

4. Diskussion der eigenen Forschungsergebnisse

4.1. Hirnschäden durch Trauma

In den vorliegenden Arbeiten wurden die Besonderheiten eines Hirntraumas im unreifen Gehirn charakterisiert. Anders als das adulte Gehirn reagiert das sich entwickelnde Gehirn auf ein mechanisches Hirntrauma verstärkt mit Apoptose. In diesem Lebensalter übersteigt der apoptotische Schaden den Zellschaden durch Exzitotoxizität um ein Vielfaches. Während exzitotoxische Schäden mit einem zeitlichen Maximum von 6 Stunden nach dem Ereignis registriert werden, sind die ausgedehntesten apoptotischen Zelluntergänge 24 Stunden nach dem Trauma zu beobachten, aber noch bis zu 5 Tagen nach dem Trauma nachweisbar (Ikonomidou et al., 1996). Apoptotisch untergehende Neurone werden nicht nur im Bereich der Traumaregion parietal rechts nachgewiesen, sondern auch in entfernt liegenden Traumaregionen und sogar kontralateral zur Traumaregion. Mögliche Ursachen für dieses diffuse Schädigungsmuster nach mechanischem Hirntrauma sind die unreife Myelinisierung und der erhöhte Wassergehalt des infantilen Gehirns, der die mechanische Kraft in tiefere Hirnstrukturen weiterleitet und zur Depolarisation an den mitochondrialen Membranen mit nachfolgendem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma und zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade führen kann.

Die Vulnerabilität des Gehirns ist um den 7. Lebenstag der Ratte am größten, sie ist davor und danach deutlich geringer und nach 21 Lebenstagen nicht mehr nachweisbar. Die Kurve der Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber einem mechanischen Hirntrauma folgt damit der Kurve der Hirnwachstumsgeschwindigkeit der Ratte, deren zeitliches Maximum ebenfalls um den 7. Lebenstag liegt (Dobbing und Sands, 1979; vgl. Abbildung 1). Die Vulnerabilität des unreifen Gehirns ist somit zu einem Zeitpunkt am größten, an dem wichtige Reifungs- und Differenzierungsprozesse ablaufen, die der genetischen Kontrolle potentiell

proapoptotischer Faktoren, wie c-jun, c-fos und p-53 unterliegen (Ferrer et al., 1996). Unter physiologischen Bedingungen fördern diese Faktoren die Differenzierung, können jedoch unter pathologischen Bedingungen auch einen massiv erhöhten programmierten Zelltod der Zellen initiieren, wie das für p53 nach Bestrahlung gezeigt werden konnte (Borovitskaya et al. 1996; Almog und Rotter, 1997).

Anders als bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten wir im Gehirn traumatisierter adulter Tiere keine Apoptose nachweisen. Bei anderen Spezies wurde ein apoptotischer Zelltod in adulten Tieren Tage bis Monate nach einer traumatischen Schädigung in Gehirn und Rückenmark beobachtet. (Conti et al., 1998; Springer et al., 2000; Brodhun et al., 2001). Die Ausprägung der Apoptose differierte je nach Stärke und Art des eingesetzten Trauma-Modells. Das von uns angewandte Modell eines fallenden Gewichtes verursacht ein moderates mechanisches Hirntrauma, und auch die Anpassung der Traumastärke an das veränderte Hirngewicht konnte im Gegensatz zu den Jungtieren im Alter von 3 und 7 Tagen bei 30 Tage alten Tieren keine apoptotischen Zelluntergänge verursachen. Im unreifen und im reifen Gehirn sind nach einem mechanischen Hirntrauma sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg der Apoptose-Kaskade in dem Schädigungsmechanismus involviert. Die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma nach mechanischem Trauma führt zur Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges. Anders als im erwachsenen Gehirn kommt es im unreifen Gehirn schon frühzeitig nach dem Trauma zu einer Freisetzung des Cytochroms C nach maximal 4 Stunden gegenüber 24 Stunden bei adulten Tieren (Keane et al., 2001; Felderhoff-Mueser et al., 2002; Sullivan et al., 2002). Warum es nach einem Hirntrauma zur Freisetzung von Cytochrom C kommt, ist nicht genau geklärt. Die Freisetzung von Cytochrom C kann durch Mitglieder der *bcl-2*-Gruppe über eine Verminderung der Membranpermeabilität des Mitochondriums gehemmt werden (Nicholson, 2000). In unserem Trauma-Modell wurde eine verminderte Expression

der antiapoptotischen Gene *bcl-2* und *bcl-x_L* bereits 0,5 bis 2 Stunden posttraumatisch nachgewiesen, was eine erhöhte Membranpermeabilität mit konsekutiver Freisetzung von Cytochrom C erklären kann. Noch 120 Stunden nach dem Trauma erreichte das Niveau der Expression des *bcl-2*-Gens in traumatisierten Tieren nicht das der Kontrolltiere. Die Ursache einer verminderten Expression der antiapoptotischen Gene Gehirn *bcl-2* und *bcl-x_L* nach Hirntrauma im unreifen ist unklar. Untersuchungen im Gehirn erwachsener Tiere nach Hirntrauma erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Es wurden sowohl eine verstärkte Expression als auch eine, wie von uns beobachtete, verminderte Expression des *bcl-2* Gens nachgewiesen (Clark et al, 1997; Dong et al., 2001; Raghupathi et al., 2002; 2003). Die erhöhte Expression des antiapoptotischen *bcl-2* Gens im reifen Gehirn nach Hirntrauma und begleitender Hypoxämie wurde von den Autoren als endogener Mechanismus zur Verhinderung weiterer apoptotischer Schäden gewertet (Clark et al., 1997).

Die besondere Vulnerabilität des unreifen Gehirns gegenüber einem mechanischen Hirntrauma lässt sich auch durch die altersabhängig unterschiedliche Expression und Synthese des Apoptose-Protease aktivierenden Faktors (Apaf1), eines Kofaktors des Apoptosoms und der Effektor-Caspase 3 erklären. Die Expression von *apaf1* und *caspase 3* und die die Proteinsynthese dieser Faktoren ist im Gehirn 7 Tage alter Ratten höher als im Gehirn 14 oder 60 Tage alter Ratten (Yakovlev et al., 2001; Oka et al., 2002). Im unreifen Gehirn steht damit für die Bildung des Apoptosoms mehr Substrat zur Verfügung als im Gehirn älterer Tiere. Zusätzlich steht bei infantilen Ratten auch mehr Substrat der Effektor-Caspase 3 zur Verfügung. Es kann vermutet werden, dass die entwicklungsabhängige Herunterregulation der Effektor-Caspase 3 einen möglichen heranreifenden Schutzmechanismus des reifenden Gehirns vor apoptotischen Schäden darstellt (Yakovlev et al., 2001).

Die Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose-Kaskade nach einem mechanischen Hirntrauma mit verstärkter Expression und Synthese des

Todesrezeptors Fas wurde sowohl im erwachsenen als auch im unreifen Gehirn nachgewiesen (Nakashima et al., 1999; Beer et al., 2000; Felderhoff-Müser et al., 2002). Dieser Weg der Aktivierung der Apoptose-Kaskade ist auch nach Hypoxie/Ischämie des unreifen Gehirns und in Epilepsiemodellen des erwachsenen Gehirns beschrieben (Felderhoff-Mueser et al., 2000; Northington et al., 2001; Tan et al., 2002).

Es konnten in den letzten Jahren einige Pathomechanismen beschrieben werden, die die Besonderheiten des unreifen Gehirns nach mechanischem Hirntrauma besser erklären helfen. Die besondere Vulnerabilität des unreifen Gehirns gegenüber einem mechanischem Hirntrauma, auf das es in verstärktem Maße mit einem noch längere Zeit nachweisbaren apoptotischem Zelltod reagiert, bestimmt den neuropathologischen Ausgang des Insultes entscheidend mit. Eine mögliche Ursache für die erhöhte Zahl apoptotisch untergehender Neurone nach mechanischem Trauma liegt in einer verminderten Aktivität antiapoptotischer Schutzmechanismen im unreifen Gehirn, in dem auch noch physiologische Apoptosevorgänge stärker ausgeprägt sind.

4.2. Hirnschäden durch Blockade von NMDA-Rezeptoren und Äthanol

Das exzitatorische Transmittersystem ist an der Pathogenese verschiedener Insulte und Erkrankungen des erwachsenen und kindlichen Gehirns, wie einer Ischämie, Trauma, Entzündungen aber auch neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt (Dirnagl et al. 1999; Johnston et al., 2001; Ruppel et al., 2001; Arundine und Tymianski, 2004). Zur Behandlung derartiger Insulte gab es in der Vergangenheit Versuche an Tieren, aber auch Studien in der Humanmedizin mit dem Ziel, die exzitotoxischen Schäden mit Hilfe von NMDA-Antagonisten zu begrenzen und damit den Ausgang zu verbessern (Bernert und Turski, 1996; Rao et al., 2001; Ruppel et

al., 2001; Bramlett und Dietrich, 2004). Die Wirksamkeit der NMDA-Rezeptor-Antagonisten konnte in mehreren Studien jedoch nicht nachgewiesen werden (Albers et al., 2001; Birmingham, 2002; Maier et al., 2003; Wiech et al., 2004).

Im unreifen Gehirn der Ratte verursachen Substanzen wie MK801 (Dizozilpin), Ketamin, Phencyclidin (PCP) oder CPP (Carboxypiperazin-4-yl-propyl-1-Phosphonsäure), die die neuronale Aktivität durch Blockade der exzitatorischen NMDA-Rezeptoren herabsetzen, nicht nur keine Neuroprotektion, sondern einen weitreichenden apoptotischen Zelluntergang. Die Zahl der untergehenden Neurone ist nach intraperitonealer Gabe von MK801 im laterodorsalen Thalamus auf das 39fache gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Erste Hinweise für diese fatale Wirkung der NMDA-Antagonisten ergaben sich aus Traumaversuchen bei neonatalen Ratten, in denen NMDA-Rezeptor-Antagonisten protektiv bei der Begrenzung des exzitotoxischen Zellschadens, jedoch toxisch im Hinblick auf die Beeinflussung der apoptotischen Spätschäden nach experimentellem Trauma bei 7-Tage alten Ratten waren (Ikonomidou et al., 1996; Pohl et al., 1999). Die Phase der Vulnerabilität des Gehirns der Ratten auf NMDA-Antagonisten korreliert auch in diesem Schädigungsmodell mit der Phase des schnellen Hirnwachstums, die in den ersten drei Lebenswochen stattfindet. Auch die als Anästhetika genutzten NMDA-Antagonisten Ketamin und Lachgas haben im Gehirn unreifer Ratten einen proapoptotischen Effekt und verursachen persistierende Gedächtnis- und Lerndefizite (Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Der exzitatorische NMDA-Rezeptor hat also im sich entwickelnden Gehirn für Neurone eine überlebensfördernde Funktion.

Klinische kontrollierte Studien über die Auswirkungen einer Gabe von NMDA-Antagonisten auf mentale Fähigkeiten behandelter Kinder existieren nicht. In Fallberichten über den Einsatz der Medikamente Ketamin und Amantadin, einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten und Dopamin-Agonisten zur Influenzaphylaxe, zur Behandlung schwer behandelbarer Epilepsien bzw. aggressiver

Verhaltensstörungen mental beeinträchtigter Kinder, wurden keine zusätzlichen Beeinträchtigungen der Kinder unter der Therapie beschrieben (King et al., 2001; Mewasingh et al., 2003).

Die Mechanismen, die zur Neurodegeneration nach NMDA-Rezeptor-Blockade führen, sind in den letzten Jahren untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass MK801 endogene Neurotrophin-abhängige Signal-Systeme hemmt, die im jungen Gehirn das Überleben von Neuronen sichern. MK801 führt im Gehirn 7-Tage-alter Ratten zu einer verminderten Expression der Neurotrophine *BDNF*, *GDNF* und auch *NT-3* auf der mRNA-Ebene. Zusätzlich ist nach Gabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten die Aktivität der Mitglieder des Ras/ERK-(extracellular signal regulated kinase)-Protein-Kinase-Weges ERK1/2 und CREB vermindert und proapoptotische Mechanismen sind damit verstärkt aktiv. Transgene Mäuse, in denen der antiapoptotische Faktor Ras aus der gleichen Signalkaskade verstärkt exprimiert wird, reagierten weniger empfindlich auf die proapoptotische Wirkung des MK801 (Hansen et al., 2004). Die überlebensfördernde Wirkung der Mitglieder der Neurotrophin-abhängigen Signal-Kaskaden ist in zahlreichen Modellen nachgewiesen worden, und so lässt die Beeinträchtigung dieses Systems auf eine direkte ursächliche Beteiligung bei der Neurotoxizität des NMDA-Rezeptor-Antagonisten schließen (Mantamadiotis et al., 2002).

Nach den tierexperimentellen Daten über eine erhebliche neurodegenerative Wirkung der NMDA-Antagonisten im unreifen Gehirn und den Ergebnissen über eine fehlende Wirksamkeit dieser Substanzen bei einer Reihe von Erkrankungen des erwachsenen Gehirns, sollte die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten an Patienten der Altersgruppe des Frühgeborenen bis zum Kleinkind einer strengen Indikation unterzogen und, wenn möglich, auf sie verzichtet werden.

4.2.1. Das fetale Alkoholsyndrom

Äthanol, ein NMDA-Rezeptor-Antagonist und gleichzeitig Agonist des GABA_A-Rezeptors, hat ein hohes neurotoxisches Potential im sich entwickelnden Gehirn. Die Pathomechanismen der schädigenden Äthanolwirkungen waren bis vor kurzem Gegenstand von Spekulationen. Im Tierversuch konnte an jungen Nagern gezeigt werden, dass die systemische Gabe von Äthanol im Gehirn, einschließlich Rückenmark und Retina, eine massive apoptotische Neurodegeneration verursacht (Ikonomidou et al., 2000; Olney et al., 2002; Climent et al., 2002; Tenkova et al., 2003, Dikranian et al., 2005). Die Schäden sind in der Phase des intensivsten Hirnwachstums der Ratte um den 7. Lebenstag am stärksten ausgeprägt, wie das auch nach einem experimentellen Hirntrauma und nach der Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu beobachten ist (Ikonomidou et al., 2000; Tenkova et al., 2003). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß des Schadens und Dauer und Höhe der erreichten Blutspiegelkonzentrationen. In unserem Modell einer akuten Äthanolgabe war die apoptotische Neurodegeneration ab einer Zeitdauer von 4 Stunden mit einer Blut-Äthanol-Konzentration von 200 mg/dl im Gehirn gegenüber den Kontrolltieren signifikant verstärkt. Dieser Blutspiegel wurde nach einer Gabe von minimal 2 x 1,5 g/kg Äthanol als 20%ige Lösung erreicht. In anderen Modellen einer chronischen Äthanolexposition konnten apoptotische Veränderungen bereits bei Blutspiegelkonzentrationen um 100 mg/dl beobachtet werden (Climent et al., 2002; Heaton et al., 2003).

Das Schädigungsmuster nach Äthanolgabe stellt eine Überlagerung der Degenerationsmuster nach Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten und GABA_A-Agonisten dar. Verschiedene Hirnareale sind dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Hirnentwicklung besonders empfindlich. Die mediodorsalen und ventralen Kerngebiete des Thalamus sind unmittelbar postnatal, am 1. Lebenstag

der Ratte maximal vulnerabel, kortikale Regionen nach Gabe des Äthanolis am 7. Lebenstag.

In einem anderen Modell einer pränatalen Alkoholgabe an schwangere Ratten konnten bei den Nachkommen der exponierten Mütter noch im Erwachsenenalter erhebliche astrogliale Veränderungen als Hinweis auf die persistierenden Schäden vor allem in Schicht V des Cortex nachgewiesen werden (Fakoya, 2005).

Andere Arbeitsgruppen konnten die lang anhaltende toxische Wirkung des Äthanolis bis zum jungen Erwachsenenalter hin funktionell darstellen. Früh postnatal alkoholbehandelte Mäuse hatten im juvenilen Alter deutlich stärkere Lerndefizite aufzuweisen als ihre unbehandelten Altersgenossen (Goodlett und Johnson, 1997; Tomlinson et al., 1998; Johnson und Goodlett, 2002; Wozniak et al., 2004).

In unseren Tierexperimenten ging der Zelluntergang nach Äthanolgabe mit einem echten Untergang von Hirnmasse einher. Die Gehirne der behandelten Tiere gesamt und Groß- und Kleinhirn gesondert gewogen waren 5 Tage nach Äthanolgabe signifikant leichter als ihre gleichaltrigen Kontrolltiere (Ikonomidou et al., 2000).

Die Aktivierung der Caspase-3 ist ein Schlüsselereignis in der apoptotischen Signalkaskade, sie kann sowohl auf extrinsischem Wege über Todesrezeptoren als auch auf intrinsischem Weg durch Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erfolgen. In der Untersuchung der molekularen Mechanismen der Äthanol-Toxizität konnte nachgewiesen werden, dass Äthanol seine proapoptotische Wirkung durch *bax*-induzierte Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung der intrinsischen Apoptose-Kaskade entfaltet. In Gehirnen *bax*-defizienter Mäuse war nach Gabe von Äthanol keine signifikante apoptotische Neurodegeneration sichtbar (Young et al., 2003). Andere Pathomechanismen der Äthanol-Neurotoxizität sind die Beeinflussung der Neurotrophin-abhängigen Signaltransduktionswege, die das Überleben von Nervenzellen fördern. Eine chronische Äthanolexposition führt im Gehirn behandelter junger Ratten zu einer

Verminderung der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT-3 und zu einer verminderten Menge des antiapoptotischen Proteins pAkt aus der Neurotrophin-abhängigen PI3K-Signaltransduktionskaskade und der aktivierten Kinase ERK1/2 aus dem Ras/ERK-(extracellular signal regulated kinase)-Protein-Kinase-Weg (Climent et al., 2002; Heaton et al., 2003).

Mit Hilfe der tierexperimentellen Ergebnisse ist es möglich geworden, einige weitere Pathomechanismen des Fetalen Alkoholsyndroms aufzuklären. Durch eine perinatale Äthanolexposition stirbt eine Vielzahl neuronaler Zellen vorwiegend apoptotisch ab, und dieser Zellverlust spiegelt sich auch in einem niedrigeren Hirngewicht der behandelten Tiere wider. Auch im Gehirn erwachsener alkoholkranker Menschen konnten TUNEL-positive Zellen als Nachweis einer apoptosetypischen DNA-Fragmentation im Hippocampus und im frontalen Kortex nachgewiesen werden (Ikegami et al., 2003). Es ist nachvollziehbar, dass der zum Fetalen Alkoholsyndrom gehörende Mikrozephalus durch einen Verlust von Hirnmasse entsteht oder dass die mentale Retardierung durch eine ungenügende Vernetzung der Neurone und die dadurch bedingte Behinderung von Lernprozessen zu erklären ist.

4.3. Apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn nach Gabe von Antiepileptika

Die neurotoxische Wirkung der Antiepileptika ist ein seit langem bekanntes Problem. Während einige der Pathomechanismen für die früh embryonale toxische Wirkung der viel benutzten Medikamente Phenytoin, Carbamazepin oder Valproat aufgeklärt sind, gab es bisher über die Ursachen des Mikrozephalus und der mentalen Defizite exponierter Kinder nur Spekulationen. Im Tierversuch konnte an jungen Ratten nachgewiesen werden, dass oft eingesetzte Antiepileptika in für Krampfanfälle

üblichen Dosierungen zu einer erheblichen apoptotischen Neurodegeneration im Gehirn führen. Diesen neurotoxischen Effekt haben Antiepileptika verschiedener Wirkmechanismen, spezifische GABA_A-Agonisten, Natrium-Kanal-Blocker und Hemmer der glutamatergen Neurotransmission oder Medikamente, deren Wirkung auf einer Kombination verschiedener Mechanismen beruht. Besonders stark ist das Gehirn 7-Tage-alter Ratten und Mäuse betroffen, zu einem Lebenszeitpunkt, an dem das Gehirn seine maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht hat und Entwicklungsprozesse der Migration, Vernetzung und Synaptogenese ablaufen. Der neurotoxische Effekt der Antiepileptika ist klar dosisabhängig mit einer zunehmenden Dichte apoptotisch absterbender Neurone bei wachsender Dosierung. Andere Arbeitsgruppen wiesen ein signifikant niedrigeres Hirngewicht bei früh postnatal behandelten Ratten als Ausdruck eines Substanzverlustes des Gehirns nach (Pereira de Vasconcelos et al., 1990).

Zum Nachweis der klinischen Relevanz dieses Phänomens wurden in unserer Arbeitsgruppe exemplarisch für die Medikamente Phenobarbital, Phenytoin und Valproat Blutspiegelkontrollen durchgeführt und mit dem Ausmaß der Neurodegeneration korreliert. Die erreichten Plasmakonzentrationen waren mit denen in der Humanmedizin angestrebten Werten vergleichbar. Als das toxischste Medikament erwies sich Valproat. Hier wurde mit einer Einmalinjektion von 50 mg/kg ein Spitzenspiegel von 80 µg/ml erreicht, was zu einem signifikanten Zelluntergang führte. Diese Dosierung von 50 mg/kg liegt dabei deutlich unterhalb des in Krampfmodellen von Nagetieren wirksamen Bereiches, der bei ca. 100 mg/kg beginnt (Kaminski et al., 2001; Reddy und Rogawski, 2001). Diese verstärkte Toxizität liegt möglicherweise in der Kombination aus verschiedenen Wirkmechanismen der Substanz begründet. Valproat verstärkt die GABAerge Transmission, es blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle und hemmt die glutamaterge Signalübertragung. In einer internationalen, vergleichenden Untersuchung der Inzidenz angeborener Fehlbildungen nach Einnahme

verschiedener Antiepileptika in der Schwangerschaft war Valproat ebenfalls ein Medikament mit einer hohen Toxizität: 11,1% der Valproat-exponierten Nachkommen wiesen kongenitale Malformationen verschiedenster Organsysteme auf (Kaneko et al., 1999). Auch in dieser Untersuchung gab es eine Dosis- bzw. Plasmaspiegel-Abhängigkeit der Häufigkeit der Malformationen.

Im Tierversuch und bei verschiedenen Studien in der Humanmedizin war die Kombinationstherapie mit Antiepileptika stärker toxisch als eine Monotherapie. In unseren tierexperimentellen Untersuchungen erwiesen sich die Kombinationen aus primär nicht toxischen Dosierungen der Substanzen Diazepam und Phenobarbital oder Diazepam und Phenytoin als sehr stark apoptogen für das Gehirn unreifer Ratten. In der Studie von Kaneko und Mitarbeitern hatten die Nachkommen von Müttern mit einer Kombinationstherapie aus Carbamazepin und Valproat oder Phenytoin, Primidon und Phenobarbital ein höheres Risiko für Fehlbildungen. Die Inzidenz von Fehlbildungen bei den Kindern derart behandelter Schwangerer war 21,4% bzw. 24% (Kaneko et al., 1999). Auch in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Dessens hatten die Neugeborenen der Mütter mit einer Therapie aus Phenytoin und Phenobarbital einen um im Mittel 0,7 cm kleineren Kopfumfang als die Kinder von unbehandelten Müttern oder nach einer Monotherapie mit Phenobarbital (Dessens et al., 2000).

In Verhaltensstudien perinatal Phenobarbital-exponierter Ratten und Mäuse hatten diese bis in das Erwachsenenalter hinein irreversible Defizite in Tests der Lokomotion und des Verhaltens (Pick und Yanai, 1983; Pereira de Vasconcelos et al., 1990). Auch beim Menschen sind permanente Defizite im Verhalten und Lernen nachgewiesen, in der Studie von Dessens und Mitarbeitern hatten 12% der Antiepileptika-exponierten Kinder versus 1% der unbehandelten Kinder eine anhaltende Lernstörung (Dessens et al., 2000). Das Risiko einer intellektuellen Beeinträchtigung steigt dabei mit einer Polytherapie an (Zahn, 1998).

Auch in diesem Schädigungsmodell des sich entwickelnden Gehirns wurden Pathomechanismen der apoptotischen Neurodegeneration als Grundlage für eine mögliche Modifikation der toxischen Effekte untersucht. Gebräuchliche Antiepileptika wie Phenobarbital, Phenytoin oder Valproat beeinflussen wichtige überlebensfördernde Signalkaskaden, sie hemmen die Expression neurotropher Faktoren und führen zur Herunterregulation antiapoptotisch wirksamer Kinasen aus der PI3K-Signaltransduktionskaskade und des Ras/ERK-(extracellular signal regulated kinase)-Protein-Kinase-Weges. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch noch andere, bislang nur unvollständig untersuchte Pathomechanismen, wie die Beeinflussung der Synaptogenese oder der Neurogenese an der Entwicklung mentaler Defizite nach Einnahme von Antiepileptika in einer vulnerablen Phase der Hirnentwicklung beteiligt sind.

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden zunächst an gesunden Ratten durchgeführt. Bei der Untersuchung der Effekte der Antiepileptika auf das krampfende unreife Gehirn wurde eine Senkung der Schwelle für die neurotoxische Wirkung nachgewiesen (Bittigau et al., 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass es bei der Behandlung einer Epilepsie zu zusätzlichen negativen Auswirkungen der Antiepileptika im heranwachsenden Gehirn kommen kann. In der Tat ist von einigen Arbeitsgruppen ein negativer Effekt speziell der Barbiturate und Benzodiazepine und der Komedikation mehrerer Antiepileptika auf die Kognition epilepsiekranker Kinder beschrieben worden (Calandre et al., 1990; Bulteau et al., 2000; Meador, 2002). Die Untersuchung von Antiepileptika mit verschiedenen kognitiven Risiken innerhalb einer Gruppe (Williams et al., 1998), die retrospektive Betrachtungsweise, die kleine Gruppengröße und das Fehlen passender Vergleichsgruppen macht die Bewertung klinischer Studien zur Untersuchung von Nebenwirkungen der Antiepileptika schwierig und schränkt ihre Aussagekraft ein (Loring und Meador, 2004). Ein zusätzliches Problem klinischer Studien ist die weitgehende Beschränkung auf die klassischen Antiepileptika wie Barbiturate, Benzodiazepine,

Valproat und Phenytoin. Die in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts eingeführten Antiepileptika Lamotrigin, Levetiracetam oder Topiramate wurden hinsichtlich ihrer Neurotoxizität in unseren Tierexperimenten getestet. Sie erwiesen sich als weniger toxisch als die klassischen Antiepileptika (Ikonomidou et al., 2000; Glier et al., 2004). Klinische prospektive Studien mit aussagekräftigen Tests, guten Kontrollgruppen, Randomisierung und ausreichender Gruppengröße fehlen bisher. Auf Grund der Ergebnisse aus unseren Tierexperimenten und den vorhandenen klinischen Untersuchungen ist zur möglichen Vermeidung kognitiver Nebenwirkungen die Durchführung einer Monotherapie mit Blutspiegeln im therapeutischen Bereich für die besonders betroffene Altersgruppe prä- und postnatal zu empfehlen. Diese Empfehlung deckt sich mit der führender klinischer Epileptologen (Meador, 2002; Siemes und Bourgeois, 2001).

4.4. Strategien zur Neuroprotektion in Schadensmodellen des unreifen Gehirns

In der klinischen Praxis ist eine Neuroprotektion nach Hirntrauma auf eine Verhinderung der sekundären Schäden gerichtet. Im Falle einer Therapie mit Modulatoren verschiedener Neurotransmittersysteme als Anästhetikum, Sedativum oder Antiepileptikum ist die primäre Vermeidung von Nebenwirkungen auf das Zentralnervensystem das Ziel. Entsprechend unterschiedlich müssen die Ansatzpunkte des Eingreifens in die Schadenskaskade sein.

Um den klinischen Bezug zu wahren, können in tierexperimentellen Untersuchungen des Hirntraumas neuroprotektive Therapien erst nach dem Insult getestet werden. Mit dem Nachweis der intrinsischen und extrinsischen Aktivierung der Apoptose-Kaskade nach Hirntrauma besteht die Möglichkeit eines Eingreifens in diese Pathomechanismen mit dem Ziel einer Verringerung des Ausmaßes der

apoptotischen Neurodegeneration. Tatsächlich gelang in unseren Tierversuchen eine effektive Neuroprotektion durch die intrazerebroventrikuläre Injektion des Pancaspase-Inhibitors z-VAD-FMK in einem Zeitfenster von 2 bis 8 Stunden nach dem Trauma. Die Wirksamkeit von Caspase-Inhibitoren ist auch in anderen Schadensmodellen und vor allem im adulten Gehirn nachgewiesen worden. So konnte in Modellen der zerebralen Ischämie, einer Pneumokokkenmeningitis und im Trauma-Modell des adulten Gehirnes eine Neuroprotektion nach Caspase-Inhibition erreicht werden (Fink et al., 1998; Himi et al., 1998; Braun et al., 1999; Clark et al., 2000): In einem Ischämie-Modell des neonatalen Gehirns war der neuroprotektive Effekt des Pancaspase-Inhibitors BAF dagegen nicht nachweisbar (Joly et al., 2004). Im adulten Ischämie-Modell wurden auch funktionelle Untersuchungen nach einer Therapie mit dem Caspase-9-Inhibitor z-LEHD-FMK durchgeführt und eine Verbesserung des neurologischen Ausgangs nachgewiesen (Mouw et al., 2002). In neonatalen Schadensmodellen wurden bislang solche Untersuchungen nicht durchgeführt.

Das Wissen um die physiologische Bedeutung der Apoptose, vor allem im unreifen Gehirn, und ein Bericht über eine ungenügende Wirkung des Pancaspase-Inhibitors BAF im neonatalen Ischämie-Modell lassen jedoch auch Zweifel an der Wirksamkeit und therapeutischen Sicherheit des Einsatzes von Pancaspase-Inhibitoren, d.h. der Blockade sämtlicher Effektormoleküle der apoptotischen Kaskade, in der Humanmedizin zu. Von großem wissenschaftlichen Interesse ist deshalb eine Weiterentwicklung dieser Untersuchungen, die Testung systemisch anwendbarer Substanzen, die Entwicklung spezifischer Caspase-Inhibitoren, die gezielt im Schädigungsgebiet wirken und die Dokumentation der Langzeiteffekte.

Die Anwendung von GABA_A-Agonisten, Hemmern der glutamatergen Neurotransmission oder Natrium-Kanal-Blockern als Anästhetika, Sedativa und Antiepileptika in der vulnerablen Phase der Hirnentwicklung vom letzten

Schwangerschaftstrimenon bis in das dritte Lebensjahr ist nicht immer zu vermeiden.

Die Kenntnis um die Pathomechanismen der apoptotischen Neurodegeneration im unreifen Gehirn nach Gabe derartiger Medikamente, die negative Beeinflussung zelleigener Schutzmechanismen wie der Herunterregulation neurotropher Faktoren und die negative Wirkung auf Mitglieder Neurotrophin-abhängiger Signaltransduktions-Kaskaden sind Ansatzpunkte für den adjuvanten Einsatz neuroprotektiv wirksamer Substanzen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte die proapoptotische Wirkung des MK801, eines NMDA-Rezeptor-Blockers, zum Teil antagonisiert werden. In Neuronenkulturen, die zusätzlich zur MK801-Gabe auch mit dem Neurotrophin brain derived neurotrophic factor (BDNF) behandelt wurden, blieben die Neurone vital, während in den nur mit MK801 behandelten Kulturen dosisabhängig ca. 20-30% der Neurone abstarben. Eine neuroprotektive Wirkung der Neurotrophine ist auch im Ischämie-Modell des neonatalen Gehirns in vivo beschrieben worden (Han und Holtzman, 2000). Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in der Humanmedizin verfehlten Neurotrophine dagegen eine signifikante neuroprotektive Wirkung oder hatten Nebenwirkungen (Thoenen und Sendtner, 2002). Einem möglichen adjuvanten Einsatz im Rahmen einer Epilepsitherapie steht auch die Krampfschwelle-senkende Wirkung der Neurotrophine, speziell des BDNF, und damit eine Rolle in der Epileptogenese, entgegen (Binder et al., 2001).

Die Förderung intrazellulärer Schutzmechanismen durch Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden ist auch durch die Gabe von Östrogen möglich. Östrogen ist in der Lage, die gleichen Signalkaskaden zu aktivieren, wie die Neurotrophine; zudem ist es ein bereits etabliertes Medikament, das einfach zu applizieren ist. In unseren Schädigungsmodellen der MK801-Toxizität und der Neurodegeneration nach Gabe von Barbituraten und Phenytoin konnte ein neuroprotektiver Effekt des Östrogens nachgewiesen werden (Asimiadou et al.,

2005). Gerade Frühgeborene, die einen Mangel an mütterlichem Östrogen haben, müssen auf Grund von Krampfanfällen mit Antiepileptika behandelt werden und haben so ein hohes Risiko für neurotoxische Nebenwirkungen. Der Ersatz des fehlenden mütterlichen Östrogens kann für diese spezielle Patientengruppe eine vielversprechende adjuvante Therapie sein, die sich bei einer anderen Indikationsstellung bereits als sicher bewährt hat (Trotter und Pohlandt, 2000).

Eine ebenfalls etablierte Substanz mit neuroprotektiven Eigenschaften in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen ist Erythropoietin (Bernaudin et al., 1999; Weber et al., 2002). In einer klinischen Studie mit Schlaganfall-Patienten konnte der neurologische Ausgang nach Erythropoietin-Gaben verbessert werden (Ehrenreich et al., 2002). Auch in unserem Modell der Neurotoxizität nach NMDA-Rezeptor-Blockade konnte Erythropoietin die durch MK801 induzierte kortikale und thalamische Apoptose durch Wiederherstellung neurotrophin-assoziiertes Signalwege (PI3K-Signaltransduktionskaskade und Ras/ERK-(extracellular signal regulated kinase)-Protein-Kinase-Weg reduzieren (Dzietko et al., 2004).

Andere neuroprotektive Maßnahmen sind die strenge Indikationsstellung zur Anwendung der neurotoxischen Substanzen und, wenn möglich, die Verwendung von im Tierversuch nachgewiesenen weniger gefährlichen Substanzen in der vulnerablen Phase der Hirnentwicklung im letzten Schwangerschaftsdrittel bis etwa zum 2. Lebensjahr.