und Pohlandt, 2000).