
Aus der Klinik für Neuropädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Neurotoxizität der Antiepileptika Levetiracetam und Sultiam
im unreifen Gehirn der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -

Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Manthey

aus Oranienburg

Gutachter: 1. PD Dr. med. Petra Bittigau
2. Prof. Dr. med. C. Bühler
3. Prof. Dr. med. B. Schmitt

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Epilepsien im Kindesalter	6
1.1.1. Definitionen und Epidemiologie	6
1.1.2. Einteilung	6
1.1.3. Ursachen	7
1.1.4. Auswirkungen von Krampfanfällen auf das sich entwickelnde Gehirn.....	7
1.1.5. Antiepileptische Pharmakotherapie im Kindesalter	8
1.2. Epilepsie und Schwangerschaft	9
1.2.1. Teratogenität von Antiepileptika.....	10
1.3. Theoretische Grundlagen dieser tierexperimentellen Arbeit	11
1.3.1. Die Phase des schnellen Hirnwachstums	11
1.3.2. Neuronale Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn der Ratte.....	12
1.3.3. Neurotoxizität durch die Beeinflussung von Neurotransmittersystemen.....	13
1.4. Sultiam	16
1.4.1. Anwendungsgebiete	16
1.4.2. Pharmakokinetik und Dosierung	17
1.4.3. Nebenwirkungen	17
1.4.4. Wirkmechanismus	17
1.4.5. Wirksamkeit in Tierversuchen	18
1.5. Levetiracetam	19
1.5.1. Anwendungsgebiete	19
1.5.2. Pharmakokinetik und Dosierung	21
1.5.3. Nebenwirkungen	22
1.5.4. Wirkmechanismus	22
1.5.5. Wirksamkeit von Levetiracetam im Tiermodell	25
1.5.6. Die Levetiracetam-Analoga Seletacetam (SEL) und Brivaracetam (BRV)	27
1.6. Zentrale Fragestellung der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1. Versuchstiere	29

2.2. Medikamente	29
2.3. Tierversuche	30
2.3.1. Dosisfindung	30
2.3.2. Altersabhängigkeitsstudie	30
2.3.3. Zeitabhängigkeitsstudie.....	30
2.3.4. Versuche im Pilocarpin-Krampfmodell	32
2.4. Perfusion, Präparation	33
2.4.1. Lösungen:	33
2.4.2. Durchführung	33
2.5. Einbettung der Präparate und Anfertigung der Hirnschnitte	34
2.6. Silberfärbung	35
2.6.1. Lösungen:	35
2.6.2. Durchführung	36
2.7. Paraffineinbettung und TUNEL-Färbung	37
2.8. Mikroskopische Auswertung	37
2.9. Statistische Auswertung	39
3. Ergebnisse	40
3.1. Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte - Dosisfindung	40
3.1.1. Sultiam	40
3.1.2. Levetiracetam	40
3.1.3. TUNEL-Färbung	44
3.2. Altersabhängigkeit des neurotoxischen Effekts	45
3.3. Zeitabhängigkeit der Neurotoxizität	46
3.4. LEV im Pilocarpin-Krampfmodell	47
4. Diskussion	48
4.1. Neurotoxizität im unreifen Gehirn der Ratte	48
4.1.1. Apoptose und Neurotrophine im unreifen Gehirn der Ratte	49
4.2. Sultiam	49
4.3. Levetiracetam	51

4.3.1.	Die neurotoxische Potenz von Levetiracetam bei bestehender Krampfaktivität ..	51
4.3.2.	Levetiracetam und Epilepsieprävention	54
4.4.	Vergleich des neurotoxischen Effektes von Sultiam und Levetiracetam mit dem anderer Antiepileptika	58
4.5.	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und klinische Relevanz.....	60
4.5.1.	Sultiam	60
4.5.2.	Levetiracetam	61
5.	<i>Zusammenfassung und Ziele</i>	63
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	65
7.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	74
8.	<i>Anhang</i>.....	75
8.1.	Lebenslauf	75
8.2.	Publikationen	75
8.3.	Danksagung.....	76
8.4.	Eidesstattliche Erklärung	76

1. Einleitung

1.1. Epilepsien im Kindesalter

1.1.1. Definitionen und Epidemiologie

Krampfanfälle zählen zu den häufigsten neuropädiatrischen Krankheitsbildern. Als Krampfanfall beschreibt man eine vorübergehende Veränderung des Bewusstseins, des Verhaltens, der motorischen Aktivität, von Empfindungen oder autonomen Funktionen als Folge einer paroxysmalen, exzessiven und hypersynchronen Entladung einer größeren Gruppe zerebraler Neurone [1]. Die Inzidenz für Krampfanfälle ist im ersten Lebensjahr am höchsten und sinkt mit steigendem Alter. 4 - 10% aller Kinder erleiden bis zum 16. Lebensjahr mindestens einen Krampfanfall. [2, 3]

Von Epilepsie, als chronisch neurologischer Erkrankung, spricht man erst dann, wenn ein Patient rezidivierend Krampfevents zeigt. Nur etwa ein Fünftel aller Kinder entwickelt nach einem ersten Krampfanfall eine Epilepsie. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt 0,04%, die Prävalenz liegt bei 0,5 – 1 %. Die Hälfte der Erkrankungen manifestiert sich vor dem 10. Lebensjahr [1, 3]. Der Status epilepticus ist definiert als Krampfanfall mit einer Anfallsdauer von mehr als 30 Minuten, bzw. Anfallsserien von gleicher Dauer, wobei zwischen den einzelnen Anfällen das Bewusstsein nicht wiedererlangt wird.

Abzugrenzen von der echten Epilepsie als chronischer Erkrankung sind Gelegenheitskrämpfe oder epileptische Reaktionen, d.h. Krampfanfälle im Rahmen akuter zerebraler oder extrazerebraler Erkrankungen wie Infektionen (Meningitis, Enzephalitis), Traumata, Stoffwechseldefekte oder Fieber. Die meisten Krampfanfälle im Kindesalter sind Gelegenheitsanfälle. Differentialdiagnostisch sind nicht-epileptische Anfälle auszuschließen, zu denen man Synkopen, psychogene Anfälle, Affektkrämpfe und den Pavor nocturnus zählt [3].

1.1.2. Einteilung

Grundsätzlich lassen sich epileptische Anfälle in fokale und generalisierte Anfällen unterteilen. Die häufigste generalisierte Anfallsform im Kindesalter ist der tonisch-klonische Grand-mal-Anfall. Das Erscheinungsmuster der vielfältigen Anfallsformen beschreibt verschiedene Epilepsiesyndrome. Zu diesen gehört als häufigste fokale Epilepsie die benigne Rolando-Epilepsie, welche bei Kindern gehäuft zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr auftritt. Neben vielen

anderen Erscheinungsformen zählen z.B. die Aufwach-Grand-mal-Epilepsie und die juvenile myoklonische Epilepsie zu den kindlichen Epilepsiesyndromen.

Eines der selteneren, jedoch nicht minder schwerwiegenden Syndrome ist das West-Syndrom, bei dem im Alter von 4 bis 18 Lebensmonaten die typischen BNS-Krämpfe auftreten. 95% der betroffenen Kinder sind geistig retardiert, die Mortalität liegt bei bis zu 20%. Auch das Lennox-Gastaut-Syndrom ist eine eher seltene Form der kindlichen Epilepsie. Mit einem Beginn im 3. bis 5. Lebensjahr und zeichnet es sich durch eine sehr hartnäckige Mischung verschiedenster Anfallsformen und häufig mentaler Retardierung aus. Beide Syndrome sind äußerst schwierig therapierbar und stellen in der Neuropädiatrie nach wie vor ein großes Problem dar [3, 4].

1.1.3. Ursachen

Die Entwicklung einer Epilepsie im Kindesalter ist meist multifaktoriell bedingt. Zur Manifestation kommt es durch das Zusammenwirken genetischer Disposition und exogener Risikofaktoren wie z.B. prä-, peri- oder postnatalen Hirnschäden, Phakomatosen, metabolischen Erkrankungen oder chromosomalen Aberrationen. In 60 – 70 % der Fälle von Epilepsie im Kindesalter findet sich jedoch keine eindeutige Ursache. Im Erwachsenenalter sind die häufigsten Ursachen neu auftretender epileptischer Anfälle Schädelhirntraumata, Infektionen, Drogen- oder Alkoholentzug, Hirntumoren sowie vaskuläre und degenerative Erkrankungen [4].

1.1.4. Auswirkungen von Krampfanfällen auf das sich entwickelnde Gehirn

Während eines Krampfanfalls kommt es zu einem erhöhten Sauerstoff- und Glucoseverbrauch sowie einer vermehrten CO₂- und Laktatproduktion im Hirngewebe. Systemische Auswirkungen wie Tachykardie, Hypertonie, Hyperglykämie oder Hypoxämie können sich auch bei nur kurzer Krampfdauer einstellen. Bei länger andauernden Anfallsgeschehen kann es zur Laktatazidose, Rhabdomyolyse, Hyperthermie, Hyperkaliämie und Hypoglykämie kommen.

Weiterhin ist bekannt, dass sowohl langanhaltende (z.B. Status epilepticus), als auch kurze, rezidivierende Krampfanfälle bei unzureichender oder gar ausbleibender Behandlung zu einem Verlust von Neuronen im Gehirn führen können [1, 5]. Als mögliche Folge können sich durch die Störung neuronaler Kreise und Netzwerke Beeinträchtigungen von Kognition und Verhalten herausbilden. So wurden in verschiedenen Studien am Menschen im Verlauf langjährig bestehender Epilepsien Gedächtnisdefizite, Verhaltensauffälligkeiten, Lernschwierigkeiten und eine Verminderung des IQ beschrieben [6-8]. Im Tiermodell zeigten sich Veränderungen kognitiver Leistungen bereits nach einzelnen kurzen Krampfanfällen [9, 10].

1.1.5. Antiepileptische Pharmakotherapie im Kindesalter

1.1.5.1. Antiepileptika

Um Folgeschäden einer unbehandelten Epilepsie zu verhindern, ist in den meisten Fällen eine medikamentöse Therapie erforderlich. Seit der Entwicklung erster antikonvulsiv wirksamer Medikamente sind mehr als 90 Jahre vergangen und viele der Medikamente haben sich über Jahrzehnte bewährt. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl neuer Wirkstoffe mit breiterem Wirkspektrum und verbesserter Verträglichkeit auf den Markt gebracht worden, die auch für schwierig behandelbare Anfallsformen und Epilepsiesyndrome neue Hoffnung versprechen [11]. Neben der Epilepsietherapie kommen Antiepileptika auch in angrenzenden Gebieten, z.B. zur Therapie von neuropathischen Schmerzen, Migräne, Myo- und Dystonien zum Einsatz [12].

Die bekanntesten Wirkmechanismen antikonvulsiver Medikamenten sind:

- Verhinderung repetitiver neuronaler Aktivität durch Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle,
- Verstärkung der GABA-vermittelten Inhibition z.B. durch Inhibition der GABA-Transaminase oder direkte Wirkung am GABA_A-Rezeptor sowie
- Blockade glutamaterger exzitatorischer Neurotransmission, z.B. am NMDA-Rezeptor.
- Antagonismus am AMPA-Rezeptor

Tabelle 1 zeigt die molekularen Angriffspunkte häufig verwendeter Antiepileptika [13].

1.1.5.2. Spezielle Probleme bei der Behandlung von Kindern

Die Anwendung antikonvulsiver Pharmaka, insbesondere solcher der neuen Generation in der Pädiatrie erfordert besondere Sorgfalt. Da häufig keine ausreichenden Studien und Erfahrungen über z.B. pharmakokinetische Besonderheiten oder potentielle schädigende Einflüsse auf den sich noch in der Entwicklung befindlichen Körper vorliegen, sind viele dieser Antiepileptika nur in beschränktem Ausmaß für den Einsatz im Kindesalter zugelassen. Demzufolge wird ein nicht unbeträchtlicher Anteil der antiepileptischen Therapien im Off-Label-Use durchgeführt, was nicht immer gefahrlos ist. So entdeckte man z.B. erst nach Jahrzehnten, dass Kinder, die im frühen Kindesalter längerfristig mit Barbituraten therapiert worden waren, kognitive Beeinträchtigungen bis ins Erwachsenenalter hinein erleiden konnten. Die bis dahin häufig praktizierte Fieberkrampfprophylaxe mit Phenobarbital wird unter anderem aufgrunddessen heute nicht mehr durchgeführt [14, 15].

	GABA-System	Glutamat-rezeptoren	Natrium-Kanäle	Kalzium - Kanäle	AMPA-Rezeptoren	Carbo-anhydrase
Ältere Medikamente						
Benzodiazepine	+					
Phenobarbital	+	+		+		
Valproat	+		+	+		
Phenytoin			+			
Carbamazepin			+			
Ethosuximid				+		
Sultiam			+*	+*		+
Neuere Medikamente						
Levetiracetam	?			+		
Seletracetam				+		
Brivaracetam			+			
Vigabatrin	+/-					
Topiramat	+	+	+	+	+	
Gabapentin	+			+		
Oxcarbazepin			+			
Lamotrigin			+	+		
Zonisamid			+	+		

Tabelle 1 : Molekulare Angriffspunkte einiger Antiepileptika (in Anlehnung an [13])

* indirekter Effekt über Hemmung der intrazellulären Carboanhydrase

1.2. Epilepsie und Schwangerschaft

Eine Epilepsie mit der Notwendigkeit einer Pharmakotherapie findet sich bei ca. 0,3 bis 0,6 % aller Schwangerschaften, wobei sich in dieser Konstellation eine Reihe von Problemen ergeben [16, 17]. In 15 – 37% der Schwangerschaften kommt es zu einem Anstieg der Anfallshäufigkeit [18], vermutlich bedingt durch eine veränderte Pharmakodynamik der antiepileptischen Pharmaka, zum Teil aber auch bedingt durch eine mangelnde Compliance. Aus Unsicherheit darüber, ob das Antiepileptikum schädlich für das ungeborene Kind sein könnte, verringern einige Patientinnen die Dosis eigenmächtig oder setzen das Medikament gar ab.

Man weiß jedoch, dass eine unbehandelte Epilepsie in der Schwangerschaft weit mehr Gefahren für das ungeborene Kind und die Mutter in sich birgt, als der Einsatz potentiell teratogener Antiepileptika. Es kann bei der Schwangeren zu unkontrollierbaren, generalisierten Anfällen bis hin zum Status epilepticus mit einer Mortalität von bis zu 48 % kommen [19]. Während eines

tonisch-klonischen Anfalls ist der Fetus durch Dezeleration der Herzfrequenz, periventriculäre Hämorrhagien, Frühgeburtlichkeit oder Abort akut gefährdet [17, 20, 21]. Bei häufigeren Anfällen während der Schwangerschaft offenbarten sich während der späteren Entwicklung des Kindes psychomotorische Retardierung und kognitive Dysfunktionen [22-25].

1.2.1. Teratogenität von Antiepileptika

Es ist bekannt, dass durch den Einsatz bestimmter Antiepileptika das Risiko kindlicher Fehlbildungen, intrauteriner Wachstumsretardierung und psychomotorischer Retardierung [25-28] ansteigt. Kindliche Fehlbildungen sind bei Müttern, die an einer Epilepsie leiden signifikant häufiger als bei Kindern von Müttern ohne Epilepsie [24]. Zugleich beobachtet man bei Kindern von Müttern, die eine antiepileptische Therapie erhalten haben höhere Missbildungsraten als bei jenen, deren Mütter nicht medikamentös behandelt wurden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Rate an Fehlbildungen vor allem durch die Antiepileptikatherapie, weniger durch die Epilepsie an sich beeinflusst wird [26, 29].

Die häufigsten teratogenen Effekte der Antiepileptika, bei Anwendung im ersten Trimester der Schwangerschaft, sind Fehlbildungen des Skelettes, des kardiovaskulären, urogenitalen und zentralnervösen Systems sowie Mikrozephalie und Neuralrohrdefekte, wobei letztere vor allem unter der Einnahme von Valproat oder Carbamazepin zu verzeichnen sind. Bei Anwendung in der späteren Schwangerschaft finden sich intrauteriner Minderwuchs, verminderter kindlicher Kopfumfang sowie im späteren Verlauf Entwicklungsverzögerung und psychomotorische Retardierung, um nur einige Beispiele zu nennen [25, 27, 30, 31]. Das höchste Risiko für die vermehrte Entwicklung kindlicher Fehlbildungen liegt vor beim Einsatz von Valproat, dem gleichzeitigen Einsatz mehrerer Antiepileptika (Polytherapie), hohen Medikamenten-Plasmaspiegeln oder Folsäuremangel [32]. Als Ursachen für die teratogenen Effekte postuliert man unter anderem eine Beeinflussung des Folsäuremetabolismus mit konsekutivem Folsäuremangel, Hypoxie oder Azidose. Weiterhin sind Antiepileptika in der Lage, hormonale Systeme zu beeinflussen, woraus verminderte Spiegel von T4, GH und Kortisol, sprich Hormonen, welche für die regelrechte Entwicklung u.a. des Gehirns essentiell sind, resultieren [24, 30, 33-38]. Die durch Antiepileptika getriggerte apoptotische Neurodegeneration, auf die im Folgenden noch näher eingegangen werden soll, scheint dabei ebenfalls eine bedeutsame Rollen zu spielen [39].

1.3. Theoretische Grundlagen dieser tierexperimentellen Arbeit

1.3.1. Die Phase des schnellen Hirnwachstums

Trägt man während der Entwicklung eines Säugetiers das Gewicht seines Gehirns gegen die Zeit auf, so fällt auf, dass das Gehirn nicht mit konstanter Geschwindigkeit an Masse zunimmt, sondern in einem bestimmten Zeitraum der Entwicklung besonders schnell wächst. Diesen Zeitraum nannten Dobbing und Sands die „Phase des rapiden Hirnwachstums“ („brain growth spurt“) [40]. Während dieser Phase finden entscheidende Differenzierungsvorgänge, wie die Synaptogenese, Migrations- und Selektionsprozesse statt. Unter anderem wird von den initial in der Überzahl angelegten Neuronen mittels physiologischer Apoptose eine Vielzahl wieder eliminiert. Dieser gegenüber äußeren Einflüssen sehr anfällige Prozess, macht die Phase des schnellen Hirnwachstums zu einer sehr vulnerablen Periode in der Entwicklung des Gehirns [41]. Anzumerken ist, dass sich die verschiedenen funktionellen Systeme des Gehirns nicht synchron entwickeln, sondern jedes seinen eigenen „growth spurt“ aufweist. Daraus resultiert ein unterschiedliches Verteilungsmuster der physiologischen Apoptoserate zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung sowie auch eine entsprechend zeitversetzte Vulnerabilität. Je nach dem Zeitpunkt, zu dem ein potentiell neurotoxisches Agens auf den Entwicklungsprozess einwirkt, zeigen sich Schädigungen verschiedener funktioneller Regionen [42, 43].

Bei verschiedenen Spezies vollzieht sich die Phase des schnellen Hirnwachstums zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung. Beim Menschen beginnt der „brain growth spurt“ bereits pränatal mit dem Beginn des 3. Trimesters der Gestation und endet erst mehrere Jahre nach der Geburt. Das Maximum der Hirnwachstumsgeschwindigkeit findet sich um die Geburt. Bei der Ratte, dem Modelltier dieser Arbeit, vollzieht sich diese Phase postnatal, sie dauert die ersten 14 Lebenstage an, das schnellste Hirnwachstum wird vom 6. bis zum 10. Lebenstag verzeichnet [44]. Die Spezies Ratte eignet sich deshalb gut zur tierexperimentellen Untersuchung von Mechanismen, die beim Menschen sowohl prä- als auch postnatal stattfinden, bei der Ratte aber ausschließlich postnatal und es ist so möglich, Ratte und Mensch hinsichtlich ihrer Hirnentwicklung und Empfindlichkeit gegenüber neurotoxischen Einflüssen zu vergleichen.

1.3.2. Neuronale Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn der Ratte

Im sich entwickelnden Gehirn können grundsätzlich zwei Mechanismen unterschieden werden, die im Tod einer Zelle oder Zellpopulation resultieren.

1.3.2.1. Exzitotoxizität

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat hat in seiner Wirkung am NMDA-Rezeptor neben der Vermittlung von Erregungsimpulsen auch trophische Funktionen in der Hirnentwicklung. Es vermittelt die Proliferation und Migration neuronaler Vorläuferzellen und beeinflusst die synaptische Plastizität [45, 46].

Bei exzessiver Erregung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat, wie es z.B. pharmakologisch, bei Hypoxie oder einem Trauma geschehen kann, kommt es zu akuten neuronalen Zelluntergängen, einem Prozess, der als exzitotoxischer Zelltod bezeichnet wird.

In den ersten zwei Wochen des postnatalen Lebens der Ratte, also der Phase des „brain growth spurt“, verändert sich die Verteilung und Sensitivität der NMDA-Rezeptoren im Gehirn. Eine Überaktivierung der Rezeptoren kann in dieser Periode sehr viel leichter in einer exzitotoxischen Reaktion resultieren. So wurde bei Ratten, denen am 7. Lebenstag NMDA injiziert wurde, eine um mehr als 20-fach höhere Rate an Exzitotoxizität beobachtet, als es bei erwachsenen Tieren der Fall war [47, 48]. Weiterhin zeigten jüngere Tiere andere Verteilungsmuster der exzitotoxischen Zelluntergänge als ältere Tiere, was sich auf die zeitlich versetzte Entwicklung der entsprechenden Regionen zurückführen lässt [49].

1.3.2.2. Apoptose

Kerr et al. [50] beschrieben 1972 erstmalig eine programmierte und regulierte Form des Zelluntergangs mit charakteristischen morphologischen Zeichen und nannten diesen „Apoptose“ (griech.: Abfallen, Abtropfen). Die Apoptose, auch physiologischer Zelltod genannt, ist in der Entwicklung des zentralen Nervensystems ein normaler und essentieller Vorgang, der enorm wichtig für das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellverlust ist.

Eine Störung dieses empfindlichen physiologischen Prozesses, z. B. durch genetische oder äußere Einflüsse kann in Störungen der normalen neurologischen Entwicklung resultieren. Während eine Überaktivierung des NMDA-Rezeptors während der vulnerablen Phase der Hirnentwicklung zum exzitotoxischen Zelltod führt, kommt es bei einer Blockade des selben

Rezeptortyps zu apoptotischen neuronalen Zelluntergängen [42]. Das Ausmaß der physiologischen Apoptose kann dabei deutlich überschritten werden.

1.3.2.3. Ultrastrukturelle Merkmale des apoptotischen Zelluntergangs

Neuronen, die infolge apoptotischer Vorgänge untergehen, zeigen ein charakteristisches Muster an ultrastrukturellen Veränderungen. In der frühen Phase des Zelluntergangs ist im Zellkern die Bildung runder Chromatinmassen und flockiger Verdichtungen zu beobachten, während die Kernmembran und die Zellorganellen zunächst intakt bleiben. Folgend kommt es zur fortschreitenden Fragmentation der Kernmembran, Mischung von nukleoplasmatischen und zytoplasmatischen Inhalten, stufenweiser Veränderung der zytoplasmatischen Organellen sowie einer zunehmenden Kondensation der ganzen Zelle. In den späten Phasen lassen sich die sogenannten „apoptotic bodies“ beobachten, welche aus verklumptem nuklearen Chromatin und Zytoplasma, umgeben von einer Membran bestehen und aus der Zelle in das Neuropil ausgestoßen werden [51, 52].

1.3.3. Neurotoxizität durch die Beeinflussung von Neurotransmittersystemen

Während der Phase der Synaptogenese löst die vorübergehende Interferenz mit bestimmten Neurotransmittersystemen eine apoptotische Neurodegeneration von Millionen von Neuronen aus, die ohne jene Interferenz nicht dem physiologische Zelltod unterlegen gewesen wären [53]. So triggert die Blockade des NMDA-Subtyps des Glutamat-Rezeptors durch (+)MK801 oder Ketamin, während nur einiger Stunden der vulnerablen Entwicklungsphase, massive neuronale apoptotische Zelluntergänge im sich entwickelnden Gehirn der Ratte [42]. Ähnliche Effekte konnten für Agonisten am GABA_A-Rezeptor bzw. Substanzen, die die Wirkung von GABA an seinem Rezeptor verstärken, wie z.B. Benzodiazepine und Barbiturate, beobachtet werden. Die provozierten neurotoxischen Effekte waren in ihrem Ausmaß dosis- und altersabhängig. Bei 0-3 Tage alten Ratten fand sich eine mäßig hohe Apoptoserate, im Alter von 7 Tagen, dem Höhepunkt des „brain growth spurt“ der Ratte, zeigte sich die höchste Vulnerabilität gegenüber NMDA-Antagonisten oder GABA_A-Agonisten, während bei 21 Tage alten Tieren sowohl eine physiologische als auch pathologische Apoptose kaum mehr zu verzeichnen war [42]. Das Alter der Tiere bestimmte auch das Verteilungsmuster sowohl der physiologischen, als auch der pathologischen Neurodegeneration. Je nach Alter des Tieres waren andere Regionen betroffen, nämlich jeweils jene, die sich gerade in der Phase „brain growth spurt“ befanden. Bei beiden

Substanzklassen waren die beobachteten Zelluntergänge ultrastrukturell mit den Kriterien der Apoptose vereinbar.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird vermutet, dass während der Phase des rapiden Hirnwachstums die Stimulation des NMDA-Rezeptors durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat für das neuronale Überleben während der Entwicklung essentiell ist bzw. die exzessive Suppression neuronaler Aktivität während der Synaptogenese automatisch ein internes Signal für die apoptotische Zerstörung der Zelle aktiviert [42, 54].

1.3.3.2. Antiepileptika und apoptotische Neurodegeneration

Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden in den letzten Jahren die gebräuchlichsten Antiepileptika, von denen einige als Antagonisten am NMDA-Rezeptor, bzw. als Agonisten am GABA_A-Rezeptor wirken, auf ihre mögliche proapoptotische Wirkung hin untersucht.

Bei intraperitonealer Verabreichung von Diazepam, Phenytoin, Phenobarbital, Pentobarbital, Clonazepam, Valproat und Vigabatrin zeigte sich im unreifen Gehirn der Ratte deutliche, dosisabhängige neurodegenerative Erscheinungen [55]. Nach einer einzigen Behandlung mit Phenobarbital, Phenytoin oder Valproat zeigten die Tiere zudem eine signifikante Reduktion des Hirngewichts [39]. Somit sind nicht nur GABA_A-Agonisten und NMDA-Antagonisten, sondern auch Natrium-Kanal-Blocker (Valproat und Phenytoin) in der Lage, neurotoxische Reaktionen auslösen. Durch die Kombination mehrerer Antiepileptika wurden deutlich schwerere Schädigungsmuster verursacht als es durch die Gabe des einzelnen Medikamentes der Fall war.

Auch in diesen Versuchsreihen waren die Ergebnisse altersabhängig, die höchste Neurotoxizität war während der Phase des schnellsten Hirnwachstums, zu verzeichnen. Die Dosierungen und Plasmaspiegel, die ausreichten, um eine Schädigung auszulösen, lagen im antikonvulsiv wirksamen Bereich der Spezies Ratte oder sogar darunter [39]. Die degenerierten Zellen erfüllten bei elektronenmikroskopischer Untersuchung die Kriterien des apoptotischen Zelluntergangs.

Die durch Antiepileptika ausgelöste apoptotische Neurodegeneration während der vulnerablen Entwicklungsphase des Gehirns könnte somit, zumindest teilweise, für die o.g. verminderten Kopfumfänge und verminderten intellektuellen Leistungen der ihnen während ihrer intrauterinen Entwicklung ausgesetzten Kinder verantwortlich gemacht werden [55].

1.3.3.3. *Apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn durch weitere Substanzen*

Auch Anästhetika wie NO, Propofol, Isofluran, Ketamin und Halothan, Substanzen, die nicht selten in der Schwangerschaft oder im Kindesalter zur Anwendung kommen, waren im Tierexperiment in der Lage, deutliche neurodegenerative Veränderungen auszulösen und folgend Lern- und Gedächtnis-Defizite bei den betroffenen Tieren zu provozieren [43, 56].

Weiterhin zeigte Ethanol, bereits nach einmaliger Applikation, einen neurotoxischen Effekt beeindruckenden Ausmaßes. Seine Wirkung sowohl am NMDA-Rezeptor, als auch am GABA_A-Rezeptor resultierte in Tierversuchen in einem Verteilungsmuster des Zelluntergangs, welches der imaginären Projektion des Schädigungsmusters von GABA_A-Agonisten und jenem der NMDA-Antagonisten übereinander entspricht. Die beim fetalen Alkoholsyndrom auftretende reduzierte Hirnmasse und die lebenslangen psychischen Störungen, von Lernschwierigkeiten über ADHS, bis hin zu mentaler Retardierung und Psychosen, könnten unter anderem auf diesen Schädigungsmechanismus zurückzuführen sein [57].

1.4. Sultiam

Sultiam (SUL) ist ein Antiepileptikum, welches bereits seit den frühen 60er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts Anwendung in der Therapie der Epilepsien findet. Chemisch handelt es sich um 4-(Tetrahydro-2H-1,2-thiazin-2-yl)-benzolsulfonamid-s,s-dioxid, ein Sulfonamid-Derivat.

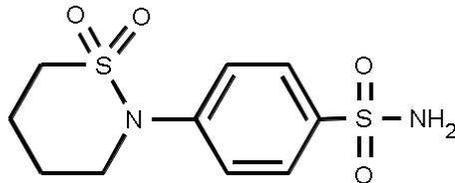


Abbildung 1: Sultiam – Strukturformel [58]

1.4.1. Anwendungsgebiete

Unter dem Handelsnamen Ospolot® (DESITIN Pharma, Hamburg) ist es zugelassen als Alternativmedikament zur Therapie der Rolando-Epilepsie, einer idiopathischen, benignen, fokalen Epilepsieform, die vorwiegend zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr auftritt [59-61].

Gute Erfolge mit SUL finden sich weiterhin in der Therapie anderer, atypischer Formen benigner fokaler Epilepsien [62-64], der myoklonischen Epilepsie des Kindes- und Jugendalters [65] und des ESES-Syndroms [66, 67]. SUL wird in diesen Indikationen sowohl als Monotherapeutikum als auch als Add-on-Medikament eingesetzt. In Einzelfallberichten ließ sich bei bislang therapierefraktären Epilepsien mit Sultiam eine Senkung der Anfallsfrequenz und eine Besserung des EEG-Befundes herbeiführen [68]. Bei Epilepsien, die im Rahmen eines Rett-Syndroms auftreten, war SUL nur etwas weniger effektiv als Carbamazepin und kann daher hier als eine gute Alternative angesehen werden [69].

Bei der nach wie vor sehr schwierigen Behandlung des West-Syndroms, einer Erkrankung, die sich vorwiegend im frühen Kindesalter und somit während der vulnerablen Entwicklungsphase des Gehirns findet, zeigten sich in jüngerer Zeit mit SUL gute Therapieerfolge, die durchaus vergleichbar mit denen anderer Antiepileptika (z.B. Vigabatrin), Kortikosteroiden oder ACTH waren [70, 71].

1.4.2. Pharmakokinetik und Dosierung

Sultiam weist bei oraler Applikation eine schnelle Resorption auf, maximale Plasmakonzentrationen werden nach 1 bis 5 h gemessen. Im Plasma ist der Wirkstoff zu 29% an Proteine gebunden. Die Elimination erfolgt zu 80-90% renal und zu 10-20% biliär [59, 72].

Unter der Therapie mit SUL kann sich die Plasmakonzentration von Phenytoin und Lamotrigin erhöhen, während die gleichzeitige Anwendung von Carbamazepin und SUL verminderte Plasmakonzentrationen von SUL bewirken kann. Die gleichzeitige Einnahme mit Primidon kann die Nebenwirkungen von SUL verstärken, ebenso können Nebenwirkungen, die durch die Hemmung der Carboanhydrase entstehen, so z.B. Urolithiasis, metabolische Azidose oder Veränderung der Serumelektrolytwerte, durch gleichzeitige Einnahme anderer Carboanhydrase-Inhibitoren wie Topiramate und Acetazolamid verstärkt auftreten [59, 73, 74].

Nach einer, über eine Woche verlaufenden Aufdosierung beträgt die Erhaltungsdosis von SUL, je nach Verträglichkeit, 5-10 mg/kg pro Tag. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit wird die Tagesdosis auf drei Einzeldosen verteilt [59].

1.4.3. Nebenwirkungen

Verglichen mit anderen gängigen, antiepileptisch wirksamen Pharmaka weist Sultiam eine relativ gute Verträglichkeit auf. Alle Nebenwirkungen sind dosisabhängig und bei Dosisreduktion reversibel. Häufig traten Parästhesien, Tachypnoe, Schwindel, Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen und Doppelbilder auf. Gelegentlich wurden Halluzinationen, myasthenische Erscheinungen oder eine Anfallshäufung beschrieben [59, 75]. Unter der Einnahme von SUL kann es zur Toleranzentwicklung kommen, wobei sich nach einer Periode der Anfallsfreiheit die EEG-Befunde verschlechterten oder es erneut zu Anfällen kommt [61].

1.4.4. Wirkmechanismus

Sultiam ist ein membrangängiger Carboanhydrase-Hemmer. Die Inhibition dieses Enzyms bewirkt eine milde intrazelluläre Azidose. Leniger et al. konnten in vitro eine durch diesen Mechanismus ausgelöste Reduktion epileptiformer Aktivität zentraler Neuronen des Meerschweinchens belegen [76]. Ein weiterer Erklärungsansatz für die antikonvulsive Wirkung von SUL basiert auf der Hemmung der Carboanhydrase-Typ-II in Gliazellen. Die resultierende extrazelluläre Azidose behindert spannungsgesteuerte Calciumkanäle und NMDA-Rezeptor-gesteuerte Ionenströme ins Zellinnere und somit die exzitatorische Funktion der Zellen [77, 78].

Madeja et al. wiesen 2001 nach, dass SUL auch in der Lage ist, spannungsgesteuerte Natriumströme in Hippocampus-Neuronen des Meerschweinchens zu blockieren und somit die Entladungsfrequenz der Neurone zu senken [79]. Patsalos et al. beschrieben nach längerer Anwendung von SUL Konzentrationsänderungen der Neurotransmitter Glutamat und GABA zugunsten des inhibitorischen GABA-Systems im Hirngewebe von Ratten [80].

Kürzlich zeigten Siniatchkin et al. mittels transkranieller Magnetstimulation (TMS) des primären motorischen Kortex, dass eine einzelne Dosis SUL in der Lage war, einen signifikanten Anstieg der motorischen Ruhe-Schwellenintensität, also der Schwellenintensität, die mittels TMS nötig ist, um eine bestimmte motorische Antwort zu provozieren, zu erzeugen. Diese ist direkt abhängig von der axonalen Erregbarkeit kortikaler Neurone [81]. Andere Messparameter der Motorkortex-Erregbarkeit wurden nicht durch SUL beeinflusst. Der selektive Anstieg der motorischen Schwellenintensität ist ein typisches Merkmal für Antiepileptika, die über eine Blockade von Natrium-Kanälen wirken, so z.B. Carbamazepin oder Phenytoin [82, 83].

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der antikonvulsive Effekt von SUL auf folgendem Mechanismus beruht: die Hemmung der Carboanhydrase resultiert in einer intrazellulären Verminderung des pH-Wertes, welcher einen inhibitorischen Effekt auf Natrium- und Calcium-Ionenkanäle ausübt. Transmembranäre Ionenströme werden vermindert und die Bildung von Aktionspotentialen erschwert. Die somit reduzierte Aktionspotentialfrequenz verhindert die repetitive Entladung der Neuronen, wie sie bei epileptischen Anfällen beobachtet wird.

1.4.5. Wirksamkeit in Tierversuchen

Sowohl im Elektrokrampf test, als auch im Pentylen tetrazol-(PTZ)-Krampf test bei Ratten und Mäusen konnte die antikonvulsive Wirksamkeit von SUL nachgewiesen werden [59, 84].

Song et al. Zeigten anhand von Krämpfen, die durch Amygdala-Kindling ausgelöst wurden, dass SUL in Dosierungen von 25-200 mg/kg die Dauer klonischer Vorderbeinkrämpfe reduzieren, jedoch nur in der höchsten Dosierung die sekundären Krampf generalisierung beeinflussen konnte [85].

In Embryotoxizitätsstudien an Ratten wurden in der niedrigsten untersuchten Dosis von 30 mg/kg embryotoxische Effekte festgestellt. Deshalb und da bisher keine systematischen Studien über eventuelle Folgen beim Menschen vorliegen, darf das Medikament in der Schwangerschaft und Stillzeit nicht angewendet werden [59].

1.5. Levetiracetam

Mit Levetiracetam (LEV) (UCB S.A.) wurde im November 1999 unter dem Handelsnamen Keppra® ein vielversprechendes neues Antiepileptikum auf den Markt gebracht.

Chemisch handelt es sich um (S)-alpha-Ethyl-2-Oxopyrrolidin-Azetamid, ein Pyrrolidonderivat und Abkömmling des Nootropikums Piracetam, einer Substanz, die schon in der Vergangenheit zur Behandlung myoklonischer Epilepsien eingesetzt wurde [86, 87].

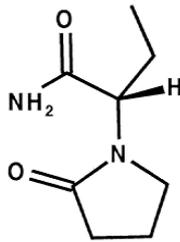


Abbildung 2: Levetiracetam – Strukturformel

1.5.1. Anwendungsgebiete

Zunächst war LEV in der Zulassung limitiert auf die Zusatzbehandlung partieller Krampfanfälle bei Patienten ab dem 16. Lebensjahr. Seit dem Jahr 2004 ist es für die Zusatzbehandlung fokaler Anfälle mit oder ohne sekundäre Generalisierung für Patienten ab dem 4. Lebensjahr sowie der juvenilen myoklonischen Epilepsie bei Erwachsenen und Jugendlichen ab dem 12. LJ zugelassen. Als Monotherapie partieller Anfälle mit und ohne Generalisierung darf LEV bei Patienten ab 16 Jahren mit neu diagnostizierter Erkrankung angewendet werden [88].

Für den Einsatz im Erwachsenenalter konnten zahlreiche klinische Studien die Effektivität von LEV sowohl als Add-on-Medikament als auch in Monotherapie belegen [89-93]. Sowohl einfach- als auch komplex-fokale Anfälle und solche mit sekundärer Generalisierung sprachen gut auf die LEV-Therapie an [94]. Desweiteren gibt es Erfolge mit dem Einsatz von LEV in der Behandlung anderer neurologischer Krankheitsbilder wie der Chorea Huntington, Dystonien, Spätdyskinesien unter Neuroleptikatherapie, der Migräneprophylaxe und essentiellen Tremor [95-98] sowie psychiatrischen Erkrankungen wie Sozialphobien, Panikstörungen und bipolaren Störungen [99-102].

1.5.1.1. Einsatz im Kindesalter

In der Pädiatrie wird LEV meist als Add-on-Medikament, jedoch zunehmend häufiger auch als Monotherapeutikum bei der Behandlung vorwiegend fokaler Epilepsien eingesetzt. Es zeigt bei guter Verträglichkeit auch bei zuvor pharmakoresistenten Epilepsien vielversprechende Resultate [103-111]. Auch in der Therapie der generalisierten Anfällen, atonischen Anfällen, juvenilen myoklonischen Epilepsien [112, 113], generalisierten Epilepsien mit Photosensitivität [114], Aufwach-Grand-Mal-Epilepsien, Rolando-Epilepsien [115], dem Status epilepticus [116-119] und selbst den äußerst schwierig behandelbaren Epilepsie-Syndromen, wie dem Landau-Kleffner-, dem Lennox-Gastaut- oder dem West-Syndrom kann LEV eine wertvolle Ergänzung oder Alternative zu anderen Antiepileptika sein [120-124].

Selbst bei nichtepileptischen neurologischen Krankheitsbildern wie der Migräne und dem Tourette-Syndrom [125-127] sind Behandlungserfolge mit LEV zu verzeichnen.

Die wenigen kontrollierten klinischen Studien an Kindern unter 4 Jahren mit refraktären Epilepsien zeigten ein gutes Ansprechen und eine gute Verträglichkeit und befürworten damit einen Einsatz der Substanz auch im frühen Kindesalter [128-130]. Bezüglich der Anwendung von LEV im Neugeborenenalter liegen mehrere Fallberichte über eine gute Wirksamkeit bei Phenobarbital-resistenten Krampfanfällen, jedoch nur sehr wenige größere klinische Studien vor. [131-133].

1.5.1.2. Levetiracetam in der Schwangerschaft

Tierexperimentelle Studien an Ratten, Kaninchen und Hunden haben bei Anwendung von LEV in der Schwangerschaft reproduktionstoxische Wirkungen wie Skelettanomalien, verzögertes Wachstum und erhöhte Sterblichkeit der Jungtiere gezeigt, die Anwendung in der Schwangerschaft und Stillzeit wird daher nicht empfohlen [88]. Daten aus menschlichen Schwangerschaften sind zum aktuellen Zeitpunkt noch rar.

Die LEV-Clearance nimmt im 3. Trimenon der Schwangerschaft zu, so dass es zu niedrigeren Plasmakonzentrationen kommt, die eine eventuelle Dosisanpassung erfordern könnten. Vermutlich passiert das Medikament die Plazentaschranke und erscheint auch in der Muttermilch. Die Plasmakonzentration des Pharmakons bei gestillten Kindern beträgt in etwa 13% des Spiegels der Mutter, entsprechend einer durchschnittlichen täglichen Dosis von 2,4 mg/kg/d [134].

Hunt et al. und ten Berg et al. werteten insgesamt 128 Schwangerschaften aus, wovon ca. 2/3 der Frauen LEV als Zusatztherapeutikum neben anderen Antiepileptika (u.a. Carbamazepin,

Lamotrigin, Topiramate, Valproat) einnahmen und die anderen Frauen LEV als Monotherapie erhielten. Unter o.g. Polytherapie traten Krankheitsbilder wie Pylorusstenose, Spina bifida und kleinere Malformationen sowie verminderte Geburtsgewichte häufiger auf. Das Auftreten dieser Auffälligkeiten ist jedoch auch bei alleiniger Anwendung von Carbamazepin oder Valproat in der Schwangerschaft bekannt. Unter Monotherapie mit LEV zeigten sich keine Fehlbildungen, die Geburtsgewichte der Kinder waren normal. Das reproduktionstoxische Potential von LEV scheint, soweit sich das aus der geringen Fallzahl ableiten lässt, gering zu sein. Um das Medikament bedenkenlos für die Anwendung in der Schwangerschaft freizugeben, bedarf es allerdings größerer Fallzahlen und weitergehender Studien [135].

1.5.2. Pharmakokinetik und Dosierung

LEV ist als orale und als intravenöse Darreichungsform erhältlich und weist eine sehr vorteilhafte Pharmakokinetik auf. Es ist auch nach oraler Verabreichung zu nahezu 100% bioverfügbar, maximale Plasmaspiegel werden nach ca. einer Stunde erreicht [136, 137]. Der Wirkstoff wird nur geringfügig metabolisiert, der Hauptmetabolit UCB L057 ist pharmakologisch inaktiv. Die Elimination erfolgt zu 2/3 renal und zu 1/3 hepatisch, so dass bei Niereninsuffizienz eine Dosisanpassung notwendig werden kann. Bei Patienten mit schweren Leberfunktionsstörungen sollte die Nierenfunktion vor Festlegung der Dosis überprüft werden [88, 138]. Wegen fehlender Induktion von Cytochrom-P450 oder anderen Leberenzymen sowie der geringen Plasmaeiweißbindung zeigt LEV keine Wechselwirkungen mit anderen Antiepileptika, Digoxin, Warfarin, Probenecid oder oralen Kontrazeptiva.

Pharmakokinetische Studien an Kindern zeigten, dass die Clearance bei Kindern um 30 - 40% höher ist als bei Erwachsenen. Aufgrund dessen wurde für Kinder eine LEV-Dosierung, die 130 bis 140% der Erwachsenenendosis entspricht vorgeschlagen [139]. Erwachsene und Kinder mit einem Körpergewicht über 50 kg erhalten initial mit zweimal täglich 500mg, wenn nötig kann die Dosis langsam auf zweimal täglich 1500 mg gesteigert werden. Im Kindesalter erfolgt die Dosierung mit initial 10 mg/kg KG bis maximal 30 mg/kg KG zweimal täglich [88].

Zur Anwendung von LEV in der Neonatalperiode wurden einige Untersuchungen bezüglich der Pharmakokinetik angestrebt. Beachtenswert sind hier ein erhöhtes relatives Verteilungsvolumen und eine verzögerte renale Ausscheidung der Substanz. Die Dosierungsempfehlungen für LEV in dieser Altersgruppe beruhen momentan ausschließlich auf Erfahrungswerten [134, 140, 141].

1.5.3. Nebenwirkungen

Nebenwirkungen traten in randomisierten klinischen Studien insgesamt selten und in milder Form auf. Häufig beschrieben wurden Somnolenz, Asthenie, Benommenheit, Kopfschmerzen, und Schwindel. Auch psychische Symptome wie Agitation, Insomnie, Feindseligkeit, Depression und Verhaltensauffälligkeiten traten auf und waren im Kindesalter, insbesondere bei schon vorbestehenden Verhaltensauffälligkeiten, etwas häufiger zu beobachten als bei Erwachsenen. Die Mehrzahl der beobachteten Nebenwirkungen nahmen im Therapieverlauf ab oder waren bei Dosisverminderung reversibel [130, 142-144]. Auch die intravenöse Applikation scheint nach ersten Ergebnissen problemlos und gut verträglich [145].

Wird das Medikament jedoch zu schnell aufdosiert, kann dies zu einer Anfallshäufung oder gar zum Status epilepticus führen [146].

1.5.4. Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von LEV ist bislang nicht vollständig geklärt. Die bisher bekannten Wirkprinzipien antiepileptischer Pharmaka scheinen bei diesem Pharmakon nicht zum Tragen kommen, denn eine Bindung an neurotransmissive Rezeptoren, wie GABA- oder Glutamatrezeptoren, Effekte auf Natrium- oder T-Typ-Calciumkanäle [147], auf die GABA-Transaminase, die Glutamatdecarboxylase, auf Second-messenger-Systeme oder Proteinkinasen konnten nicht nachgewiesen werden [146].

Im Folgenden werden einige Erklärungsansätze, zum Wirkmechanismus von LEV erläutert:

- So wurde beispielsweise über die Reduktion spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Ströme durch Blockierung v. N-Typ-Calciumkanälen [148-150] und die Beeinflussung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle berichtet [151].
- Rigo et al. konnten zeigen, dass LEV in der Lage ist, die inhibitorischen Wirkung von GABA- und Glyzin an ihren Rezeptoren durch Außerkraftsetzen negativer allosterischer Modulatoren, wie Zink und β -Carbolinen, zu verstärken [152]. Dass LEV seine antikonvulsive Wirkung über eine Beeinflussung des GABAergen System ausübt, wird jedoch kontrovers diskutiert [153-156].
- In in-vitro-Experimenten hatte LEV nach einmaliger kurzer Einwirkung auf Neuronen keinen Effekt auf den Neurotransmitterausstoß an Nervenendigungen. Nach länger, mindestens 3h andauernder Einwirkzeit jedoch kam es zu einer Verminderung des präsynaptischen Transmitterausstoßes. Vermutlich benötigt das hydrophile Medikament diese Zeit, um die

lipophile neuronale Membran zu passieren und an seine intrazellulären Zielstrukturen zu binden [157].

- Carunchio et al. berichteten über eine Modulation des AMPA-Rezeptors durch LEV in in-vitro-Experimenten, mit folgender signifikanter Reduktion von AMPA- oder Kainat-induzierten Ionenströmen [158].
- Nagarkatti et al. lieferten im Jahr 2007 Ergebnisse, die den Einfluss von LEV auf zwei wichtige Systeme der Calcium-induzierten-Calcium-Freisetzung, nämlich den IP3-Rezeptor und den Ryanodin-Rezeptor belegen [159]. Diese beiden Second-messenger-Systeme spielen eine wichtige Rolle bei der Calcium-Homöostase innerhalb neuronaler Zellen und sind an der Genese epileptischer Aktivität beteiligt. Die genaue Bedeutung der genannten Mechanismen für die antikonvulsive Wirksamkeit von LEV ist jedoch bislang unklar.
- Eine Arbeit von Lee et al. [160] beschreibt als möglichen antikonvulsiven Mechanismus die Beeinflussung von ROMK1-Kanälen durch LEV. Diese Kalium-Kanäle sind essentiell für die Regulation des Ruhemembranpotentials in neuronalen Zellen. Die Aktivierung von ROMK1 führt zu einer verstärkten Hyperpolarisierung der Zellmembran und dadurch zu einer erhöhten Aktionspotential-Schwelle in Hippocampus-Zellen, welche für die Kontrolle der Anfallsgeneration zuständig sind. LEV erhöht die Aktivität der ROMK1-Kanäle dosisabhängig, pH-unabhängig und vermutlich über eine Proteinkinase-A-induzierte Konformationsänderung (Phosphorylierung) des ROMK1-Kanals.
- Durch Lynch et al. wurde 2004 erstmals das synaptische Vesikelprotein SV2A als spezifische Bindungsstelle für LEV im Gehirn der Ratte identifiziert, welches vermutlich eine entscheidende Rolle für den Wirkmechanismus von LEV spielt [161].

1.5.4.1. Das SV2A- (Synaptic Vesicle 2A) Protein

SV2 Proteine sind im ZNS weitverbreitete Proteinbestandteile von Membranen synaptischer Bläschen, die in 2 Hauptisoformen (SV2A, SV2B) und einer Nebenisoform (SV2C) exprimiert werden. SV2A ist ein 90 kD großes Protein, welches strukturell verwandt mit transmembranären Transportproteinen ist, jedoch selbst keine Transportaktivität besitzt. Man vermutet, dass es ein Modulator der präsynaptischen Vesikelfunktion ist [162] und z.B. an der Regulation der SNARE- (Soluble NSF-attachment-sensitive receptor) -Komplexe, einer Gruppe von Membranproteinen, die die Vesikelfusion mit der präsynaptischen Membran und somit der Exozytose von Neurotransmittern vermitteln, beteiligt ist [163].

In elektrophysiologischen Aufnahmen von Kulturen hippocampaler Neurone, zeigten Zellen, denen beide SV2-Isoformen fehlten, einen anhaltenden Anstieg der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmission nach Triggerung mit mehreren aufeinander folgenden Aktionspotentialen. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass es in Abwesenheit des SV2-Proteins, während fortlaufender Aktionspotentiale zu einer präsynaptischen Akkumulation von Calcium kommt, die zu einem abnormen Anstieg des Neurotransmitteraustosses und somit zur Destabilisierung synaptischer Kreise und Induktion epileptischer Aktivität führt [164].

Die Interpretation, dass SV2A die Mechanismen der Krampfentstehung und -ausbreitung beeinflussen kann, wird durch die Beobachtungen von Crowder et al. [165] und Janz et al. [164] unterstützt, welche phänotypisch eine starke Krampfneigung bei SV2A- und SV2A/SV2B-knockout-Mäusen beschrieben, während SV2B-knockout-Mäuse phänotypisch normal sind.

Es existiert zudem eine starke Korrelation zwischen der Bindungsaffinität von LEV an SV2A und der antikonvulsiven Wirksamkeit, eine Tatsache, die die Annahme nahe legt, dass LEV seine antiepileptische Wirkung durch Modulation dieses Moleküls entfaltet [161, 166].

Die Tatsache, dass SV2A-knockout-Mäuse Krampfanfälle entwickeln, während LEV diese unterdrückt, weist darauf hin, dass LEV nicht als simpler Antagonist des SV2A fungiert, denn dies würde in einer Verstärkung der Krampfneigung resultieren. Viel mehr versteht man es als allosterisch verstärkenden Modulator dieses Proteins, welches abnorme neuronale Erregungskreise zu unterbinden vermag [161].

Der Mechanismus, durch den die Bindung von LEV an das SV2A in einer antikonvulsiven Aktivität resultiert, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Rolle der SV2-Proteine als Regulatoren der zuvor beschriebenen SNARE-Komplexe ist jedoch ein richtungsweisender Ansatz [160].

LEV beeinflusst weder die Elektrophysiologie noch den Neurotransmitterausstoß von normalem Gehirngewebe oder Neuronen. Es wurde spekuliert, dass LEV die Funktion von SV2A nur unter pathophysiologischen Bedingungen moduliert und so die Mechanismen der Anfallsgenerierung und -ausbreitung beeinflusst, ohne die physiologische Neurotransmission im Gehirn zu alterieren. Dies konnte auch in Experimenten von Yang et al. demonstriert werden, in welchen LEV während schneller Stimulationsserien, die einer epileptischen Aktivität entsprachen, einen stärkeren Einfluss auf die synaptische Antwort von Neuronen erzeugte, als während niederfrequenterer Stimulationsraten [157, 161, 166-169]. Die selektive Bindung des Medikaments an SV2A, welches vornehmlich im Hirngewebe vorkommt, könnte zudem ursächlich für das schmale Nebenwirkungsspektrum des Medikaments sein.

1.5.5. Wirksamkeit von Levetiracetam im Tiermodell

In den verschiedenen Tierkrampfmodellen zeigte LEV ein außergewöhnliches Aktivitätsprofil. So hatte das Medikament keinen Einfluss auf Krampfanfälle, die auf sogenannten akuten oder reaktiven Krampfmodellen, wie dem Maximal-Elektroschock-Krampf-Modell (MES-Modell) oder dem Pentylentetrazol-Modell (PTZ-Modell) beruhen. In verschiedenen maximal-chemokonvulsiven Krampfversuchen (u.a. mit Bicucullin, Picrotoxin, DMCM, Koffein) an Ratten hatte LEV ebenfalls keinen antikonvulsiven Effekt, mit der Ausnahme eines potenten Schutzes gegen Pilocarpin- und Kainat-induzierte sekundär-generalisierte fokale Anfälle. Hingegen zeigte es einen schützenden Effekt in chronischen Epilepsie-Modellen wie z.B. dem elektrisch induzierten kornealen oder audiogenen Kindling bei Mäusen, dem Amygdala-Kindling bei Ratten oder dem Kindling mittels PTZ. LEV schützte ebenso gegen spontane Spike-and-Wave-Entladungen im GAERS-Modell, einem genetischen Epilepsie-Modell und war effektiv bei der Behandlung von Absencen und tonischen Krämpfen bei „spontan epileptischen Ratten“ [170-175]. Mit diesem Wirkungsprofil unterscheidet sich LEV deutlich von herkömmlichen Antiepileptika, die in den akuten und chronischen Modellen meist äquipotente Eigenschaften aufweisen [170].

In den oben genannten Kindling-Modellen stellte sich neben der guten, dosisabhängig antikonvulsiven Wirkung heraus, dass die vorhergehende Behandlung mit LEV den Kindlingprozess verzögern konnte, bzw. dass die provozierten Anfälle von kürzerer Dauer und schwächerer Intensität waren. Diese Ergebnisse regten Diskussionen über eine mögliche antiepileptogene Wirkung von LEV an, was bedeutet, dass das Medikament in der Lage ist, nicht nur die schon bestehende Epilepsie symptomatisch zu behandeln, sondern schon deren Entwicklung, z.B. nach einem für das Gehirn traumatischen Ereignis, zu beeinflussen [170, 176].

Zusätzlich zu seinen guten Wirkeigenschaften, zeichnet sich LEV durch ein hervorragendes Sicherheitsprofil aus. In verschiedenen Tierversuchen konnten toxische Effekte erst bei einem Vielfachen der antikonvulsiv wirksamen Dosis nachgewiesen werden. Dosierungen bis 5000 mg/kg KG waren nicht tödlich für Ratten und Mäuse. Hinweise auf eine Kanzerogenität oder Mutagenität waren nicht nachweisbar [170].

Die ED50 wurde in den verschiedenen Studien an Ratten zwischen 1,4 und – 36 mg/kg angegeben [170-174, 176-178]. **Tabelle 2** zeigt eine Übersicht über die Wirksamkeit von LEV in verschiedenen Tiermodellen.

Bezeichnung des Tiermodells	Spezies (M -Maus, R - Ratte)	Art des Krampfmodells	Wirksamkeit von LEV	ED50* bzw. Dosisspanne in mg/kg	Quelle
Pentylentetrazol-Modell (PTZ)	R	akut	nein	>540*	[170]
Maximal-Elektroschock-Modell (MES)	R	akut	nein	>540*	[170]
maximal-chemokonvulsive Modelle	R	akut / chronisch (je nach Phase)	nein (Ausnahme: Pilocarpin, Kainat)	>540* (Pilocarpin: 17; Kainat: 54*)	[170]
Korneales Elektroschock- Kindling	M	chronisch	ja	7*	[170]
Amygdala-Kindling	R	chronisch	ja	13 - 108	[171, 177]
GAERS-Modell	R	chronisch / genetisch	ja	5,4 - 170	[173, 179]
audiogene Anfälle	M, R	chronisch / genetisch	ja	5,4 - 96	[173, 175]
PTZ-Kindling	M, R	chronisch	ja	36*	[170]

Tabelle 2: Übersicht über die Wirksamkeit von LEV in verschiedenen Tiermodellen

1.5.6. Die Levetiracetam-Analoga Seletracetam (SEL) und Brivaracetam (BRV)

Durch Substitution der Position 4 des 2-Pyrrolidonringes von LEV wurden mit Seletracetam und Brivaracetam zwei Nachfolgesubstanzen entwickelt die eine im Vergleich zu LEV zehnfach höhere Bindungsaffinität zu SV2A haben [180, 181]. Diese stärkere Bindungsaffinität korreliert mit einer stärkeren antikonvulsiven Potenz, womit die Annahme einer funktionellen Beziehung zwischen der Bindung an das SV2A-Protein und der antikonvulsiven Aktivität der Medikamente bekräftigt wird.

SEL zeigt neben der Bindung an SV2A eine Wirkung auf hochspannungs-aktivierte T-Typ-Calciumkanäle. Es hat in Tiermodellen erworbener oder genetischer Epilepsieformen (Kindling, GAERS-Modell) eine mitunter mehr als zehnfach höhere antikonvulsive Potenz als LEV, eine hohe Tolerabilität und verglichen mit LEV einen höheren protektiven Index¹. Erste klinische Studien am Menschen weisen auf ein potentes, breit wirksames und auch in hohen Dosierungen gut verträgliches Medikament für die Epilepsietherapie hin [180].

Brivaracetam weist neben einer im Vergleich zu LEV zehnfach stärkeren Bindungsaffinität zu SV2A zusätzlich einen natriumkanalblockenden Effekt auf. Durch diesen zusätzlichen Wirkmechanismus ist BRV auch in akuten Krampf-Tiermodellen wirksam und hat somit im Vergleich zu LEV ein breiteres Spektrum. In Placebo-kontrollierten Studien am Menschen war BRV in der Lage, bei photosensitiven Patienten die paroxysmale, pathologische EEG-Antwort zu vermindern. Trotz geringer akuter Toxizität hatte BRV einen niedrigeren protektiven Index und zeigte etwas mehr chronische Nebenwirkungen als SEL und LEV.

¹ Der protektive Index beschreibt den Quotienten aus der ED50 für die antikonvulsive Wirksamkeit und der TD50 für unerwünschte Effekte nach Applikation des Pharmakons

1.6. Zentrale Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der Tatsache, dass zahlreiche bekannte Antiepileptika in der Lage sind, während der Phase des schnellen Hirnwachstums im unreifen Gehirn der Ratte eine apoptotische Neurodegeneration zu provozieren, erschien es interessant, die beiden Medikamente Sultiam und Levetiracetam hinsichtlich ihrer Neurotoxizität auf das sich entwickelnde Gehirn zu untersuchen.

Sultiam ist ein seit langem in der Neuropädiatrie gebräuchliches Medikament. Unter anderem aufgrund des zunehmenden Einsatzes beim West-Syndrom, einer Epilepsieform, die vorwiegend im ersten Lebensjahr auftritt, sollte nun der mögliche neurodegenerative Effekt des Medikaments während der Phase des rapiden Hirnwachstums untersucht werden.

Levetiracetam ist ein Antiepileptikum der neuen Generation. Aufbauend auf dem bekannten Zusammenhang zwischen Wirkmechanismus und Neurotoxizität der meistverwendeten Antiepileptika, wie Phenytoin, Phenobarbital, Diazepam, Vigabatrin und Valproat, erhofften wir uns, in LEV, welches keinen der üblichen Wirkmechanismen aufweist, ein Medikament zu finden, das keine Neurotoxizität im sich entwickelnden Gehirn provoziert. Damit wäre, zusätzlich zu den anderen vielversprechenden Eigenschaften hinsichtlich Wirksamkeit und Verträglichkeit, ein weiteres Argument vorhanden, um den breiteren Einsatz von LEV in der Pädiatrie, vor allem im frühen Kindesalter und auch in der Schwangerschaft zu befürworten.

Wir untersuchten histologisch das Ausmaß der apoptotischen Neurodegeneration in den Gehirnen junger Ratten nach intraperitonealer Applikation verschiedener Dosierungen des jeweiligen Medikamentes. Zusätzlich wurde die Neurotoxizität zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung (0-21 d), sowie die Zeitabhängigkeit dieses Effektes (6 – 48 h nach Applikation des Medikaments) bestimmt.

Wir verglichen weiterhin die Ausprägung der neurotoxischen Potenz der beiden Medikamente mit der anderer Antiepileptika.

Nach Vorliegen erster Ergebnisse wurden noch Untersuchungen mit LEV im Pilocarpin-Krampfmodell angeschlossen, um zu untersuchen, ob das Pharmakon in den untersuchten Dosierungen im Pilocarpin-Modell bei jungen Ratten antikonvulsiv wirksam ist und ob die Gabe von LEV unter Krampfaktivität zu einer Induktion von apoptotischen Zelluntergängen führen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 0 bis 21 Tage alte Han-Wistar-Ratten, geliefert vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV), durchgeführt. Zur Untersuchung beider Medikamente wurden insgesamt 295 Tiere verwendet, die artgerecht in pathogenfreien Räumen gehalten und versorgt wurden. Ein Tag-Nacht-Rhythmus war gewährleistet, die Tiere wurden täglich kontrolliert.

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz Berlin genehmigt und in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der Society for Neuroscience durchgeführt.

Um eventuelle konstitutionelle Unterschiede der Tiere bzgl. der Reaktion auf das Medikament möglichst vergleichbar zu halten, wurde für den jeweiligen Versuch jeweils ein kompletter Wurf verwendet. Pro Wurf wurden jeweils 3-4 Kontrolltiere mitgeführt, die anderen Tiere wurden den Medikamentengruppen zugeordnet. Jegliche Zuordnung erfolgte zufällig.

Um die Ernährung zu gewährleisten und eine Auskühlung zu verhindern, blieben die Tiere nach der Geburt und im Zeitraum zwischen Medikamentengabe und Perfusion bei der Mutter, bzw. wurden während der Versuche mittels einer Wärmedecke vor Auskühlung geschützt.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungs-Gesellschaft (IK2/2-2) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (01GZ0305) unterstützt.

2.2. Medikamente

Untersucht wurden die Antiepileptika Sultiam (Ospolot®, Desitin, 50mg Tabletten) sowie Levetiracetam (Keppra®, UCB S.A., 250mg Tabletten).

Die zu untersuchenden Medikamente lagen in Tablettenform vor und mussten zunächst im Mörser pulverisiert und anschließend in Suspension gebracht werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Pharmaka in Natriumchloridlösung, bzw. Aqua inj. benutzten wir als Lösungsmittel eine 5%ige Cremophorlösung (Cremophor EL, Sigma). Sämtliche weiteren Verdünnungen erfolgten mit sterilem Natriumchlorid (NaCl, 0,9%, Braun).

2.3. Tierversuche

2.3.1. Dosisfindung

In Anlehnung an die in vorangegangenen Tierversuchen antikonvulsiv wirksamen Dosierungen wurden folgende Dosierungen der Medikamente untersucht:

- LEV: 5, 10, 25, 50 und 100 mg/kg KG,
- SUL: 25, 50, 100, 150, 200 und 300 mg/kg KG (jeweils n = 6-7).

Am Versuchstag wurden die Versuchstiere zunächst nummeriert und gewogen. Sie erhielten dann 0,1 ml pro 10g KG einer Suspension des jeweiligen Medikamentes bzw. die Kontrolltiere eine entsprechende Menge der 5%igen Cremophorlösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach ca. 10-minütiger Beobachtung eventueller Sofortreaktionen wurden sie für 24h zur Mutter zurückgegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den Tieren eine Überdosis (150 mg/kg) einer 10 %igen Chloralhydrat-Lösung (Fluka) gespritzt, was unmittelbar zur Sedierung und folgend zum Tod der Tiere führte.

2.3.2. Altersabhängigkeitsstudie

Zur genaueren Untersuchung der Effekte der Medikamente zu verschiedenen Zeitpunkten der Hirnentwicklung wurde den Tieren das zu untersuchende Medikament im Alter P0 (Tag der Geburt), P3 (3. Lebenstag), P7, P14 oder P21 (jeweils n = 6-7) injiziert. Der Zeitraum zwischen Injektion des Medikaments und Tötung der Tiere zur Aufarbeitung ihrer Hirne betrug jeweils 24 Stunden.

2.3.3. Zeitabhängigkeitsstudie

Um nachzuweisen, zu welchem Zeitpunkt nach der Verabreichung des Pharmakons sich ein eventueller neurotoxischer Effekt am deutlichsten zeigt, führten wir zusätzlich eine Zeitabhängigkeitsstudie durch. Die Injektion des Medikamentes erfolgte am 7. Lebenstag, die die Tiere wurden dann 6, 12, 24, 36 oder 48 Stunden post injectionem getötet und die Gehirne zur weiteren Untersuchung aufbereitet (jeweils n = 6-7)

Tabelle 3 zeigt einer Übersicht über die durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit.

Dosis [mg/kg]	Überlebenszeit [h]	Alter [d]	Versuchstiere (n)	Kontrollen (n)	Färbemethode
Dosisfindung SUL					
25	24	7	6	11	DeOlmos
50			6		
100			7		
150			6		
200			13		
300			6		
Altersabhängigkeitsstudie SUL					
200	24	0	6	2	TUNEL
		3	6	3	
		7	3	1	DeOlmos
		14	6	2	
		21	6	3	
Zeitabhängigkeitsstudie SUL					
200	6	7	5	4	DeOlmos
	12		7	3	
	24		13	2	
	36		6	2	
	48		6	4	
Dosisfindung LEV					
5	24	7	6	11	DeOlmos
10			6		
25			6		
50			7		
100			9		
100			4	TUNEL	
Altersabhängigkeitsstudie LEV					
100	24	0	6	2	TUNEL
		3	6	3	
		7	3	1	DeOlmos
		14	6	2	
		21	6	3	
Zeitabhängigkeitsstudie LEV					
100	6	7	6	2	DeOlmos
	12		6	3	
	24		5	2	
	36		6	2	
	48		6	2	

Tabelle 3 - Versuchsplan der vorliegenden Arbeit

2.3.4. Versuche im Pilocarpin-Krampfmodell

Um zu untersuchen, ob LEV in der getesteten Dosierung im Pilocarpin-Krampfmodell antikonvulsiv wirksam ist, ob diese Dosierung also im therapeutisch wirksamen Bereich liegt, und ob die Gabe von LEV unter Krampfaktivität bei jungen Ratten zu einer Induktion von apoptotischen Zelluntergängen führen kann, wurden nach Vorliegen der Ergebnisse der LEV-Studie noch Versuche im Pilocarpin-Krampfmodell angeschlossen.

Die Versuchstiere (P7) erhielten nach einer vorbereitenden Gabe von N-Methyl-Scopolamin (1mg/kg KG in NaCl 0,9%) zur Verhinderung peripherer Nebenwirkungen des Pilocarpins, 100mg/kg Pilocarpin i.p., um Krampfäquivalente auszulösen. Einem Teil dieser Tiere wurde nach 20 Minuten zusätzlich LEV in einer Dosierung von 50 mg/kg injiziert. Die Kontrolltiere erhielten nur 50mg/kg LEV bzw. Placebo. Die Tiere wurden nun für 5 Stunden beobachtet und Krampfdauer sowie Verhalten wurden protokolliert. Der Zustand der Tiere wurde hierbei unterteilt in „krampfend“, „hyperexzitabel“ und „ruhig“. Nach 24 Stunden wurden die Tiere wie oben beschrieben getötet und perfundiert, die Gehirne nach dem De-Olmos-Protokoll gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. **Tabelle 4** zeigt eine Übersicht über diese Versuche.

Therapie	Levetiracetam	Pilocarpin	Pilocarpin + Levetiracetam
Dosis [mg/kg]	50	100	100 / 50
Alter [d]	7	7	7
Überlebenszeit [h]	24	24	24
Versuchstiere	5	7	7
Kontrollen	4		

Tabelle 4 - Versuche im Pilocarpin-Krampfmodell

2.4. Perfusion, Präparation

2.4.1. Lösungen:

PBS (Phosphate Buffered Saline)

10fach Konzentrat:	70 ml	1M Na-Phosphat – monobasisch*
	330 ml	1M Na-Phosphat – dibasisch*
	180 g	NaCl*,
	ad 2 l	Aqua bidest.
	pH 7,4	

Zum Gebrauch als 0,1M PBS wurde das Konzentrat 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und für die Perfusion der Tiere mit 100 I.E./100 ml Heparin (Trombophob®) versetzt.

Paraformaldehyd-Lösung:

10%ige Stammlösung:	1 l	Aqua bidest. – 60°C,
	3 Plätzchen	NaOH *
	100 g	Paraformaldehyd *
	pH 7,4 - 8,4	

<u>4%-ige Lösung:</u>	400 ml	Stammlösung,
	17 g	NaCl, *
	2 g	Cacodylat (Sigma),
	ad 2 l	Aqua bidest.,
	pH 7,4	

* Chemikalien der Firma Merck

2.4.2. Durchführung

Nach sicherer Sedierung mit Chloralhydrat und Fixierung des Versuchstieres auf dem Arbeitstisch, erfolgte die Eröffnung des Thorax. Rippen und Zwerchfell wurden scharf durchtrennt, die Freipräparation des noch schlagenden Herzens erfolgte stumpf. Nach einem Schnitt in den rechten Vorhof und einem weiteren in die Spitze der linken Kammer, wurde eine Butterfly-Kanüle über die linke Herzkammer in die Aorta ascendens vorgeschoben. Über diese Kanüle wurde das Tier zunächst mit 20 ml heparinisiertem 0,1M PBS blutleer gespült und dann zur Einleitung der Fixation mit 20ml einer eiskalten 4%igen Paraformaldehydlösung im Bolus perfundiert. Es folgte eine 10- (bei älteren Tieren 15-) minütige Tropfinfusion mit 4%iger Paraformaldehydlösung.

Der Erfolg der Perfusion wurde an der sichtbaren Blutleere des Tieres, dem Anschwellen der Leber, sowie der Rigidität des gesamten Tieres aufgrund des sofortigen Fixationseffektes des Paraformaldehydes gemessen.

Nach Abschluss der Perfusion und Entfernung der Kanüle, wurde der Kopf des Tieres abgetrennt, die Kalotte eröffnet, das Gehirn aus dem Schädel herauspräpariert und sofort für mindestens 2 Tage in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C gelagert. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurden nach Ablauf dieser 2 Tage Frontal- und Riechhirn, sowie Cerebellum entfernt und verworfen, das restliche Gehirn koronar in 2 Hälften geteilt und weitere 2-3 Tage in Paraformaldehyd gelagert.

Protokolliert wurden das Gewicht des Versuchstieres am Tag der Injektion und am Tag der Perfusion, Zeitpunkt der Injektion, Zeitpunkt und Qualität der Perfusion sowie das Gewicht des herauspräparierten Gehirns.

2.5. Einbettung der Präparate und Anfertigung der Hirnschnitte

Zur Anfertigung der Hirnschnitte erfolgte die Einbettung der Hirne in Agar. Hierzu wurden die Gehirnhälften zunächst mit PBS-Azid gespült und auf Papier von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Petrischalen, mit den Nummern der Tiere beschriftet, wurden auf einem Kühlakku platziert. Die Präparate wurden in die Petrischalen gelegt und mit handwarmem, flüssigem Agar (20g Agar-Puder in 500ml Aqua bidest.) übergossen. Nach Erstarren des Agars wurden die eingebetteten Hirnteile in ca. 1x1 cm großen Blöcke aus dem Agar herausgeschnitten und zur Lagerung in PBS-Azid (50 mg NaN_3 / 100 ml PBS) überführt. Der Zusatz von Natriumazid zum PBS verhinderte bei längerer Lagerung der Präparate ein Wachstum von Mikroorganismen.

Mit einem Vibratom (Leica VT 100S, Leica Microsystems Nussloch GmbH) wurden nun 70µm dicke Koronarschnitte der fixierten Gehirne angefertigt. Jeder 5. bis 7. vollständige Schnitt wurde für die Färbung in 24-Well-Platten (Gewebekultur-Platten, Falcon), befüllt mit 4%igem Paraformaldehyd, gelagert, während alle anderen Schnitte für eventuell erforderliche Nachfärbungen in PBS-Azid aufbewahrt wurden.

Nachdem die in Schnitte noch einmal mindestens 4 Tage bei 4°C in Paraformaldehyd nachfixiert wurden, erfolgte die Silberfärbung nach dem De-Olmos-Protokoll.

2.6. Silberfärbung

Die fixierten Schnitte wurden nach dem De-Olmos-Protokoll [182, 183] gefärbt. Es handelt sich hierbei um eine Silberfärbung, bei der sich degenerierende Neurone und Axone anfärben und dunkelbraun bis schwarz vom goldgelben Hintergrund abheben. Die Färbung beruht auf der Reaktion des Axoplasmas degenerierender Axonen mit einem Silbersalz, welches durch die durchlässig gewordene Zellmembran der geschädigten Neurone in die Zelle eindringen kann. Diese Färbemethode trifft keine Aussage über den Pathomechanismus, der zur Zelldegeneration führte, sie zeigt nur, dass Zellen zugrunde gegangen sind und ist demnach nicht spezifisch für Apoptose. Aufgrund der kostengünstigen und einfach durchführbaren Methode ist diese Färbung bei größeren Fallzahlen jedoch gut als Screeningmethode geeignet, um das Ausmaß einer Zelldegeneration zu bestimmen.

2.6.1. Lösungen:

1. Silber-Kupfer-Lösung:	180 ml	Aqua bidest. (40°C),	
	1,5 g	Silbernitrat	(AgNO ₃ , Roth)
	3 ml	0,5% Kupfernitratlösung	(CuNO ₃ , Sigma)
	15 ml	Allantoin 0,1%	(Sigma)
	9 ml	Borate Buffer	
		(0,02M Borsäure, 0,05M Natriumtetraborat)	
		17 ml	Ethanol absolut
2. Silber-Diammin:	9 ml	Pyridin	(Sigma)
	120 ml	Aqua bidest.	
	24 g	Silbernitrat	
3. Reduktionslösung:	60 ml	0,4% NaOH	
	30 ml	NH ₄ OH	(Sigma)
	135 ml	Aqua bidest.	
	15 ml	Ethanol absolut	
4. Bleichlösung:	180 µl	37% Paraformaldehyd	
	10,5 mg	Citric Acid	(Sigma)
	150 ml	Aqua bidest.	
5. Stabilisierlösung:	0,45 g	K ₃ Fe(CN) ₆	(Sigma)
	200 ml	Aqua bidest.	
6. Gelatine-Medium:	0,2 g	Na ₂ S ₂ O ₃	(Sigma)
	250 ml	Aqua bidest. (50°C)	
	1,5 g	Gelatine	
	0,15 g	Kalium-Chrom-Sulfat	
	ad 500 ml	Aqua bidest.	

2.6.2. Durchführung

Für den Erfolg der Färbung war es wichtig, dass alle mit den Lösungen in Kontakt kommenden Geräte frei von Anionen sind. Deshalb wurden alle verwendeten Glasgeräte vor Beginn der Färbung für 15 Minuten in Salpetersäure (65%, rauchend, Merck) gelegt und anschließend mit Aqua bidest. gründlich gespült. Alle verwendeten Lösungen wurden stets frisch und ausschließlich mit Aqua bidest. hergestellt.

Nach der Überführung aller Schnitte eines Tieres von den 24-Well-Platten in jeweils eine entsprechend nummerierte Petrischale, wurden diese zunächst dreimal mit Aqua bidest. gewaschen. Alle weiteren Färbeschritte erfolgten in den Petrischalen bei frei flottierenden Schnitten. Die Flüssigkeiten wurden mit Glaspipetten abgezogen und gemäß den entsprechend Vorschriften entsorgt.

1. Zunächst wurden die Schnitte mit der Silber-Kupfer-Lösung für 1h bei 40°C, dann für 48 – 72 h bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der lichtempfindlichen Silberlösungen erfolgte die Herstellung dieser unter Vermeidung von direktem Lichteinfall und die Inkubationen bei vollständiger Dunkelheit. Nach der Inkubation wurden die Schnitte für 3 Minuten mit frischem Aceton gewaschen und dann mit Silber-Diammin-Lösung für 35 Minuten inkubiert.
2. Darauffolgend wurden die Präparate eine Minute in Reduktionslösung geschwenkt und danach zweimal mit Aqua bidest. gewaschen.
3. Die Schnitte waren jetzt sehr dunkel und die apoptotischen Zellen hoben sich schlecht vom ebenfalls dunklen Hintergrund ab. Deshalb wurden die Schnitte 2-10 Minuten in Kalium-Ferricyanid-Lösung gebleicht und anschließend zweimal mit Aqua bidest. gewaschen.
4. Zum Erhalt der Färbung bei Lagerungen auch über längere Zeit, wurden die gefärbten Schnitte mit Natrium-Thiosulfat-Lösung für exakt 1 Minute stabilisiert. Es folgten 3 abschließende Waschgänge mit Aqua bidest.

Nach Abschluss der Färbung brachten wir die goldgelb gefärbten Schnitte mittels eines Gelatine-Mediums auf Objektträger auf, welche anschließend für 24 h luftgetrocknet wurden.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe (40-100%) und abschließend Xylol wurden die Präparate entwässert und mit Permount-Medium (Fisher Scientific) und Deckgläsern gedeckt.

2.7. Paraffineinbettung und TUNEL-Färbung

Da aufgrund der geringen Größe der Hirne der P0- und P3-Tiere die Einbettung dieser in Agar und das Schneiden am Vibratom zu schlechten Ergebnissen führt, wurde zur Darstellung der apoptotischen Neurone hier die TUNEL-Färbung eingesetzt. Diese von Gavrieli [184] beschriebene Färbemethode bedient sich der Tatsache, dass es im Verlauf von apoptotischen Zelluntergängen zu einer DNA-Fragmentation durch Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen kommt. Hierbei entstehen charakteristische 180-200 bp große Fragmente mit freiliegenden 3'OH-Enden, welche mittels der TUNEL-Färbung dargestellt werden können.

Für die TUNEL-Färbung wurden die herauspräparierten Gehirne nach der 3-tägigen Fixation in 4%iger Paraformaldehydlösung zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 360, MICROM Laborgeräte GmbH) wurden nun Schnitte mit einer Dicke von 10 μm angefertigt und sofort auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilane beschichtete Objektträger (Superfrost®Plus, R. Langenbrinck, Emmerdingen) aufgebracht.

Die für die Färbung benutzten Reaktionslösungen waren Bestandteil eines kommerziellen Sets (Apop-Tag-Kit Cat # S 7100 Kit, Komponenten 1-6, Oncor Appligene, Heidelberg).

Nach proteolytischer Behandlung der zuvor entparaffinisierten Schnitte wurde eine Terminale-Desoxynucleotid-Transferase (TdT) aufgebracht, die spezifisch an die 3'OH-Enden der entstandenen DNA-Fragmente bindet und diese mit biotinylierten Desoxyuridin-Polymeren markiert. Durch den Einsatz einer Avidin-konjugierten Peroxidase wurden die DNA-Fragmente mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht.

Alle Zellkerne, in denen eine DNA-Fragmentation stattgefunden hatte, wurden braun angefärbt, eine Gegenfärbung des Hintergrundes mit Methylgrün ermöglichte den besseren Kontrast.

2.8. Mikroskopische Auswertung

Die angefertigten Präparate wurden lichtmikroskopisch ausgewertet (Mikroskop BX 60 F-3, Olympus). Zur Quantifizierung der apoptotischen Zellen bedienten wir uns einer stereologischen Methode nach Gundersen [185], die es erlaubte, durch gemittelte wiederholte Zählungen die Dichte der apoptotischen Zellen in verschiedenen Arealen des Rattengehirns zu berechnen. Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte in 400facher Vergrößerung und ohne Kenntnis der Zuordnung der Präparate zu den jeweiligen Versuchsgruppen. Die entsprechenden Hirnregionen wurden anhand von Atlanten identifiziert [186, 187]. **Abbildung 3** zeigt schematisch die Lage der ausgezählten Hirnregionen.

Mit dem im Okular sichtbaren Zählraster (0,025 x 0,025mm) wurden auf 2 verschiedenen Hirnschnitten eines Tieres zufällig je vier verschiedene Abschnitte in der auszuwertenden Region aufgesucht und die degenerierten Zellen ausgezählt. Aus diesen 8 Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet. Unter Berücksichtigung der Vergrößerung, der Schnittdicke (70µm bei silbergefärbten Schnitten, 10µm bei TUNEL-gefärbten Schnitten) und der Fläche des Zählraster wurde nun die Dichte der apoptotischen Zellen pro mm³ ermittelt. Um mit den Vorergebnissen der Arbeitsgruppe vergleichbare Zahlen zu erhalten wurde am Ende durch Addition der Dichtewerte aller 17 Regionen ein Neurodegenerations-Score errechnet.

Schnitte des vorderen Hirnteils

Cortex cinguli (Laminae 2 et 4),
Cortex frontalis (Laminae 2 et 4),
Nucleus caudatus,
Septum,

Schnitte des hinteren Hirnteils

Cortex retrosplenialis (Laminae 2 et 4),
Cortex parietalis (Laminae 2 et 4),
Nucleus thalami mediodorsalis,
Nucleus thalami laterodorsalis,
Nucleus thalami ventralis,
Hypothalamus,
Subiculum,
Hippocampus: CA1 und Gyrus dentatus.

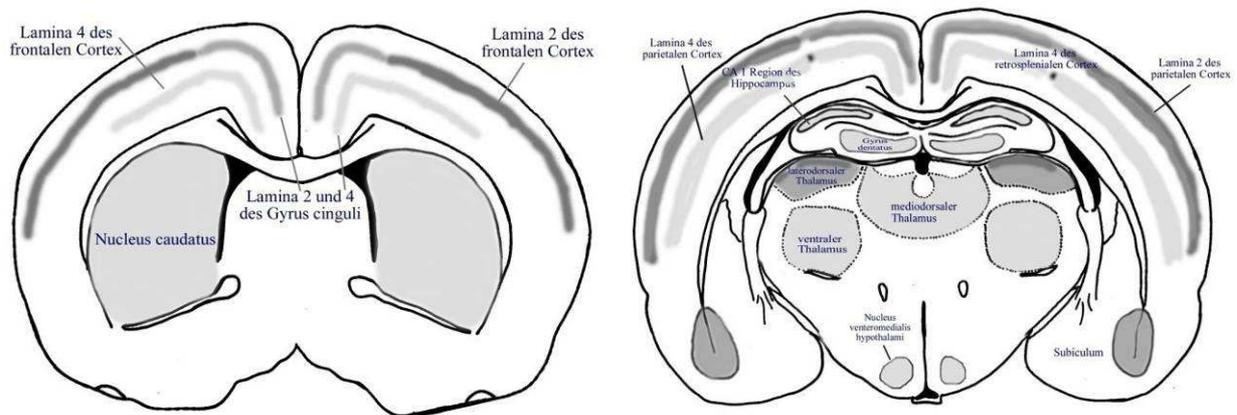


Abbildung 3: Schematische Darstellung der für diese Arbeit bedeutsamen Hirnregionen [188]

2.9. Statistische Auswertung

Für jede Versuchsgruppe wurde aus den Dichtewerten der apoptotische Zelldegeneration in der jeweiligen Hirnregion der arithmetische Mittelwert M (mean) und der Standardfehler SEM (standard error of means) errechnet. Die Dichte der degenerierten Zellen konnte somit für die jeweiligen Hirnregionen der Versuchsgruppe auf signifikante Verteilungsunterscheide hin verglichen werden. Um das gesamte Ausmaß der Neurodegeneration in der jeweiligen Versuchsgruppe darlegen zu können, wurde ein kumulativer Score aus der Summe der Dichtewerte aller Hirnregionen eines Tieres gebildet und für jede Versuchsgruppe Mittelwert und Standardfehler berechnet. Die Abweichungen der Mittelwerte wurden mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben bei Normalverteilung auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm Prism® durchgeführt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als $M \pm \text{SEM}$.

3. Ergebnisse

3.1. Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte - Dosisfindung

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß LEV oder SUL neurodegenerative Prozesse im unreifen Gehirn der Ratte induzieren können, injizierten wir den Versuchstieren LEV in den Dosierungen 5 - 100 mg/kg KG, bzw. SUL in den Dosierungen 25 - 300 mg/kg KG oder Placebo (Cremophor-Lösung 5%) und präparierten die Gehirne der Tiere 24 Stunden später mittels der zuvor beschriebenen Aufbereitungs- und Färbemethoden.

Die histologische Auswertung der Gehirne der Kontrolltiere, welchen nur mit verdünnter Cremophor-Lösung behandelt wurden, ergab eine geringe Zahl an degenerierten Neuronen, welche der physiologischen apoptotischen Neurodegenerationsrate entsprach. (**Abbildung 4, Tabelle 5**)

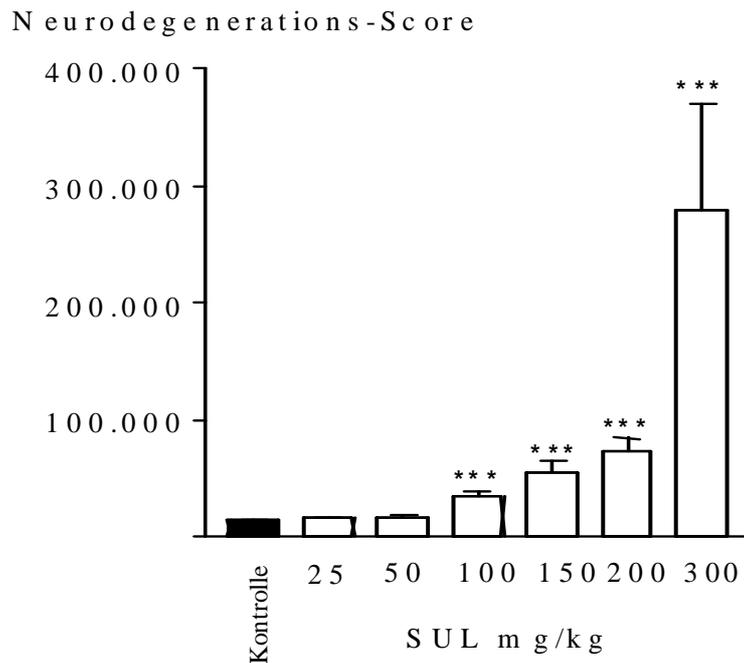
3.1.1. Sultiam

Ab einer Dosis von 100 mg/kg KG zeigte sich bei den mit SUL behandelten Tieren eine signifikante, dosisabhängig erhöhte numerische Dichte degenerierender Zellen in verschiedenen Hirnregionen. Die betroffenen Hirnregionen entsprachen den Schichten II und IV des frontalen und parietalen Cortex, dem Nucleus caudatus, den laterodorsalen, ventralen und septalen Kernen des Thalamus und dem Subiculum des Hippocampus (**Abbildung 4A und 5, Tabelle 5**). Auch die TUNEL-Färbung zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster degenerierender Neuronen, welches darauf hinweist, dass in diesen Neuronen eine DNA-Fragmentation stattgefunden hat (**Abbildung 6**).

3.1.2. Levetiracetam

Die Auswertung der mit LEV behandelten Versuchstiere zeigte bei keiner der getesteten Dosierungen einen signifikanten neurotoxischen Effekt (**Abbildung 4B, Tabelle 5**). Die numerische Dichte der Zellen entsprach der physiologischen Apoptoserate.

A



B

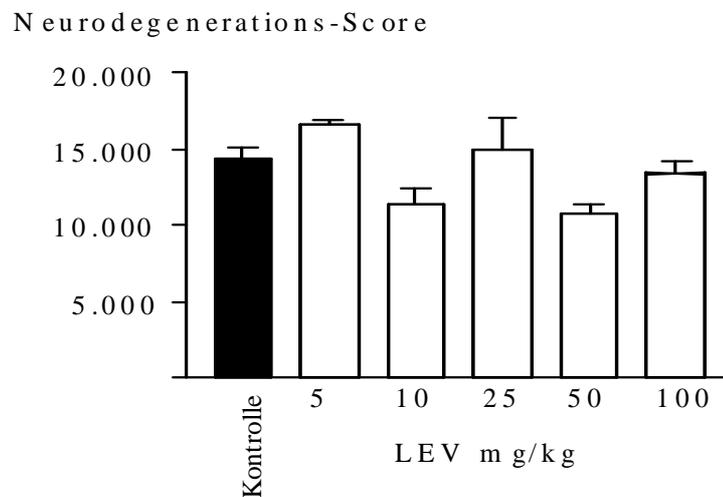


Abbildung 4: Effekt von Sultiam (A) und Levetiracetam (B) auf die neuronale Degenerationsrate im Gehirn 8 Tage alter Ratten. 24h nach der Behandlung (n=6-15 pro Gruppe). Die Säulen stellen den Score der Neurodegeneration, bestimmt aus den kumulativen Dichten degenerierender Neurone in 17 verschiedenen Hirnregionen (Tabelle 5) mittels einer stereologischen Dissektormethode, dar. LEV zeigte in keiner der getesteten Dosierungen einen signifikanten neurotoxischen Effekt, während SUL eine dosisabhängige neuronale Toxizität aufwies, die sich ab einer Dosierung von 100 mg/kg KG zeigte ($p < 0.001$, Student's t-test).

Nummerische Zelldichte degenerierender Neurone			
M ± SEM			
	Kontrollen	LEV 100 mg/kg	Sultiam 300 mg/kg
Hirnregion	n=15	n=13	n=6
Cortex frontalis, II	1.626 ± 195	1.505 ± 214	16.072 ± 2660***
Cortex frontalis, IV	325 ± 34	352 ± 33	3.681 ± 721***
Cortex parietalis, II	2.813 ± 262	3.011 ± 346	33.048 ± 3.902***
Cortex parietalis, IV	327 ± 40	380 ± 49	6.538 ± 1.196***
Cortex cinguli, II	2.040 ± 360	2.594 ± 304	28.786 ± 3.965***
Cortex cinguli, IV	378 ± 40	413 ± 51	6.686 ± 1.140***
Cortex retrosplenialis, II	1.264 ± 151	1.484 ± 143	5.981 ± 832***
Cortex retrosplenialis, IV	402 ± 61	435 ± 38	14.376 ± 4.084***
Nucleus caudatus	374 ± 43	420 ± 54	12.695 ± 3.473***
Thalamus, mediodorsal	136 ± 25	174 ± 30	21.940 ± 4.395***
Thalamus, laterodorsal	171 ± 19	183 ± 26	77.381 ± 12.055***
Thalamus, ventral	81 ± 18	143 ± 26	4.433 ± 806***
Gyrus dentatus	220 ± 25	253 ± 48	2.729 ± 886***
CA1	327 ± 41	399 ± 49	2106 ± 433***
Hypothalamus	506 ± 71	743 ± 128	9.733 ± 1.562***
Septum	440 ± 162	314 ± 46	11.052 ± 2.354***
Subiculum	494 ± 60	580 ± 83	22.643 ± 4.832***

Tabelle 5. Der Einfluss von Levetiracetam und Sultiam auf den neuronalen Zelluntergang in verschiedenen Regionen des unreifen Gehirns der Ratte.

7 Tage alte Ratten erhielten LEV - 100mg/kg KG, SUL - 300mg/kg KG oder Placebo (Cremophor-Lösung). Mittels einer stereologischen Dissektormethode wurde bei 70µm dicken Schnitten in 17 Hirnregionen die numerische Dichte degenerierter Zellen pro mm³ der Rattenhirne bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der numerischen Dichte degenerierender Neurone und deren Standardfehler (M ± SEM). Sultiam zeigt einen signifikant neurotoxischen Effekt in allen Hirnregionen, während Levetiracetam keine Neurotoxizität aufweist.

*** p<0,001, Student's t-Test

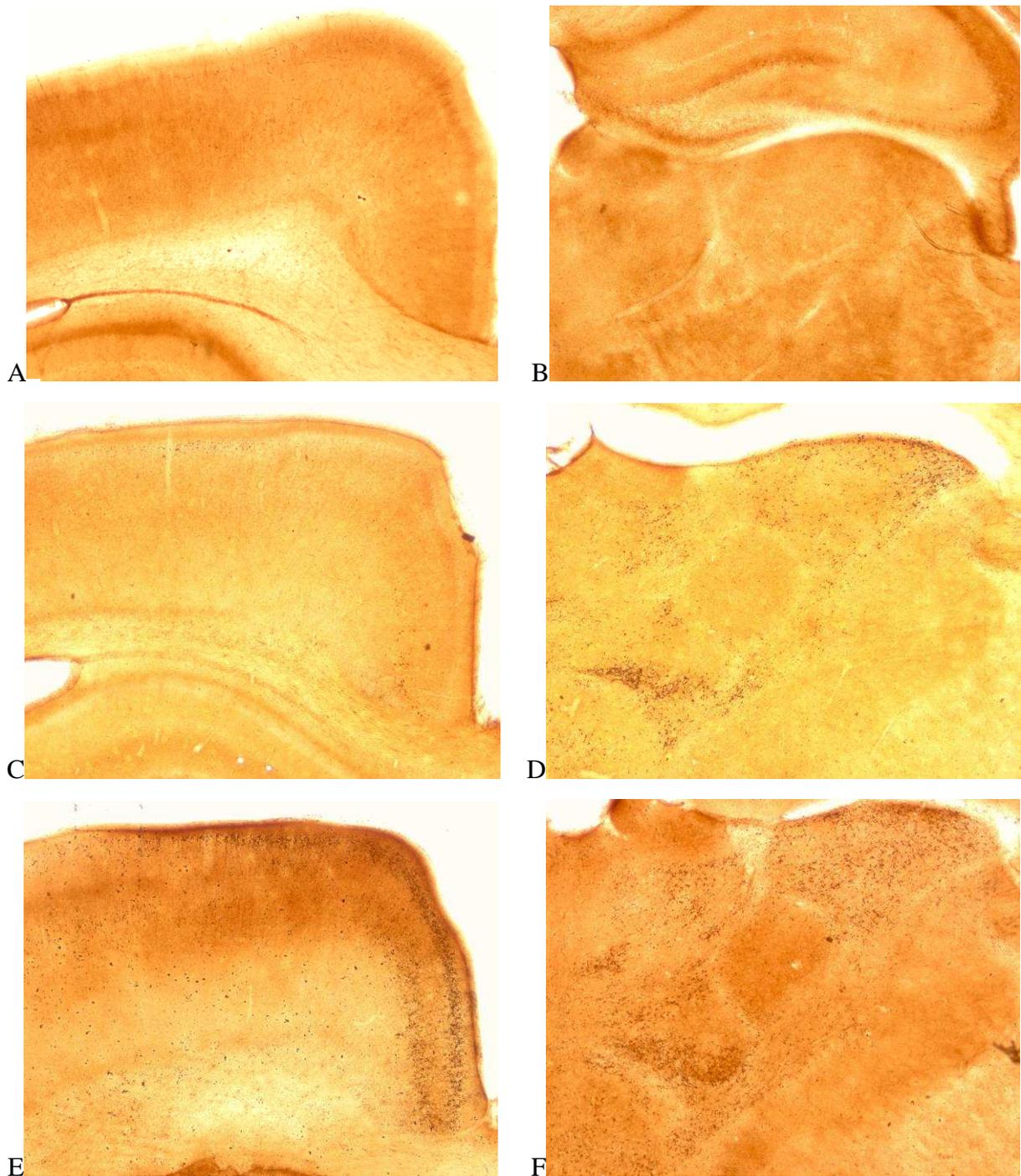


Abbildung 5: De-Olmos-Silber-Färbung von Hirnschnittpräparaten 8 Tage alter Ratten, 24h nach der Verabreichung von Placebo (A, B), SUL 100 mg/kg (C,D) oder SUL 300 mg/kg (E,F). Die linke Spalte (A, C, E) zeigt Übersichtsaufnahmen des Cortex parietalis, die rechte Spalte (B, D, F) Übersichtsaufnahmen des Thalamus. Die degenerierten Zellen sind als schwarze Punkte zu erkennen. Von oben nach unten zeigt sich deutlich die Zunahme der Neurodegeneration in den verschiedenen Hirnregionen.

3.1.3. TUNEL-Färbung

Zum Nachweis freiliegender 3'OH-Enden, die unter anderem bei apoptotischen Zelluntergängen nachweisbar sind, wurden nach Injektion von SUL 200 mg/kg oder LEV 100mg/kg die Hirne 7d-alter Ratten für die TUNEL-Färbung vorbereitet. Die degenerierten Zellen stellten sich nach erfolgter Färbung braun auf grünem Untergrund dar.

Äquivalent zu den Ergebnissen der Silber-Färbung zeigten die mit SUL behandelten Tiere eine deutliche Neurodegeneration mit dem gleichen Verteilungsmuster, das auch bei den silbergefärbten Hirnschnitten erkennbar war (**Abbildung 6**).

Auch bei dieser Färbemethode war in den Gehirnen der mit LEV behandelten Tiere keine, das physiologische Ausmaß überschreitende, Zelltodrate nachweisbar.

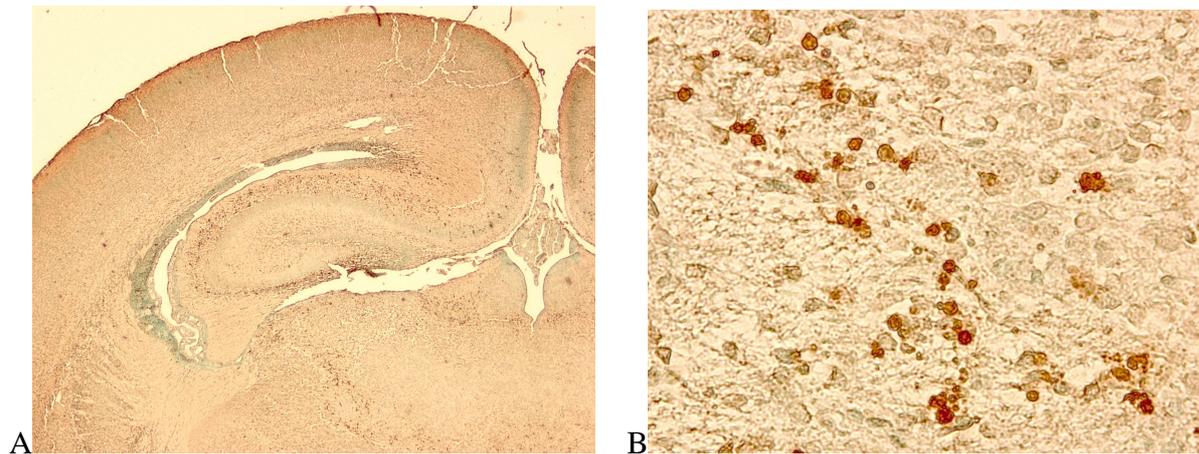


Abbildung 6 - Darstellung degenerierender Neurone mittels der TUNEL-Färbung bei 3 Tage alten Ratten.
A: Übersichtsaufnahme. B: Detailaufnahme. Die degenerierten Neurone stellen sich dunkelbraun dar.

3.2. Altersabhängigkeit des neurotoxischen Effekts

Um die Altersabhängigkeit des neurotoxischen Effektes von SUL und LEV beschreiben zu können, injizierten wir 0, 3, 7, 14 und 21 Tage alten Ratten SUL in der zuvor als neurotoxisch beschriebenen Dosis von 200 mg/kg KG oder LEV in der höchsten getesteten Dosis von 100 mg/kg KG. Die Hirne wurden 24 h später wie zuvor beschrieben mit der DeOlmos-Silberfärbung (P7-P21) oder TUNEL-Färbung (P0-P3) aufgearbeitet und analysiert.

Wir sahen, dass SUL in dieser Dosierung die Neurodegeneration in den unreifen Gehirnen bei den 0-7 Tage alten Tieren signifikant erhöhte, keine signifikante Neurotoxizität war bei den 14 und 21 Tage alte Tieren zu verzeichnen. LEV verursachte in keiner der getesteten Altersgruppen signifikante neurotoxische Effekte. (Abbildung 7)

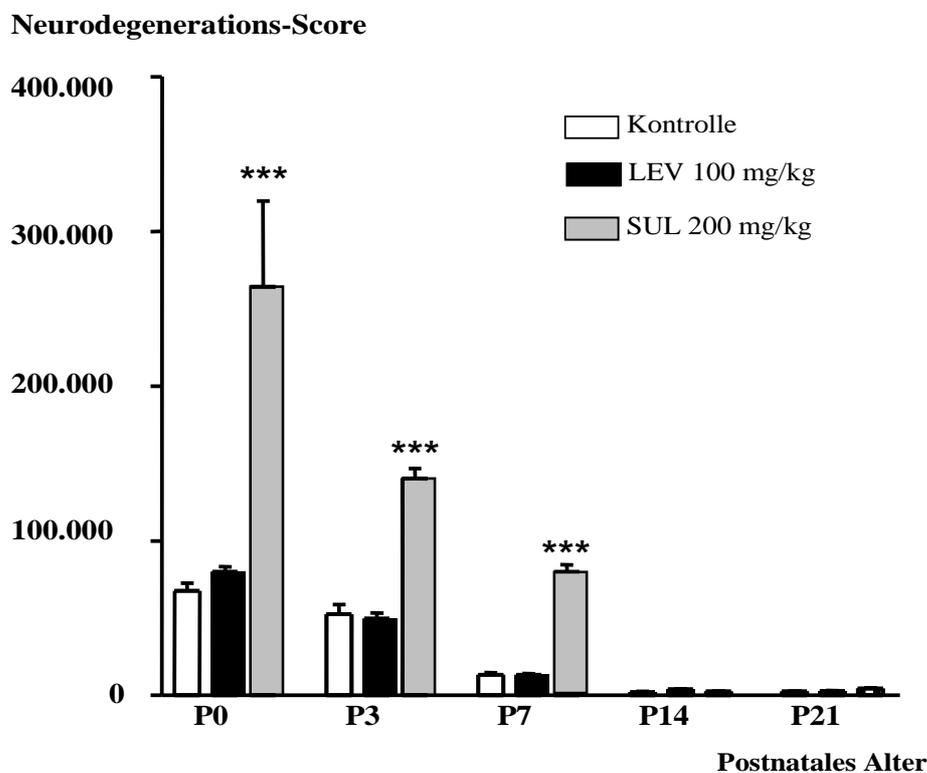


Abbildung 7: Altersabhängigkeit des neurotoxischen Effektes von Sultiam (200 mg/kg) und Levetiracetam (100 mg/kg). Die Gehirne der 0 und 3 Tage alten Ratten wurden mittels Paraffineinbettung und TUNEL-Färbung aufgearbeitet, die der 7, 14 und 21 Tage alten Tiere mittels DeOlmos-Silberfärbung. Angegeben sind die Degenerationsscores und der Standardfehler (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte zwischen Kontroll- bzw. Medikamentengruppen des gleichen Alters. Man sieht, dass sich bei den 0 bis 7 Tage alten Tieren mit SUL ein im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikanter neurotoxischer Effekt auslösen ließ, bei den 14 und 21 Tage alten Ratten hingegen nicht. Unter der Therapie mit LEV zeigte sich in keiner der Altersgruppen eine signifikante Neurotoxizität.

(*** $p < 0,001$, Student's t-Test)

3.3. Zeitabhängigkeit der Neurotoxizität

Um herauszufinden, welchen Einfluss der zeitliche Abstand zwischen Injektion des Pharmakons und dem Tod des Tieres mit nachfolgender Aufarbeitung des Hirngewebes auf die Ausprägung der Neurodegeneration hat, ließen wir in einer folgenden Versuchsreihe die Ratten 6, 12, 24, 36 oder 48 h nach der Injektion von 200 mg/kg KG SUL oder 100 mg/kg KG LEV überleben und analysierten dann wiederum die Gehirne nach der zuvor beschriebenen Methode.

Nach einer Überlebenszeit von 6 h zeigten sowohl die Hirne der SUL-Gruppe als auch die der LEV-Gruppe ein signifikant erhöhtes Maß an Neurodegeneration, mit dem höchsten Summenscore bei SUL, gefolgt von LEV. Allerdings zeigten auch die Kontrolltiere ein signifikant erhöhtes Maß an apoptotischer Neurodegeneration nach einer Zeitspanne von 6 Stunden gegenüber den anderen getesteten Zeitstufen.

Nach einer 12-stündigen Überlebenszeit zeigten die mit SUL behandelten Tiere einen sehr deutlichen Anstieg in der Apoptoserate, welche sich nach einer Überlebenszeit von 24h noch verstärkte. Bei einer Latenz von 36 bzw. 48 h war die Neurodegeneration durch SUL wieder weniger ausgeprägt, jedoch noch signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren. LEV zeigte bei 12, 24, 36 und 48 h keinen signifikanten neurotoxischen Effekt (**Abbildung 8**).

Score der Neurodegeneration

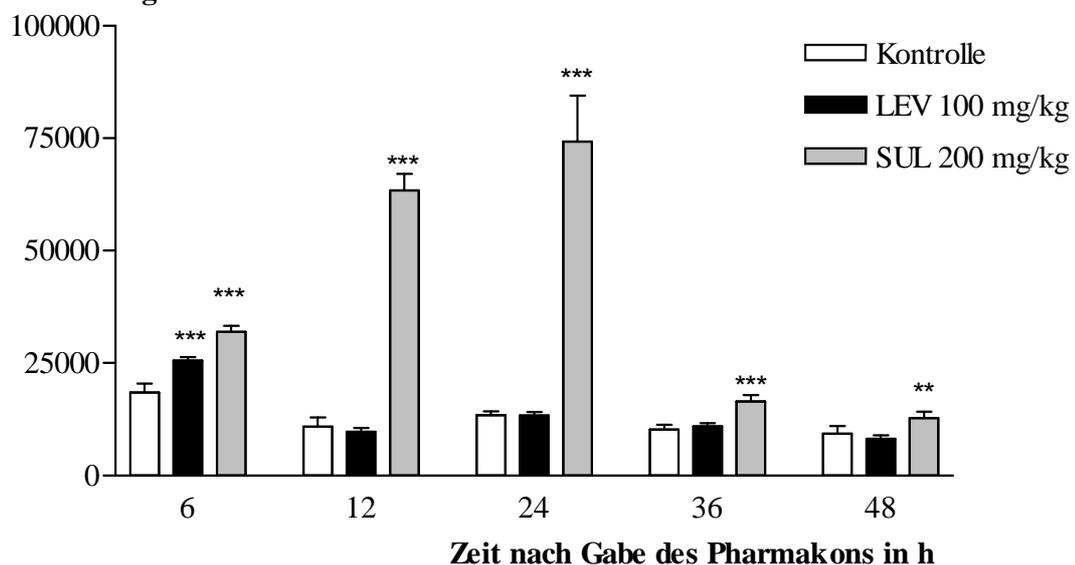


Abbildung 8

Zeitabhängigkeit des neurotoxischen Effektes von Sultiam (200 mg/kg) und Levetiracetam (100 mg/kg). Nach Injektion des Medikaments bei 7 Tage alten Ratten wurden diese nach 6, 12, 36 oder 48 Stunden getötet und die Gehirne mittels der DeOlmos-Silberfärbung aufgearbeitet. Angegeben sind die Degenerationsscores und der Standardfehler (SEM). *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,0021$, Student's t-Test. Man sieht, dass sich der neurotoxische Effekt von SUL am stärksten bei einer Zeitabstand von 24 h zwischen Medikamentengabe und Tod des Tieres zeigte. Unter der Therapie mit LEV zeigte sich ein signifikanter neurotoxischer Effekt nach 6 Stunden.

3.4. LEV im Pilocarpin-Krampfmodell

Wir untersuchten, ob die, als nicht neurotoxisch bewertete, LEV-Dosierung von 50 mg/kg im Pilocarpin-Modell antikonvulsiv wirksam ist und ob durch die Anwendung des Medikaments bei gleichzeitig bestehender Krampfaktivität möglicherweise doch eine Neurodegeneration auslösbar ist. Dazu verabreichten wir 7 Tage alten Ratten nach einer vorbereitenden Gabe von N-Methyl-Scopolamin (1mg/kg KG) zur Verhinderung peripherer Nebenwirkungen 100mg/kg Pilocarpin i.p., welches Krampfäquivalente wie Kratzen, Tremor, mastikatorische Automatismen und Extremitätenkloni auslöste. Einem Teil dieser Tiere wurde nach 20 Minuten LEV in einer Dosierung von 50 mg/kg injiziert. Die Kontrolltiere erhielten nur 50mg/kg LEV bzw. nur Placebo. Wir beobachteten die Wirkung des LEV auf die Krämpfe. Nach 24 Stunden wurden die Tiere wie oben beschrieben präpariert und aufgearbeitet.

LEV war im vorliegenden Versuch in einer Dosierung von 50 mg/kg in der Lage, die durch Pilocarpin ausgelösten Krampfanfälle zu verkürzen. Die beobachteten Konvulsionen dauerten bei einer Beobachtungszeit von 5h im Durchschnitt 166 min ohne LEV und 112 min mit LEV. Die zuvor als nicht neurotoxisch beurteilte Dosis lag somit im therapeutisch wirksamen Bereich. Die histologische Untersuchung der Hirne erbrachte bei den nur mit Pilocarpin und den nur mit LEV behandelten Tieren, sowie der Kontrollpopulation ein physiologisches Ausmaß an Neurodegeneration. Die Tiere, die im Anschluss an die Pilocarpinapplikation mit LEV behandelt wurden, zeigte eine geringe, jedoch signifikant erhöhte Degenerationsrate (**Abbildung 9**).

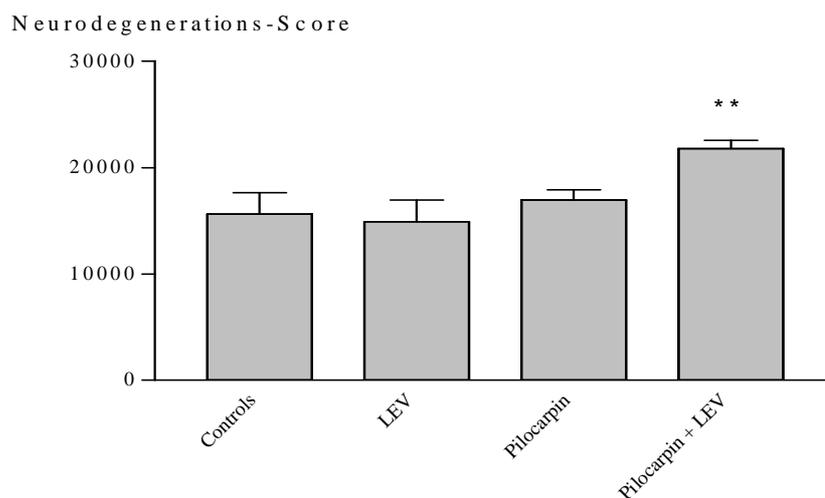


Abbildung 9 - Effekt von LEV auf die Entwicklung neurodegenerativer Prozesse nach Pilocarpin-induzierten Krampfanfällen. Während die alleinige Verabreichung von LEV oder Pilocarpin bei 7 Tage alten Ratten keine signifikante proapoptotische Wirkung zeigt, sieht man in den Gehirnen der Tiere, die 20 min nach Auslösung von Krampfanfällen LEV erhalten hatten eine geringe, jedoch signifikante Zunahme der apoptotischen Neurodegeneration.*** $p < 0,007$, Student's T-Test

4. Diskussion

4.1. Neurotoxizität im unreifen Gehirn der Ratte

Die Phase des rapiden Hirnwachstums ist eine sehr vulnerable Periode während der Entwicklung des Zentralen Nervensystems. Sie fällt bei der Ratte in die ersten 2 Wochen des postnatalen Lebens, beim Menschen umfasst sie das dritte Trimenon der Schwangerschaft und die ersten drei Lebensjahre. Diese Zeit beinhaltet beim Menschen auch die Phase mit der höchsten Inzidenz an Krampfanfällen und somit eine Periode, in der die Anwendung von Antiepileptika und deren potentielle Toxizität eine große Rolle spielt.

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Ikonomidou konnte demonstriert werden, dass die Blockade von NMDA-Rezeptoren oder die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren während der Phase des rapiden Hirnwachstums ein sehr starkes proapoptotisches Signal im sich entwickelnden Gehirn der Ratte ist [53]. Die gebräuchlichsten Antiepileptika wirken über genau diese Mechanismen und weisen bei Dosierungen und Plasmakonzentrationen innerhalb ihrer therapeutischen Breite neurotoxische Effekte auf [55].

Phenobarbital-Konzentrationen zwischen 25 und 35 µg/ml über einen Zeitraum von 12 h triggerten eine Neurodegeneration im infantilen Rattenhirn, die in der ultrastrukturellen Analyse dem physiologischen apoptotischen Zelltod ähnelte [54, 55]. Plasmakonzentrationen in dieser Höhe werden bei Verabreichung von Phenobarbital zur Behandlung von Krampfanfällen, des Status epilepticus oder in der Langzeittherapie einer Epilepsie im Kindesalter leicht erreicht [189]. Bei Valproat war die neurotoxische Schwellendosis (50 mg/kg) sogar niedriger als die berichtete antikonvulsive Dosis bei Nagetieren (133 – 250 mg/kg). Auch der Natrium-Kanal-Blocker Phenytoin wies im Tiermodell in therapeutischen Dosierungen und Plasmakonzentrationen neurotoxische Effekte auf [39].

Das neuere Antiepileptikum Topiramate, welches antagonistische Eigenschaften am AMPA-Rezeptor und Einflüsse auf die Proteinphosphorylierung hat, verursachte ebenfalls neurodegenerative Effekte, jedoch erst in Dosierungen, die deutlich über der therapeutischen Dosis lagen. Es ist deshalb möglich und notwendig, zwischen therapeutischen und neurotoxischen Dosen eines antiepileptischen Pharmakons zu unterscheiden [190].

4.1.1. Apoptose und Neurotrophine im unreifen Gehirn der Ratte

Neurotrophine sind während der Entwicklung neuronaler Systeme für das Überleben der Zellen essentielle Moleküle [191, 192]. Bittigau et al. konnte nachweisen, dass Antiepileptika wie Phenobarbital, Valproat oder Phenytoin in der Lage sind, die Expression der Neurotrophine BDNF und NT-3 bei 7 Tage alten Ratten zu vermindern, woraufhin eine deutlich erhöhte Apoptoserate zu verzeichnen war [55]. Die antiepileptikainduzierte Neurotoxizität ist also vermutlich mit der Beeinträchtigung neurotrophinvermittelter, überlebensfördernder Signale und einer Imbalance zwischen neuroprotektiven und neurodestruktiven Mechanismen im Gehirn assoziiert. Antiepileptika, die während der Hirnentwicklung auf selbiges einwirken, unterdrücken dieses endogene neuroprotektive System, das für das Überleben der Neurone während der Entwicklung essentiell ist und lösen eine verstärkte apoptotische Neurodegeneration aus. Unklar ist bislang noch, ob andere, bislang nicht untersuchte Mechanismen, wie die Beeinflussung der Migration, der Synaptogenese oder Proliferation neuronaler Vorläuferzellen auch zu den beobachteten neurologischen Defiziten nach prä- oder postnataler Anwendung von Antiepileptika beitragen [55].

4.2. Sultiam

SUL, eines der älteren antiepileptisch wirksamen Medikamente, welches seit vielen Jahren zur Behandlung der Rolando-Epilepsie verwendet wird, wurde kürzlich in die Therapie des West-Syndroms, eines infantilen Epilepsie-Syndroms, welches unbehandelt eine verheerende Wirkung auf die neurokognitive Entwicklung ausüben kann, eingeführt. SUL zeigte hier eine Effizienz, welche mit der von Vigabatrin vergleichbar ist und wird in Europa derzeit als Alternative zu Kortikosteroiden, Valproat oder Vigabatrin eingesetzt.

SUL ist ein potenter und membrangängiger Carboanhydrase-Hemmer, der den intrazellulären pH-Wert in Neuronen zu senken vermag. SUL reduzierte die epileptiformen Aktivitätsmuster in hippokampalen CA3-Neuronen, ein Effekt, der teilweise aus einer moderaten intrazellulären Azidose, bzw. azidoseinduzierten Änderungen in der Öffnungs-Kinetik von Ionenkanälen, die in neuronale Erregbarkeit involviert sind, beruht [193, 194]

SUL reduziert über Inhibition der Carboanhydrase spannungsgesteuerte Natrium-Ströme [79] und hemmt die Transmitterausschüttung in Schnitten von Rattenhirnen, ein Effekt, der vergleichbar mit dem von Phenytoin ist [195].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Sultiam ab einer Dosierung von 100 mg/kg KG, also innerhalb seiner antikonvulsiv wirksamen Dosierungsspanne (25-200 mg/kg KG), eine

Neurodegeneration im unreifen Rattenhirn induziert, die vergleichbar mit der durch Phenobarbital oder Phenytoin ausgelösten apoptotischen Neurodegeneration ist. Wie auch bei den anderen, zuvor beschriebenen Antiepileptika ist diese Neurotoxizität altersabhängig und tritt bevorzugt während der Phase des schnellsten Hirnwachstums auf.

Da SUL u.a. spannungsgesteuerte Na-Kanäle blockiert und damit die neuronale Erregbarkeit beeinflusst, liegt die Annahme nahe, dass ähnliche Mechanismen wie bei den anderen untersuchten Antiepileptika zum Tragen kommen und die neurotoxischen Effekte in infantilen Rattenhirnen auslösen. Diese Mechanismen beinhalten die Blockade physiologischer synaptischer Neurotransmission und die Depression endogener Neurotrophinsysteme, die unabdingbar für das neuronale Überleben während der Hirnentwicklung sind [191, 192].

Über die Wirkung von SUL auf Neurotrophinsysteme gibt es bislang keine Untersuchungen. In Anbetracht des deutlichen neurotoxischen Effekts von SUL im unreifen Gehirn der Ratte erscheint es durchaus sinnvoll, auch dieses Medikament hinsichtlich seines Effekts auf Neurotrophinsysteme zu untersuchen.

In den Vorversuchen mit Phenytoin, Valproat und Topiramate, drei Substanzen, die ihre antikonvulsive Wirkung über die Blockade von Natrium-Kanälen entfalten, wurde der neuronale Zelluntergang elektronenmikroskopisch als apoptotische Neurodegeneration verifiziert. Aufgrund der Tatsache, dass SUL einen den drei Medikamenten äquivalenten Wirkmechanismus aufweist und das morphologische Verteilungsmuster der neuronalen Zelluntergänge dem der zuvor genannten Pharmaka entspricht, ist auch bei den vorliegenden Ergebnissen von Apoptose als Schädigungsmechanismus auszugehen.

4.3. Levetiracetam

Das überraschende Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die fehlende Neurotoxizität des Pharmakons Levetiracetam ab 12 Stunden post injectionem, auch in Dosierungen, die deutlich über der bei Ratten antikonvulsiv wirksamen Dosierung lagen. Ratten, die 6 Stunden post injectionem untersucht wurden, zeigten gegenüber den Kontrolltieren und den Tieren, die erst 12-48 Stunden post injectionem untersucht wurden eine erhöhte Neurotoxizität. Möglicherweise spielen sich zu diesem Zeitpunkt akute toxische, ggf. auch exzitotoxische Vorgänge ab, die mit apoptotischer Neurodegeneration nicht zu tun haben. Auffällig war die signifikante Zunahme der Neurotoxizität bei Verabreichung von LEV unter pilocarpininduzierter Krampfaktivität, die folgend diskutiert werden soll.

4.3.1. Die neurotoxische Potenz von Levetiracetam bei bestehender Krampfaktivität

4.3.1.1. *Das Pilocarpin-Epilepsie-Modell*

Das Pilocarpin-Epilepsie-Modell zählt zu den Post-Status-Epilepticus-Modellen. Die systemische (i.p.) oder intrathekale Applikation des muskarinergen ACh-Antagonisten Pilocarpin induziert bei adulten Ratten Verhaltens- und EEG-Veränderungen, welche in drei Phasen unterteilt werden [196]:

1. Akute Phase - Unmittelbar nach Applikation des Pilocarpin zeigen sich Krampfäquivalente, die sich folgend zu einem Status epilepticus (SE) entwickeln.
2. Latenzphase mit einer Dauer von 4 bis 44 Tagen.
3. Chronische Phase - Entwicklung wiederholter spontan auftretender Krampfanfälle.

Untersucht man die Gehirne adulter Ratten nach Auslösung eines SE durch Pilocarpin, so zeigen sich deutliche neuronale Zelluntergänge u.a. im Hippocampus, Thalamus und Amygdala, welche in ihrem Muster der Zellschädigung nach langanhaltenden Krampfanfällen ähneln [197, 198]. Das Pilocarpin-Epilepsie-Modell bei Mäusen und Ratten reproduziert somit wichtige Eigenschaften der Genese einer menschlichen Temporallappenepilepsie, inklusive der häufig vorhandenen Therapieresistenz gegenüber bestimmten Antiepileptika.

In den drei Phasen des Pilocarpin-Epilepsie-Modells können Antiepileptika auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht werden. Während in der akuten Phase Stoffe zur akuten Therapie des SE oder solche mit einer potentiellen neuroprotektiven oder neurotoxischen Wirkung untersucht werden können, bietet die Latenzphase die Möglichkeit, Pharmaka zu untersuchen,

die potentielle antiepileptogene Eigenschaften haben. Die chronische Phase dient der Prüfung von Substanzen gegen komplex-fokale und sekundär-generalisierte Krampfanfälle [198].

In Versuchen mit heranwachsenden Ratten im Pilocarpin-Modell wiesen die Reaktion der Tiere sowie das Ausmaß der Zellschädigung eine deutliche Altersabhängigkeit auf. Bei 3 bis 10 Tage alte Ratten konnten durch die Applikation von Pilocarpin Krampfäquivalente, jedoch kein SE induziert werden. Erst mit steigendem Alter näherte sich das Krampfmuster dem erwachsener Tiere an. Die spontan auftretenden Anfälle nach einem Pilocarpin-induzierten SE bildeten sich bei Ratten nur dann aus, wenn die Tiere bei Gabe des Pilocarpin älter als 17 Tage waren. Bei histologischer Untersuchung der Gehirne wurden zudem bei den 3-12 Tage alten Ratten keine bzw. nur gering ausgeprägte morphologische Veränderungen nachgewiesen. [199, 200].

Dennoch gingen wir in unseren Versuchen im Pilocarpin-Modell von der Induktion eines SE aus, da die von uns beobachteten Krampfäquivalente eine Dauer von 30 Minuten, deutlich überschritten, und somit die Definition eines SE gegeben ist. Auch war es nicht unser Ziel, eine Aussage über die antiepileptogene Potenz von LEV, also den Einfluss auf die Entwicklung spontan auftretender Anfälle, zu machen, sondern in der akuten Phase des Pilocarpin-Krampfmodells, also unter bestehender Krampfaktivität das neurotoxische Potential von LEV zu untersuchen.

4.3.1.2. *Bisherige Ergebnisse mit Levetiracetam im Pilocarpin-Modell*

Bislang existieren nur wenige Studien zur Wirksamkeit von LEV im Pilocarpin-Epilepsie-Modell. Alle vorliegenden Arbeiten wurden mit erwachsenen Tieren durchgeführt, Parallelen zu den Ergebnissen bei Jungtieren sind nur spekulativ.

Obwohl LEV in verschiedenen chemokonvulsiven Anfallsmodellen keine antikonvulsive Wirksamkeit zeigte, bemerkten Klitgaard et al. [170] im Pilocarpin-Modell an Mäusen und Ratten eine potente Protektion gegen sekundär generalisierte Krampfaktivität. LEV vermochte dosisabhängig, die Frequenz und Schwere der generalisierten spontan auftretenden Anfälle nach Pilocarpin-induziertem SE bei Ratten zu vermindern, während fokale Anfälle unbeeinflusst blieben [201-203]. Die interindividuelle Reaktion der Tiere war groß und reichte von kompletter Anfallskontrolle bis hin zu unveränderter Anfallshäufigkeit, eine Beobachtung, die häufig auch im klinischen Alltag von Patienten mit Temporallappenepilepsie zu machen ist.

In anderen Versuchsreihen vermochte die Vorbehandlung mit LEV vor Induktion eines SE mit Pilocarpin, die konsekutive Hyperexzitabilität im Hippocampus von Ratten zu verhindern und die Latenz des Auftretens von spontanen Krampfanfällen zu erhöhen [204, 205].

LEV führte weiterhin zu einer Umkehr der durch Pilocarpin induzierten Downregulation des muskarinergen ACh-Rezeptors, während die alleinige Verabreichung von LEV zu einer Hochregulation des Rezeptors führte. Man vermutet hier eine allosterische Beeinflussung des ACh-Rezeptors durch LEV, welcher zur antiepileptogenen Potenz des Pharmakons beitragen könnte. Zudem wurde ein fördernder Effekt von LEV auf antioxidative Vorgänge und Substanzen (z.B. Normalisierung der Lipid-Peroxidation, Katalase-Aktivität und des Glutathion-Spiegels) und somit eine Verminderung des oxidativen Stresses nach Pilocarpin-induzierten Krampfanfällen im Hippocampus von Ratten beschrieben. [206]

4.3.1.3. Neurotoxizität von LEV bei gleichzeitiger Krampfaktivität

Wie bereits erwähnt, hatte unsere Untersuchung von LEV im Pilocarpin-Anfallsmodell den Sinn zu prüfen, die zuvor als nicht neurotoxisch bewerteten Dosierungen von LEV im Pilocarpin-Modell bei jungen Ratten im antikonvulsiv wirksamen Bereich liegen und ob die Gabe von LEV unter zusätzlicher Krampfaktivität bei jungen Ratten zu einer Induktion von neuronalen Zelluntergängen führen kann.

Das Verhalten der Tiere nach der Gabe des Pilocarpins war vergleichbar mit der Beschreibung des altersabhängigen Pilocarpin-Effektes in der Studie von Priel et al. [199], dauerte jedoch länger als 30 Minuten an, so dass von einem echten SE auszugehen ist. Die Gabe von LEV in einer Dosierung von 50mg/kg verkürzte die Dauer der pilocarpininduzierten Krampfanfälle. Erwartungsgemäß zeigten die nur mit Pilocarpin oder LEV behandelten Tiere keine, über das physiologische Ausmaß hinausgehenden, morphologischen Veränderungen des Gehirns. Bemerkenswert war die nicht stark, jedoch signifikant erhöhte Rate an degenerierten Neuronen in den Gehirnen der mit Pilocarpin + LEV behandelten Tiere.

Die ED 50 für LEV wird in verschiedenen Publikationen zwischen 1,4 und 36 mg/kg angegeben. Die in den von uns durchgeführten Versuchen verwendete LEV-Dosierung von 50 mg/kg lag somit über dem antikonvulsiv wirksamen Bereich. Womöglich sind niedrigere antikonvulsiv wirksame Dosierungen im Pilocarpin-Modell nicht neurotoxisch.

Wie bereits beschrieben, wird vermutet, dass LEV seine Wirkung am SV2A-Protein nur unter pathophysiologischen Bedingungen entfaltet und die Mechanismen der Anfallsgenerierung und -ausbreitung beeinflusst, ohne die physiologische Neurotransmission im Gehirn zu alterieren [167, 168]. Sollte diese Annahme zutreffen, könnte sie eine Erklärung für die fehlende Neurotoxizität in Abwesenheit zerebraler Krampfaktivität und eine signifikante Zunahme des neurodegenerativen Effekts von LEV bei gleichzeitig bestehender Anfallsaktivität sein.

Die in den Versuchen zur Dosisfindung, Zeit- und Altersabhängigkeit verwendeten Ratten zeigten keinerlei Anfallsaktivität. Weitere Versuchsreihen zur Untersuchung dieses Effektes in anderen Krampfmodellen, z.B. genetischen Epilepsiemodellen, in denen die Versuchstiere eine angeborene Neigung zu epileptischer Aktivität haben, könnten sich daher anschließen, um eine sichere Verwendung von LEV als prophylaktisches Pharmakon zur Vermeidung von Anfällen bei einer bestehenden Epilepsie in der Pädiatrie zu gewährleisten.

4.3.2. Levetiracetam und Epilepsieprävention

4.3.2.1 *Epileptogenese*

Die Therapie der Epilepsien war lange fokussiert auf die Unterdrückung der Krampfanfälle bei einer schon bestehenden Epilepsie. Mit größer werdendem Verständnis der Entstehungsprozesse einer Epilepsie suchte man auch nach Ansätzen, diese medikamentös zu beeinflussen und somit die Epilepsie schon in ihrer Genese mildern oder gar verhindern zu können.

Epileptogenese ist ein multiphasischer Prozess, während dem ein Gehirn, z.B. induziert durch Traumata, Schlaganfälle, Infektionen oder einen Status epilepticus, Veränderungen erfährt, die die Generierung spontaner Anfälle unterstützen. Nach einem solchen traumatischen Ereignis folgt zunächst eine Latenzphase von bis zu mehreren Jahren, während der sich progressive Veränderungen im Gehirn vollziehen, die die Krampfschwelle senken und damit den Weg für spontan auftretende Krampfanfälle ebnen. Nach ersten aufgetretenen Anfällen verläuft die Erkrankung oft progredient.

Der Prozess der Epileptogenese beinhaltet langfristige biochemische und histologische Veränderungen in Hirnstrukturen, u.a. die vermehrte Expression von GFAP mit der Folge der Gliose, neuronale Zellverluste, Neurogenese und die Reorganisation neuronaler Schaltkreise [207]. Während der Epileptogenese verschieben sich zudem synaptosomale Level von Mediatoren der Vesikelfunktion. Darunter befinden sich z.B. die für die Wirkung von LEV wichtigen, SV2-Proteine, Regulatoren der bereits erwähnten SNARE-Komplexe, einer Gruppe von Membranproteinen, die an der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran beteiligt sind [208].

Epileptogenese lässt sich in verschiedenen Tiermodellen, wie z.B. Post-Status-Epilepticus-(PSE) Modellen, Kindling-Modellen und genetischen Epilepsie-Modellen simulieren.

- Im PSE-Modell entwickelt sich eine Epilepsie nach Induktion eines Status epilepticus, z.B. durch Pilocarpin oder Kainat. Auch hier findet sich zwischen initialem

traumatischen Ereignis und dem Auftreten ersten Krampfanfälle eine Latenzphase von bis zu mehreren Wochen, in der der Prozess der Epileptogenese stattfindet [209].

- Kindling beschreibt ein Phänomen, bei dem die wiederholte Applikation initial unterschwelliger elektrischer oder chemischer Stimuli auf limbische oder kortikale Areale zur progressiven Intensivierung der Erregbarkeit des Gehirns (lokal, regional oder global) führt. Bei andauernder Stimulation kommt es zur Entwicklung eines epileptischen Fokus mit der Ausbildung von komplex-fokalen und sekundär generalisierten Anfällen, welche auch nach Beendigung der Reize persistieren [209].

Die Latenzphase der Epileptogenese bietet ein potentiell therapeutisches Fenster für die präventive Behandlung einer möglicherweise entstehenden Epilepsie. Durch Prävention der Reorganisation neuronaler Kreise, die zur Senkung der Krampfschwelle führt, könnten Pharmaka dem Prozess der Epileptogenese entgegenwirken und somit präventiv nach einem Trauma, Status epilepticus (SE) oder Schlaganfall oder auch bei bereits bestehender Epilepsie zur Verhinderung einer weiteren Progredienz eingesetzt werden. Als Antiepileptika mit potentiell antiepileptogenem Effekt wurden bisher Topiramat, Clonazepam, Phenobarbital und Valproat identifiziert, die beiden letztgenannten allerdings nur in so hohen Dosierungen, dass deutliche Nebenwirkungen auftraten [210-212].

Zu beachten ist, dass es starke Diskrepanzen zwischen den Beobachtungen in Tiermodellen und klinischen Ergebnissen beim Menschen gibt. Antiepileptogene Effekte konnten in Studien am Menschen bislang nicht beobachtet werden. So wirkte z.B. Phenobarbital im Kindling-Modell protektiv gegen die Ausbildung von Krampfanfällen, bei Anwendung nach einem SE beim Menschen jedoch nicht. Multifaktorielle Ursachen, wie unterschiedliche Mechanismen der Epileptogenese, Verabreichungsform, Dosierung und Zeitpunkt der Medikamenteneinnahme nach dem traumatischen Ereignis werden angenommen [213].

4.3.2.2. *Neuroprotektiver und antiepileptogener Effekt von LEV*

In mehreren in-vitro- und Tiermodellstudien wurde über neuroprotektive Effekte von LEV z.B. bei geschlossenem Schädel-Hirn-Trauma, Subarachnoidalblutungen, Ischämie oder in SSSE-Modellen berichtet, während andere Autoren keinen neuroprotektiven oder antiepileptogenen Effekt z.B. nach induziertem SE nachweisen konnten [214-221].

LEV zeigte darüber hinaus bei Ratten in verschiedenen Kindling-Modellen sowohl nach Vollendung des Kindling-Prozesses eine antikonvulsive Wirksamkeit, als auch als auch eine

Verzögerung den Kindling-Prozesses an sich, die Dauer und Schwere der resultierenden Krampfanfälle war dabei signifikant vermindert. LEV zeigte hier einen erstaunlichen Langzeiteffekt, auch Wochen nach Beendigung der Medikation waren die Anfälle noch von signifikant kürzerer Dauer als in der Kontrollpopulation [176, 177, 222].

Im Modell der Spontan-Epileptischen Ratte (SER-Modell) hatte LEV, auch nach Beendigung der Medikation einen ungewöhnlich langanhaltenden antikonvulsiven Effekt. Da eine Wirkstoffakkumulation ausgeschlossen wurde, ist zu vermuten, dass LEV den Prozess der Anfallsentwicklung verzögern konnte. In weiterführenden Studien zeigten die Arbeitsgruppen Sasa et al. und Yan et al., dass die Frequenz und Dauer der, für gewöhnlich 8 Wochen postnatal auftretenden, ersten Anfälle im SER-Modell signifikant vermindert war und nahmen somit einen möglichen antiepileptogenen Effekt von LEV an [207, 223]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im GEARS-Modell gemacht werden [179].

Der Mechanismus, über den LEV den beobachteten antiepileptogenen Effekt ausübt, ist bislang unklar. Gu et al. [222] und Husum et al. [224] führten Studien an Ratten durch, in denen LEV die durch Kindling induzierten Veränderungen in der Expression diverser Gene des Temporallappens ganz oder teilweise umkehrte. Unter den beeinflussten Genen waren unter anderem solche, die mit der Entwicklung einer Epilepsie in Verbindung gebracht werden, wie z.B. Neuropeptid Y (NPY), Thyreotropin-Releasing Hormon (TRH) und Glial Fibrillary Acidic Proteine (GFAP) und Brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Wie zuvor erwähnt, hatte der Einfluss von Antiepileptika auf bestimmte Neurotrophine (u.a. BDNF) im Tierexperiment eine erhöhte Apoptoserate zur Folge. Ob eine positive Beeinflussung dieser Neurotrophine durch LEV zu einem neuroprotektiven oder antiepileptogenen Effekt führt, ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht.

Matveeva et al. beschrieben eine Veränderung der Genexpression von SNARE-Regulatoren wie u.a. der SV2-Proteine und eine anhaltende Akkumulation von SNARE-Komplexen, im Hippocampus während der Epileptogenese im Kindling-Modell [163]. Eine während des Kindlings durchgeführte Behandlung mit LEV konnte diese veränderte Expression von SV2-Proteinen und die induzierte SNARE-Komplex-Akkumulation im Hippocampus umkehren.

LEV hatte in all diesen Versuchen keinen Einfluss auf die Genexpression in Gehirnen von Ratten, die nicht dem Kindling Prozess unterzogen worden waren. Dies unterstützt die Vermutung, dass LEV seine Wirkung nur unter pathophysiologischen Bedingungen entfaltet.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so lässt sich der potentielle antiepileptogene Effekt von LEV durch die Veränderung der Genexpression verschiedener Mediatoren und Neurotrophine,

mit der Folge der Verhinderung struktureller Reorganisationsmechanismen und dadurch Verminderung der Bildung epileptischer Fokusse erklären.

Um spontan auftretende Anfälle bzw. eine Epilepsie als Folgeerscheinungen nach sich zu ziehen, muss ein SE, je nach verwendetem Modell eine bestimmte Mindestdauer haben. Wird der SE, z.B. medikamentös verkürzt, so kommt es nicht zur Ausbildung spontaner Anfälle [209].

Naheliegend ist, dass ein Medikament, welches vor Induktion eines SE präventiv verabreicht wird, zwar die Ausprägung und Dauer desselben vermindert, somit indirekt Zelluntergänge und Remodeling-Vorgänge unterbindet, jedoch keinen direkten Einfluss auf die Epileptogenese, sondern nur auf die auslösende Ursache, ausübt. Eine echte antiepileptogene Potenz kann also nur dann nachgewiesen werden, wenn auch dann keine Folgeepilepsie entsteht, wenn das potentiellen „Antiepileptogen“ erst nach Beendigung des SE verabreicht wird.

Im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen konnten Brandt et al. im PSE-Modell durch die kontinuierliche, prophylaktische Behandlung mit LEV im Anschluss an einem SE keinen Effekt auf die Langzeit-Konsequenzen, sprich die Ausbildung von spontanen Anfällen, Schwere und Dauer der resultierenden Anfälle, neurodegenerative Vorgänge und Verhaltensauffälligkeiten, wie Hyperexzitabilität und Lerndefizite, erzielen [225].

Die beobachtete neuroprotektive Potenz in Zusammenhang mit dem fehlenden antiepileptogenen Effekt bei Gabe erst im Anschluss an einen SE, lässt vermuten, dass das Antiepileptikum LEV im Tierversuch mehr einen krankheitsmodifizierenden Effekt durch Eingreifen in die Vorgänge die während des SE ablaufen, denn einen direkten antiepileptogenen Effekt ausübt.

Für den Nachweis eines antiepileptogenen Effekts von LEV beim Menschen fehlen bislang klinische Studien.

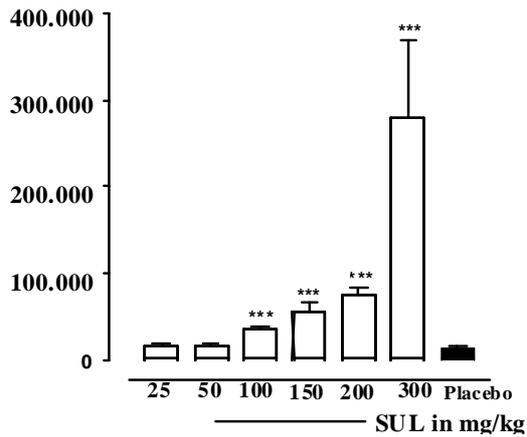
4.4. Vergleich des neurotoxischen Effektes von Sultiam und Levetiracetam mit dem anderer Antiepileptika

Basierend auf der Publikation von Bittigau et al. [39] verglichen wir die neurotoxischen Effekte von SUL (50 – 300 mg/kg KG) und LEV (5 – 100 mg/kg KG) mit denen von Valproat (50 – 400 mg/kg KG), Phenytoin (10 – 50 mg/kg KG), Topirammat (5-80 mg/kg) und Phenobarbital (20 – 100 mg/kg KG) nach einmaliger intraperitonealer Injektion des jeweiligen Pharmakons bei 7 Tage alten Ratten. Die Gehirne der behandelten Tiere wurden 24 h nach der Injektion des jeweiligen Medikaments silbergefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Degenerations-Scores wurden, wie im Methodenteil beschrieben, berechnet und sind in **Abbildung 10** zu sehen.

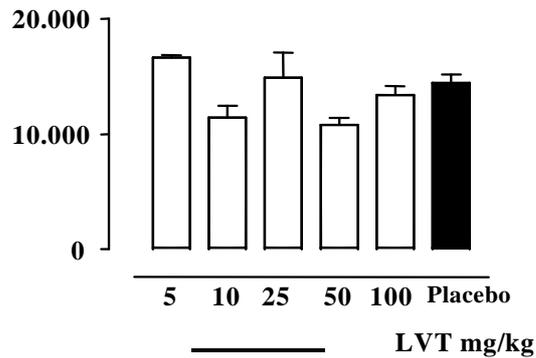
SUL zeigte hierbei innerhalb seiner antikonvulsiv wirksamen Dosisspanne eine dem Phenobarbital und dem Phenytoin vergleichbare Neurotoxizität. LEV wies bei vergleichender Betrachtung dieser fünf Antiepileptika das vorteilhafteste Profil auf.

Die Levetiracetam-Analoga Seletacetam und Brivaracetam, welche ihre Wirkung neben der Bindung an SV2A vermutlich auch über Ca^{2+} -Kanäle, bzw. eine Natrium-Kanal-Blockade entfalten, müssten hinsichtlich ihrer potentiellen Neurotoxizität untersucht werden, da diese zusätzlichen Mechanismen in Voruntersuchungen mit den oben genannten Antiepileptika mit einer deutlichen neuronalen Schädigung vergesellschaftet waren. [180, 181]

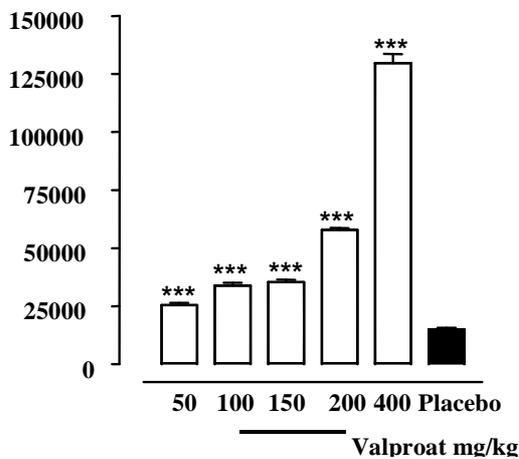
Score der Neurodegeneration



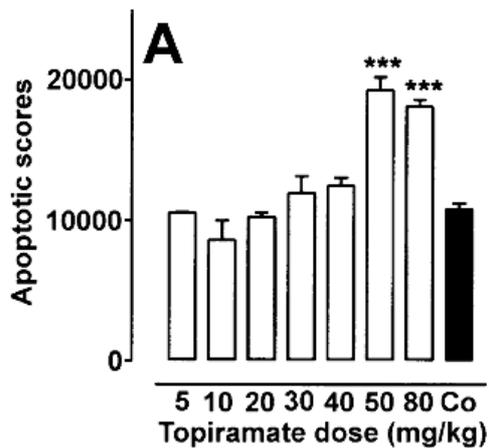
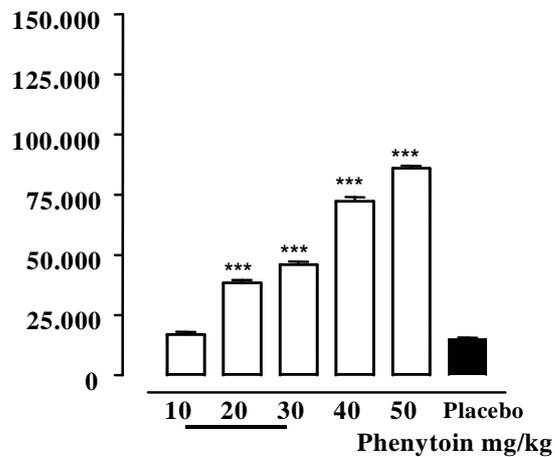
Score der Neurodegeneration



Score der Neurodegeneration



Score der Neurodegeneration



Score der Neurodegeneration

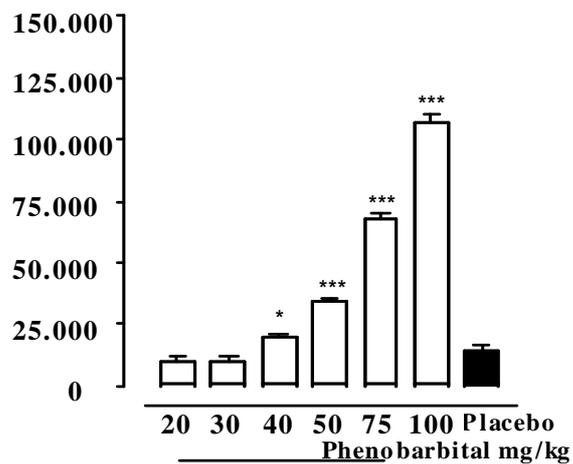


Abbildung 10 - Vergleich des neurodegenerativen Effekts von SUL und LEV mit dem anderer Antiepileptika. Die Daten beziehen sich auf Versuche an 7 Tage alten Ratten, denen SUL (25-300 mg/kg), LEV(5-100 mg/kg), Valproat (50-400 mg/kg) , Phenytoin (10-50 mg/kg), Topiramat (3-80 mg/kg), Phenobarbital (20-100mg/kg) oder Placebo i.p. injiziert wurde. Angegeben sind die Scores der Neurodegeneration in Zellen/mm³ in Bezug zur Dosierung des jeweiligen Pharmakons. SUL zeigt innerhalb seiner therapeutischen Breite ein Ausmaß an Neurodegeneration, das mit dem von Phenobarbital und Phenytoin vergleichbar ist. LEV weist bei vergleichender Betrachtung dieser sechs Antiepileptika das vorteilhafteste Profil auf [55, 190].

4.5. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und klinische Relevanz

Nach Auswertung aller Ergebnisse dieser Arbeit stellt sich die folgende Frage: Kann man die tierexperimentellen Daten auf den Menschen übertragen? Verhalten sich die untersuchten Pharmaka im humanen Gehirn genauso wie im Rattenhirn?

Der Untergang einer bestimmten Anzahl an Neuronen führt nicht zwangsläufig zu neurologischen Auffälligkeiten, die Veränderungen sind meist eher subtil und werden oft klinisch nicht auffällig. Eine definitive Antwort auf diese Fragen könnte nur die, nicht durchführbare, histologische Untersuchung der Hirne behandelter Patienten liefern. Es ist daher notwendig, von Beobachtungen in angrenzenden Bereichen Schlussfolgerungen zu ziehen.

Ein naheliegendes Vergleichsobjekt ist die apoptotische Neurodegeneration durch Ethanol und das resultierende fetale Alkoholsyndrom. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.3.3.3), besitzt Ethanol als GABA_A-Rezeptor-Agonist und NMDA-Rezeptor-Antagonist ein hohes Potential, apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratten zu induzieren. Das klinische Korrelat sind Kinder, die nicht nur morphologische Auffälligkeiten, wie z.B. faziale Dysmorphien, Mikrozephalie und eine verminderte Hirnmasse, sondern auch lebenslange psychische und Verhaltensstörungen, angefangen von ADHS über Lernschwierigkeiten, bis hin zu mentaler Retardierung, Psychosen und Depressionen aufweisen können [54].

4.5.1. Sultiam

Auch andere Substanzen, wie Antiepileptika (z.B. Phenytoin) und Narkotika können, wie beschrieben, zu fetalen neuronalen Schäden beim Menschen führen.

Da SUL, zumindest teilweise, über ähnliche Mechanismen wie z.B. Phenytoin wirkt, nämlich als Natriumkanal-Blocker, könnte man daraus auch auf eine mögliche Schädigung humaner Feten bei Einnahme von SUL in der Schwangerschaft bzw. der Kinder beim Einsatz im Kleinkindalter schließen.

Wirrell et al. berichten unter der Einnahme von SUL über die Verminderung der kognitiven Funktionen bei Kindern mit benigner Temporallappenepilepsie [226]. Ein Einfluss von SUL auf Hirnregionen, die für kognitive Funktionen mitverantwortlich sind liegt somit nahe. Ob die Gabe von SUL im frühen Kindesalter aufgrund der neurotoxischen Wirkung zu bleibenden kognitiven Einschränkungen führt, ist jedoch bislang in klinischen Studien nicht untersucht worden.

Zusammenfassend muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der Einsatz von SUL im frühen Kindesalter genauestens überdacht werden. Die häufigsten Einsatzgebiete bei Kindern im Alter von unter 3 Jahren, wie z.B. das West-Syndrom und andere therapieresistente Epilepsien, sind davon betroffen. Der Einsatz von SUL zur Therapie der Rolando-Epilepsie, welche vorwiegend zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr auftritt, dürfte theoretisch unproblematischer sein, da diese Altersgruppe nicht mehr in die vulnerable Phase des rapiden Hirnwachstums fällt.

4.5.2. Levetiracetam

Beim Menschen beinhaltet die Phase des rapiden Hirnwachstums auch die Zeitspanne im Leben des Menschen mit der höchsten Inzidenz an Krampfanfällen. Medikamente, die in dieser Zeit ohne das Risiko eines gesteigerten neuronalen Untergangs angewendet werden können, sind sehr wertvoll und LEV könnte nach aktueller Studienlage eines davon sein.

Da LEV bezüglich des Wirkmechanismus keiner der Substanzen ähnelt, die beim Menschen neurotoxische Effekte im Gehirn haben, bleibt zu vermuten, dass es hier ebenso keine Neurotoxizität entfaltet.

LEV verursachte in den Experimenten dieser Arbeit in keiner der getesteten Dosierungen eine Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte. In anderen Tierexperimenten wurden antikonvulsiv wirksame Dosierungen von 5,4-96 mg/kg ohne toxische Effekte beschrieben.

Beim Menschen wird mit einer Dosierung von 15-45 mg/kg/d KG ein Plasmaspiegel von durchschnittlich 43µg/ml erreicht. Ratten benötigen, um gleich hohe Spiegel zu erzielen höhere Dosierungen, da sie das Pharmakon schneller aus dem Blutkreislauf eliminieren [203]. Bislang ist nicht bekannt, ob die, durch die langsamere Elimination bedingte, verlängerte Einwirkzeit beim Menschen zu einer Neurodegeneration führen kann.

Hinsichtlich der guten Therapieergebnisse und des relativ nebenwirkungsarmen Profils von LEV im frühen Kindesalter [108, 110, 111, 129, 130, 227] wäre eine Erweiterung der Anwendungserlaubnis durchaus zu unterstützen. Insbesondere die zunehmende Anwendung von LEV in der Neonatalperiode, einer für das Gehirn sehr vulnerablen Phase der Entwicklung, scheint in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse befürwortbar.

Nach aktueller Datenlage, die Hirnentwicklung des ungeborenen Kindes betreffend, scheint die Anwendung von LEV auch in der Schwangerschaft möglich.

Der milde, jedoch signifikante neurotoxische Effekt von LEV bei gleichzeitig bestehender Krampfaktivität lässt am Einsatz von LEV als Akutmedikament z.B. zur Behandlung eines

Status epilepticus im frühen Kindesalter zweifeln, obwohl sich Berichte über erfolgreiche Therapieversuche mit dieser Substanz mehren [118, 119, 228-232]. Momentan ist LEV im klinischen pädiatrischen Alltag kein Medikament zu akuten Therapie von prolongierten Krampfanfällen und des Status epilepticus. Es wird vielmehr zur Anfallsprophylaxe verwendet, so dass man davon ausgehen kann, dass das Pharmakon vorwiegend am anfallsfreien Hirn wirkt und somit, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, keinen neurotoxischen Effekt entwickelt. Bei einer möglichen Erweiterung der Anwendungserlaubnis von LEV für die Behandlung des akuten SE im frühen Kindesalter ist auch zu berücksichtigen, dass die neurotoxische Potenz von LEV unter Krampfaktivität immer noch bedeutend geringer ist als die von Diazepam oder Phenobarbital [39] und in etwa vergleichbar ist mit der von Topiramate [13, 190], einer Substanz, die ebenfalls häufig als Second-Line-Medikament zur Behandlung therapierefraktärer Anfälle im frühen Kindes- und Neugeborenenalter eingesetzt wird.

LEV wirkt in chronischen Epilepsie-Tiermodellen krankheitsmodifizierend auf die Ausbildung von Anfällen nach Kindling und auf die späteren spontan auftretenden komplex-fokalen Anfälle. Ob das Medikament auch beim Menschen nach initialem Trauma oder bei häufig wiederkehrenden Anfällen eingesetzt werden kann, um eine Folgeepilepsie beeinflussen, bzw. um die evtl. schon bestehenden Anfälle zu behandeln, ist bislang noch unklar.

5. Zusammenfassung und Ziele

Krampfanfälle und Epilepsien zählen zu den häufigsten neurologischen Krankheitsbildern in der Pädiatrie. Das erste Lebensjahr, die Altersspanne mit der höchsten Inzidenz für Krampfanfälle, liegt genau einer Phase erhöhter zerebraler Vulnerabilität, der Periode des rapiden Hirnwachstums. In dieser Phase können, wie gezeigt wurde, sowohl Krampfanfälle als auch deren Therapie mittels antiepileptisch wirksamer Pharmaka zu neuronalen Zelluntergängen führen. Es ist deshalb von großer Bedeutung, die verwendeten Pharmaka genau auf ihre potentielle Neurotoxizität hin zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit zwei, im klinischen Alltag gebräuchlichen Antiepileptika, Sultiam und Levetiracetam.

Die vorliegenden Versuche mit dem etablierten Antiepileptikum Sultiam demonstrieren einen dosis-, alters- und zeitabhängigen neurotoxischen Effekt im unreifen Gehirn der Spezies Ratte, der durch den Wirkmechanismus des Medikamentes, eine durch Carboanhydrase-Hemmung induzierte Blockade des Natrium-Kanals, erklärbar ist. Der proapoptotische Effekt zeigte sich ab einer Dosierung von 100 mg/kg KG. Diese Dosierung liegt innerhalb der bei Ratten antikonvulsiv wirksamen Dosisspanne von 25-200 mg/kg KG.

Aufgrund des dem Phenytoin und Valproat äquivalenten Wirkmechanismus kann bei zuvor nachgewiesener apoptotischer Neurodegeneration bei diesen beiden Substanzen auch hier von Apoptose als Schädigungsmechanismus ausgegangen werden. Im Vergleich mit anderen Antiepileptika ist das durch SUL ausgelöste Ausmaß der Neurotoxizität vergleichbar mit dem von Phenobarbital und Phenytoin. Die Indikation für einen Einsatz des Medikaments in der Schwangerschaft und im Kleinkindalter sollte daher sehr streng überdacht werden.

Levetiracetam, eine Antiepileptikum der jüngeren Generation zeigte in der vorliegenden Arbeit, im antikonvulsiv wirksamen Dosierungsbereich, keine neurodegenerativen Effekte im unreifen Gehirn der Ratte. Die Ergebnisse bestärken die Annahme, dass LEV einen Wirkmechanismus aufweist, der sich von anderen Antiepileptika unterscheidet und liefern eine Basis für weitere Untersuchungen bezüglich der Möglichkeit, LEV auch in der Behandlung neonataler und frühkindlicher Krampfleiden zu etablieren.

Berücksichtigt man die Ergebnisse bezüglich der Interaktion von LEV mit dem präsynaptischen Vesikelprotein SV2A, so erscheint eine Fokussierung weiterer Forschungen auf diese Molekülgruppe ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung von Medikamenten zu sein, die die physiologische synaptische Neurotransmission nicht beeinflussen.

Die zuvor angenommene Tatsache, dass LEV seine Wirkung am SV2A-Protein nur unter pathophysiologischen Bedingungen entfaltet, könnte möglicherweise die Beobachtung erklären, dass LEV alleinig unter Krampfaktivität einen geringen, jedoch signifikanten neurotoxischen Effekt besitzt. Um einen sicheren Einsatz in der Pädiatrie zu gewährleisten, müssten sich hier weiterführende Studien anschließen.

Wie erläutert wurde besitzt LEV nach aktueller Studienlage vermutlich einen antiepileptogenen, bzw. krankheitsmodifizierenden Effekt, der ebenfalls in weiteren Untersuchungen verifiziert werden sollte.

Zusammenfassend erlauben und erfordern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine weitergehende Erforschung der antiepileptischen Therapiemöglichkeiten von Levetiracetam vor allem auch im frühen Kindesalter mit Hilfe randomisierter, klinischer Studien.

6. Literaturverzeichnis

1. Friedman, M.J. and G.Q. Sharieff, *Seizures in children*. *Pediatr Clin North Am*, 2006. **53**(2): p. 257-77.
2. Hauser, W.A., *The prevalence and incidence of convulsive disorders in children*. *Epilepsia*, 1994. **35 Suppl 2**: p. S1-6.
3. Speer, C.P. and M. Gahr, *Pädiatrie*. Vol. 2. 2005: Springer Verlag.
4. Siemes, H. and B. Bourgeois, *Anfälle und Epilepsien im Kindesalter*. 2001, Stuttgart, New York: Thieme. 381.
5. Sutula, T.P., J. Hagen, and A. Pitkanen, *Do epileptic seizures damage the brain?* *Curr Opin Neurol*, 2003. **16**(2): p. 189-95.
6. Hermann, B., et al., *The neurodevelopmental impact of childhood-onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function*. *Epilepsia*, 2002. **43**(9): p. 1062-71.
7. Austin, J.K. and D.W. Dunn, *Progressive behavioral changes in children with epilepsy*. *Prog Brain Res*, 2002. **135**: p. 419-27.
8. Jokeit, H. and A. Ebner, *Effects of chronic epilepsy on intellectual functions*. *Prog Brain Res*, 2002. **135**: p. 455-63.
9. Lynch, M., et al., *Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity*. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(7): p. 2252-64.
10. Stafstrom, C.E., *Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain*. *Prog Brain Res*, 2002. **135**: p. 377-90.
11. LaRoche, S.M. and S.L. Helmers, *The new antiepileptic drugs: scientific review*. *Jama*, 2004. **291**(5): p. 605-14.
12. Rogawski, M.A. and W. Loscher, *The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions*. *Nat Med*, 2004. **10**(7): p. 685-92.
13. Kaindl, A.M., et al., *Antiepileptic drugs and the developing brain*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(4): p. 399-413.
14. Farwell, J.R., et al., *Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(6): p. 364-9.
15. Sulzbacher, S., et al., *Late cognitive effects of early treatment with phenobarbital*. *Clin Pediatr (Phila)*, 1999. **38**(7): p. 387-94.
16. Fairgrieve, S.D., et al., *Population based, prospective study of the care of women with epilepsy in pregnancy*. *Bmj*, 2000. **321**(7262): p. 674-5.
17. Adab, N., *Birth defects and epilepsy medication*. *Expert Rev Neurother*, 2006. **6**(6): p. 833-45.
18. Pennell, P.B., *Antiepileptic drug pharmacokinetics during pregnancy and lactation*. *Neurology*, 2003. **61**(6 Suppl 2): p. S35-42.
19. Karnad, D.R. and K.K. Guntupalli, *Neurologic disorders in pregnancy*. *Crit Care Med*, 2005. **33**(10 Suppl): p. S362-71.
20. Teramo, K., et al., *Fetal heart rate during a maternal grand mal epileptic seizure*. *J Perinat Med*, 1979. **7**(1): p. 3-6.
21. Yerby, M.S., *The use of anticonvulsants during pregnancy*. *Semin Perinatol*, 2001. **25**(3): p. 153-8.
22. Fonager, K., et al., *Anti-epileptic drugs and intrauterine growth*. *Acta Neurol Scand*, 2001. **104**(5): p. 323-4.
23. Tomson, T. and D. Battino, *Teratogenicity of antiepileptic drugs: state of the art*. *Curr Opin Neurol*, 2005. **18**(2): p. 135-40.
24. Kaneko, S., *Epilepsy, pregnancy, and the child*. *Epilepsia*, 2000. **41 Suppl 9**: p. 8-13.
25. Vinten, J., et al., *Neuropsychological effects of exposure to anticonvulsant medication in utero*. *Neurology*, 2005. **64**(6): p. 949-54.
26. Holmes, L.B., et al., *The teratogenicity of anticonvulsant drugs*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(15): p. 1132-8.
27. Meador, K.J., et al., *In utero antiepileptic drug exposure: fetal death and malformations*. *Neurology*, 2006. **67**(3): p. 407-12.
28. Dean, J.C., et al., *Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth*. *J Med Genet*, 2002. **39**(4): p. 251-9.

29. Perucca, E., *Birth defects after prenatal exposure to antiepileptic drugs*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(11): p. 781-6.
30. Tatum, W.O., *In utero antiepileptic drug exposure*. *Expert Rev Neurother*, 2006. **6**(12): p. 1785-7.
31. Wyszynski, D.F., et al., *Increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy*. *Neurology*, 2005. **64**(6): p. 961-5.
32. Kaneko, S., et al., *Teratogenicity of antiepileptic drugs: analysis of possible risk factors*. *Epilepsia*, 1988. **29**(4): p. 459-67.
33. Dansky, L.V., D.S. Rosenblatt, and E. Andermann, *Mechanisms of teratogenesis: folic acid and antiepileptic therapy*. *Neurology*, 1992. **42**(4 Suppl 5): p. 32-42.
34. Ogawa, Y., et al., *Serum folic acid levels in epileptic mothers and their relationship to congenital malformations*. *Epilepsy Res*, 1991. **8**(1): p. 75-8.
35. Tatum, W.O., *Use of antiepileptic drugs in pregnancy*. *Expert Rev Neurother*, 2006. **6**(7): p. 1077-86.
36. Yerby, M.S., *Management issues for women with epilepsy: neural tube defects and folic acid supplementation*. *Neurology*, 2003. **61**(6 Suppl 2): p. S23-6.
37. Jager-Roman, E., et al., *Fetal growth, major malformations, and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid*. *J Pediatr*, 1986. **108**(6): p. 997-1004.
38. Kaneko, S., et al., *Effects of antiepileptic drugs on hGH, TSH, and thyroid hormone concentrations during pregnancy*. *Int J Biol Res Pregnancy*, 1982. **3**(4): p. 148-51.
39. Bittigau, P., M. Sifringer, and C. Ikonomidou, *Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **993**: p. 103-14; discussion 123-4.
40. Dobbing, J. and J. Sands, *Quantitative growth and development of human brain*. *Arch Dis Child*, 1973. **48**(10): p. 757-67.
41. Olney, J.W., et al., *Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. *Brain Pathol*, 2002. **12**(4): p. 488-98.
42. Ikonomidou, C., et al., *Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. *Science*, 1999. **283**(5398): p. 70-4.
43. Olney, J.W., et al., *Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. *Environ Health Perspect*, 2000. **108 Suppl 3**: p. 383-8.
44. Dobbing, J. and J. Sands, *Comparative aspects of the brain growth spurt*. *Early Hum Dev*, 1979. **3**(1): p. 79-83.
45. Bittigau, P. and C. Ikonomidou, *Glutamate in neurologic diseases*. *J Child Neurol*, 1997. **12**(8): p. 471-85.
46. Komuro, H. and P. Rakic, *Modulation of neuronal migration by NMDA receptors*. *Science*, 1993. **260**(5104): p. 95-7.
47. Ikonomidou, C., et al., *Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity*. *J Neurosci*, 1989. **9**(8): p. 2809-18.
48. McDonald, J.W., F.S. Silverstein, and M.V. Johnston, *Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system*. *Brain Res*, 1988. **459**(1): p. 200-3.
49. Kubova, H., et al., *Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat*. *Epilepsia*, 2002. **43 Suppl 5**: p. 54-60.
50. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
51. Ishimaru, M.J., et al., *Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain*. *J Comp Neurol*, 1999. **408**(4): p. 461-76.
52. Dikranian, K., et al., *Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain*. *Neurobiol Dis*, 2001. **8**(3): p. 359-79.
53. Ikonomidou, C., et al., *Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain*. *Biochem Pharmacol*, 2001. **62**(4): p. 401-5.
54. Olney, J.W., et al., *Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide?* *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(3): p. 135-9.
55. Bittigau, P., et al., *Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(23): p. 15089-94.
56. Jevtovic-Todorovic, V., et al., *Early exposure to common anesthetic agents causes widespread*

- neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits*. J Neurosci, 2003. **23**(3): p. 876-82.
57. Ikonomidou, C., et al., *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1056-60.
58. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>.
59. DESITIN-Pharma, H., *Fachinformation*. 2008, Feb.
60. Bast, T., et al., *The influence of sulthiame on EEG in children with benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes (BECTS)*. Epilepsia, 2003. **44**(2): p. 215-20.
61. Engler, F., et al., *Treatment with Sulthiame (Ospolot) in benign partial epilepsy of childhood and related syndromes: an open clinical and EEG study*. Neuropediatrics, 2003. **34**(2): p. 105-9.
62. Doose, H., et al., *Benign partial epilepsy--treatment with sulthiame*. Dev Med Child Neurol, 1988. **30**(5): p. 683-4.
63. Gross-Selbeck, G., *Treatment of "benign" partial epilepsies of childhood, including atypical forms*. Neuropediatrics, 1995. **26**(1): p. 45-50.
64. Kramer, U., et al., *Carbamazepine versus sulthiame in treating benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes*. J Child Neurol, 2002. **17**(12): p. 914-6.
65. Lerman, P. and E. Nussbaum, *The use of sulthiame in myoclonic epilepsy of childhood and adolescence*. Acta Neurol Scand Suppl, 1975. **60**: p. 7-12.
66. Jung, M., K.H. Gabriel, and D. Stolle, *[ESES-syndrom in child- and adolescent psychiatry]*. Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother, 2000. **28**(1): p. 17-24.
67. Wirrell, E., A.W. Ho, and L. Hamiwka, *Sulthiame therapy for continuous spike and wave in slow-wave sleep*. Pediatr Neurol, 2006. **35**(3): p. 204-8.
68. Lerman, P. and T. Lerman-Sagie, *Sulthiame revisited*. J Child Neurol, 1995. **10**(3): p. 241-2.
69. Huppke, P., et al., *Treatment of epilepsy in Rett syndrome*. Eur J Paediatr Neurol, 2007. **11**(1): p. 10-6.
70. Debus, O.M., et al., *Add-on treatment with pyridoxine and sulthiame in 12 infants with West syndrome: an open clinical study*. Seizure, 2002. **11**(6): p. 381-3.
71. Debus, O.M. and G. Kurlemann, *Sulthiame in the primary therapy of West syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled add-on trial on baseline pyridoxine medication*. Epilepsia, 2004. **45**(2): p. 103-8.
72. Battino, D., M. Estienne, and G. Avanzini, *Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs in paediatric patients. Part II. Phenytoin, carbamazepine, sulthiame, lamotrigine, vigabatrin, oxcarbazepine and felbamate*. Clin Pharmacokinet, 1995. **29**(5): p. 341-69.
73. Perucca, E., *Pharmacokinetic interactions with antiepileptic drugs*. Clin Pharmacokinet, 1982. **7**(1): p. 57-84.
74. Morselli, P.L., M. Rizzo, and S. Garattini, *Effect of sulthiame on blood and brain levels of diphenylhydantoin in the rat*. Biochem Pharmacol, 1970. **19**(5): p. 1846-7.
75. Ben-Zeev, B., et al., *Sulthiame in childhood epilepsy*. Pediatr Int, 2004. **46**(5): p. 521-4.
76. Leniger, T., et al., *Carbonic anhydrase inhibitor sulthiame reduces intracellular pH and epileptiform activity of hippocampal CA3 neurons*. Epilepsia, 2002. **43**(5): p. 469-74.
77. Iijima, T., S. Ciani, and S. Hagiwara, *Effects of the external pH on Ca channels: experimental studies and theoretical considerations using a two-site, two-ion model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 654-8.
78. Tang, C.M., M. Dichter, and M. Morad, *Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H+*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6445-9.
79. Madeja, M., C. Wolf, and E.J. Speckmann, *Reduction of voltage-operated sodium currents by the anticonvulsant drug sulthiame*. Brain Res, 2001. **900**(1): p. 88-94.
80. Patsalos, P.N. and P.T. Lascelles, *Changes in regional brain levels of amino acid putative neurotransmitters after prolonged treatment with the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin, phenobarbitone, sodium valproate, ethosuximide, and sulthiame in the rat*. J Neurochem, 1981. **36**(2): p. 688-95.
81. Ziemann, U., *TMS and drugs*. Clin Neurophysiol, 2004. **115**(8): p. 1717-29.
82. Ziemann, U., et al., *Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study*. Ann Neurol, 1996. **40**(3): p. 367-78.

83. Siniatchkin, M., et al., *A single dose of sulthiame induces a selective increase in resting motor threshold in human motor cortex: A transcranial magnetic stimulation study*. *Epilepsy Res*, 2006. **72**(1): p. 18-24.
84. Masuda, Y., et al., *Differential antagonisms of anticonvulsants to various components of maximal seizures induced by electroshock or pentylenetetrazol in mice*. *J Pharmacobiodyn*, 1980. **3**(10): p. 526-31.
85. Song, H.K., et al., *Effects of single and repeated administration of sulthiame on amygdaloid kindled seizures in rats*. *Epilepsy Res*, 1997. **27**(2): p. 81-7.
86. Shorvon, S.D. and K. van Rijckevorsel, *A new antiepileptic drug*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **72**(4): p. 426-9.
87. Koskiniemi, M., et al., *Piracetam relieves symptoms in progressive myoclonus epilepsy: a multicentre, randomised, double blind, crossover study comparing the efficacy and safety of three dosages of oral piracetam with placebo*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998. **64**(3): p. 344-8.
88. UCB, S.A., *Keppra - Fachinformation*. 2004.
89. Cohen, J., *Levetiracetam monotherapy for primary generalised epilepsy*. *Seizure*, 2003. **12**(3): p. 150-3.
90. Mohanraj, R., et al., *Levetiracetam in refractory epilepsy: a prospective observational study*. *Seizure*, 2005. **14**(1): p. 23-7.
91. Berkovic, S.F., et al., *Placebo-controlled study of levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy*. *Neurology*, 2007.
92. Gambardella, A., et al., *Monotherapy for partial epilepsy: focus on levetiracetam*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2008. **4**(1): p. 33-8.
93. Villanueva, V., et al., *[Open-label, prospective and observational study of efficacy and tolerability with levetiracetam during one year of follow-up.]*. *Neurologia*, 2007. **22**(6): p. 348-53.
94. Boon, P., et al., *Dose-response effect of levetiracetam 1000 and 2000 mg/day in partial epilepsy*. *Epilepsy Res*, 2002. **48**(1-2): p. 77-89.
95. Zesiewicz, T.A., et al., *Open-label pilot study of levetiracetam (Keppra) for the treatment of chorea in Huntington's disease*. *Mov Disord*, 2006. **21**(11): p. 1998-2001.
96. Meco, G., et al., *Levetiracetam in tardive dyskinesia*. *Clin Neuropharmacol*, 2006. **29**(5): p. 265-8.
97. Konitsiotis, S., et al., *Levetiracetam in tardive dyskinesia: An open label study*. *Mov Disord*, 2006.
98. Sullivan, K.L., R.A. Hauser, and T.A. Zesiewicz, *Levetiracetam for the treatment of essential tremor*. *Mov Disord*, 2005. **20**(5): p. 640.
99. Perez-Ceballos, M.A., et al., *[Use of antiepileptic drugs in bipolar disorder]*. *Actas Esp Psiquiatr*, 2006. **34**(1): p. 55-64.
100. Muralidharan, A. and Z. Bhagwagar, *Potential of levetiracetam in mood disorders: a preliminary review*. *CNS Drugs*, 2006. **20**(12): p. 969-79.
101. Papp, L.A., *Safety and efficacy of levetiracetam for patients with panic disorder: results of an open-label, fixed-flexible dose study*. *J Clin Psychiatry*, 2006. **67**(10): p. 1573-6.
102. Zhang, W., K.M. Connor, and J.R. Davidson, *Levetiracetam in social phobia: a placebo controlled pilot study*. *J Psychopharmacol*, 2005. **19**(5): p. 551-3.
103. Tan, M.J. and R.E. Appleton, *Efficacy and tolerability of levetiracetam in children aged 10 years and younger: a clinical experience*. *Seizure*, 2004. **13**(3): p. 142-5.
104. Lagae, L., G. Buyse, and B. Ceulemans, *Clinical experience with levetiracetam in childhood epilepsy: an add-on and mono-therapy trial*. *Seizure*, 2005. **14**(1): p. 66-71.
105. Glauser, T.A., et al., *Double-blind placebo-controlled trial of adjunctive levetiracetam in pediatric partial seizures*. *Neurology*, 2006. **66**(11): p. 1654-60.
106. Neuwirth, M., et al., *[Experience with levetiracetam in childhood epilepsy]*. *Ideggyogy Sz*, 2006. **59**(5-6): p. 179-82.
107. Hadjiloizou, S.M. and B.F. Bourgeois, *Antiepileptic drug treatment in children*. *Expert Rev Neurother*, 2007. **7**(2): p. 179-93.
108. Callenbach, P.M., et al., *Add-on levetiracetam in children and adolescents with refractory epilepsy: results of an open-label multi-centre study*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2008. **12**(4): p. 321-7.
109. Khurana, D.S., et al., *Levetiracetam monotherapy in children with epilepsy*. *Pediatr Neurol*, 2007. **36**(4): p. 227-30.
110. Perry, S., P. Holt, and M. Benatar, *Levetiracetam versus carbamazepine monotherapy for partial epilepsy in children less than 16 years of age*. *J Child Neurol*, 2008. **23**(5): p. 515-9.

111. Chung, A.M. and L.S. Eiland, *Use of second-generation antiepileptic drugs in the pediatric population*. Paediatr Drugs, 2008. **10**(4): p. 217-54.
112. Sharpe, D.V., et al., *Levetiracetam monotherapy in juvenile myoclonic epilepsy*. Seizure, 2008. **17**(1): p. 64-8.
113. Noachtar, S., et al., *Levetiracetam for the treatment of idiopathic generalized epilepsy with myoclonic seizures*. Neurology, 2008. **70**(8): p. 607-16.
114. Kasteleijn-Nolst Trenite, D.G., et al., *Photosensitive epilepsy: a model to study the effects of antiepileptic drugs. Evaluation of the piracetam analogue, levetiracetam*. Epilepsy Res, 1996. **25**(3): p. 225-30.
115. Verrotti, A., et al., *Levetiracetam monotherapy for children and adolescents with benign rolandic seizures*. Seizure, 2007.
116. Rupprecht, S., et al., *Levetiracetam as a treatment option in non-convulsive status epilepticus*. Epilepsy Res, 2006.
117. Rossetti, A.O. and E.B. Bromfield, *Determinants of success in the use of oral levetiracetam in status epilepticus*. Epilepsy Behav, 2006.
118. Abend, N.S. and D.J. Dlugos, *Treatment of refractory status epilepticus: literature review and a proposed protocol*. Pediatr Neurol, 2008. **38**(6): p. 377-90.
119. Abend, N.S., et al., *Intravenous Levetiracetam Terminates Refractory Focal Status Epilepticus*. Neurocrit Care, 2008.
120. Mikati, M.A. and A.N. Shamseddine, *Management of Landau-Kleffner syndrome*. Paediatr Drugs, 2005. **7**(6): p. 377-89.
121. Conry, J.A., *Pharmacologic treatment of the catastrophic epilepsies*. Epilepsia, 2004. **45 Suppl 5**: p. 12-6.
122. De Los Reyes, E.C., et al., *Levetiracetam in the treatment of Lennox-Gastaut syndrome*. Pediatr Neurol, 2004. **30**(4): p. 254-6.
123. Hwang, H. and K.J. Kim, *New antiepileptic drugs in pediatric epilepsy*. Brain Dev, 2008. **30**(9): p. 549-55.
124. Gumus, H., S. Kumandas, and H. Per, *Levetiracetam monotherapy in newly diagnosed cryptogenic West syndrome*. Pediatr Neurol, 2007. **37**(5): p. 350-3.
125. Brighina, F., et al., *Levetiracetam in the prophylaxis of migraine with aura: a 6-month open-label study*. Clin Neuropharmacol, 2006. **29**(6): p. 338-42.
126. Miller, G.S., *Efficacy and safety of levetiracetam in pediatric migraine*. Headache, 2004. **44**(3): p. 238-43.
127. Awaad, Y., A.M. Michon, and S. Minarik, *Use of levetiracetam to treat tics in children and adolescents with Tourette syndrome*. Mov Disord, 2005. **20**(6): p. 714-8.
128. Grosso, S., et al., *Efficacy and safety of levetiracetam in infants and young children with refractory epilepsy*. Seizure, 2007. **16**(4): p. 345-50.
129. Krief, P., K. Li, and J. Maytal, *Efficacy of levetiracetam in children with epilepsy younger than 2 years of age*. J Child Neurol, 2008. **23**(5): p. 582-4.
130. Perry, M.S. and M. Benatar, *Efficacy and tolerability of levetiracetam in children younger than 4 years: a retrospective review*. Epilepsia, 2007. **48**(6): p. 1123-7.
131. Shoemaker, M.T. and J.S. Rotenberg, *Levetiracetam for the treatment of neonatal seizures*. J Child Neurol, 2007. **22**(1): p. 95-8.
132. Hmaimess, G., et al., *Levetiracetam in a neonate with malignant migrating partial seizures*. Pediatr Neurol, 2006. **34**(1): p. 55-9.
133. C. Bußmann, A.A., G Rmamantani, D Rating, T Bast, *Levetiracetam in neonatal seizures*. Neuropediatrics, 2006. **37**.
134. Tomson, T., et al., *Pharmacokinetics of levetiracetam during pregnancy, delivery, in the neonatal period, and lactation*. Epilepsia, 2007. **48**(6): p. 1111-6.
135. Hunt, S., et al., *Levetiracetam in pregnancy: preliminary experience from the UK Epilepsy and Pregnancy Register*. Neurology, 2006. **67**(10): p. 1876-9.
136. Patsalos, P.N., *Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics*. Pharmacol Ther, 2000. **85**(2): p. 77-85.
137. Radtke, R.A., *Pharmacokinetics of levetiracetam*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 4**: p. 24-7.

138. Patsalos, P.N., *Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(11): p. 707-724.
139. Pellock, J.M., et al., *Pharmacokinetic study of levetiracetam in children*. Epilepsia, 2001. **42**(12): p. 1574-9.
140. Johannessen, S.I., G. Helde, and E. Brodtkorb, *Levetiracetam concentrations in serum and in breast milk at birth and during lactation*. Epilepsia, 2005. **46**(5): p. 775-7.
141. Allegaert, K., et al., *Levetiracetam pharmacokinetics in neonates at birth*. Epilepsia, 2006. **47**(6): p. 1068-9.
142. Weintraub, D., et al., *Psychiatric and behavioral side effects of the newer antiepileptic drugs in adults with epilepsy*. Epilepsy Behav, 2007. **10**(1): p. 105-10.
143. Koubeissi, M.Z., et al., *Tolerability and efficacy of oral loading of levetiracetam*. Neurology, 2008. **70**(22 Pt 2): p. 2166-70.
144. Ben-Menachem, E. and U. Falter, *Efficacy and tolerability of levetiracetam 3000 mg/d in patients with refractory partial seizures: a multicenter, double-blind, responder-selected study evaluating monotherapy*. European Levetiracetam Study Group. Epilepsia, 2000. **41**(10): p. 1276-83.
145. Michaelides, C., et al., *Tolerability and dosing experience of intravenous levetiracetam in children and infants*. Epilepsy Res, 2008.
146. Vigeveno, F., *Levetiracetam in pediatrics*. J Child Neurol, 2005. **20**(2): p. 87-93.
147. Zona, C., et al., *Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents*. Seizure, 2001. **10**(4): p. 279-86.
148. Lukyanetz, E.A., V.M. Shkryl, and P.G. Kostyuk, *Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam*. Epilepsia, 2002. **43**(1): p. 9-18.
149. Niespodziany, I., H. Klitgaard, and D.G. Margineanu, *Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca(2+) current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices*. Neurosci Lett, 2001. **306**(1-2): p. 5-8.
150. Pisani, A., et al., *Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine*. Epilepsia, 2004. **45**(7): p. 719-28.
151. Madeja, M., et al., *Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action?* Neuropharmacology, 2003. **45**(5): p. 661-71.
152. Rigo, J.M., et al., *The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(5): p. 659-72.
153. Margineanu, D.G. and H. Klitgaard, *Levetiracetam has no significant gamma-aminobutyric acid-related effect on paired-pulse interaction in the dentate gyrus of rats*. Eur J Pharmacol, 2003. **466**(3): p. 255-61.
154. Margineanu, D.G. and E. Wulfert, *Inhibition by levetiracetam of a non-GABAA receptor-associated epileptiform effect of bicuculline in rat hippocampus*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(6): p. 1146-50.
155. Sills, G.J., et al., *Neurochemical studies with the novel anticonvulsant levetiracetam in mouse brain*. Eur J Pharmacol, 1997. **325**(1): p. 35-40.
156. Kuzniecky, R., et al., *Levetiracetam has no acute effects on brain gamma-aminobutyric acid levels*. Epilepsy Behav, 2008. **12**(2): p. 242-4.
157. Yang, X.F., A. Weisenfeld, and S.M. Rothman, *Prolonged Exposure to Levetiracetam Reveals a Presynaptic Effect on Neurotransmission*. Epilepsia, 2007.
158. Carunchio, I., et al., *Modulation of AMPA Receptors in Cultured Cortical Neurons Induced by the Antiepileptic Drug Levetiracetam*. Epilepsia, 2007.
159. Nagarkatti, N., L.S. Deshpande, and R.J. DeLorenzo, *Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture*. Neurosci Lett, 2008. **436**(3): p. 289-93.
160. Lee, C.H., et al., *PKA-mediated phosphorylation is a novel mechanism for levetiracetam, an antiepileptic drug, activating ROMK1 channels*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(2): p. 225-35.
161. Lynch, B.A., et al., *The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9861-6.
162. Janz, R. and T.C. Sudhof, *SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family*. Neuroscience, 1999. **94**(4): p. 1279-90.

163. Matveeva, E.A., et al., *Levetiracetam prevents kindling-induced asymmetric accumulation of hippocampal 7S SNARE complexes*. Epilepsia, 2008.
164. Janz, R., et al., *SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release*. Neuron, 1999. **24**(4): p. 1003-16.
165. Crowder, K.M., et al., *Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15268-73.
166. Noyer, M., et al., *The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes*. Eur J Pharmacol, 1995. **286**(2): p. 137-46.
167. Birnstiel, S., E. Wulfert, and S.G. Beck, *Levetiracetam (ucb L059) affects in vitro models of epilepsy in CA3 pyramidal neurons without altering normal synaptic transmission*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **356**(5): p. 611-8.
168. Klitgaard, H., *Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs?* Epilepsia, 2001. **42 Suppl 4**: p. 13-8.
169. Gillard, M., P. Chatelain, and B. Fuks, *Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein*. Eur J Pharmacol, 2006. **536**(1-2): p. 102-8.
170. Klitgaard, H., et al., *Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy*. Eur J Pharmacol, 1998. **353**(2-3): p. 191-206.
171. Loscher, W. and D. Honack, *Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats*. Eur J Pharmacol, 1993. **232**(2-3): p. 147-58.
172. Gower, A.J., et al., *ucb L059, a novel anticonvulsant drug: pharmacological profile in animals*. Eur J Pharmacol, 1992. **222**(2-3): p. 193-203.
173. Gower, A.J., et al., *Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy*. Epilepsy Res, 1995. **22**(3): p. 207-13.
174. Ji-qun, C., et al., *Long-lasting antiepileptic effects of levetiracetam against epileptic seizures in the spontaneously epileptic rat (SER): differentiation of levetiracetam from conventional antiepileptic drugs*. Epilepsia, 2005. **46**(9): p. 1362-70.
175. Vinogradova, L.V. and C.M. van Rijn, *Anticonvulsive and antiepileptogenic effects of levetiracetam in the audiogenic kindling model*. Epilepsia, 2008. **49**(7): p. 1160-8.
176. Loscher, W., D. Honack, and C. Rundfeldt, *Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(2): p. 474-9.
177. Stratton, S.C., et al., *Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model*. Epilepsy Res, 2003. **53**(1-2): p. 95-106.
178. Bastlund, J.F., D. Berry, and W.P. Watson, *Pharmacological and histological characterisation of nicotine-kindled seizures in mice*. Neuropharmacology, 2005. **48**(7): p. 975-83.
179. Dedeurwaerdere, S., et al., *Chronic levetiracetam treatment early in life decreases epileptiform events in young GAERS, but does not prevent the expression of spike and wave discharges during adulthood*. Seizure, 2005. **14**(6): p. 403-11.
180. Bennett, B., et al., *Seletracetam (UCB 44212)*. Neurother, 2007. **4**(1): p. 117-22.
181. von Rosenstiel, P., *Brivaracetam (UCB 34714)*. Neurother, 2007. **4**(1): p. 84-7.
182. DeOlmos, J.S. and W.R. Ingram, *An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration*. Brain Res, 1971. **33**(2): p. 523-9.
183. Carlsen, J. and J.S. De Olmos, *A modified cupric-silver technique for the impregnation of degenerating neurons and their processes*. Brain Res, 1981. **208**(2): p. 426-31.
184. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
185. Gundersen, H.J., et al., *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. Apmis, 1988. **96**(5): p. 379-94.
186. Swanson, L., *Structure of the rat brain*. 1992: Elsevier.

187. Sherwood, N. and P. Timiras, *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. 1970: University of California Press, Berkeley: University of California Press.
188. Hörster, F., *Die Neurotoxizität von NMDA-Antagonisten im unreifen Gehirn der Ratte*. 2001.
189. Brodie, M.J. and M.A. Dichter, *Antiepileptic drugs*. N Engl J Med, 1996. **334**(3): p. 168-75.
190. Glier, C., et al., *Therapeutic doses of topiramate are not toxic to the developing rat brain*. Exp Neurol, 2004. **187**(2): p. 403-9.
191. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 677-736.
192. Hansen, H.H., et al., *Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain*. Neurobiol Dis, 2004. **16**(2): p. 440-53.
193. Orłowski, J. and S. Grinstein, *Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22373-6.
194. Bonnet, U., T. Leniger, and M. Wiemann, *Alteration of intracellular pH and activity of CA3-pyramidal cells in guinea pig hippocampal slices by inhibition of transmembrane acid extrusion*. Brain Res, 2000. **872**(1-2): p. 116-24.
195. Skerritt, J.H. and G.A. Johnston, *Inhibition of amino acid transmitter release from rat brain slices by phenytoin and related anticonvulsants*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1983. **10**(5): p. 527-33.
196. Cavalheiro, E.A., *The pilocarpine model of epilepsy*. Ital J Neurol Sci, 1995. **16**(1-2): p. 33-7.
197. Mathern, G.W., et al., *The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy*. Epilepsy Res, 1996. **26**(1): p. 151-61.
198. Leite, J.P., N. Garcia-Cairasco, and E.A. Cavalheiro, *New insights from the use of pilocarpine and kainate models*. Epilepsy Res, 2002. **50**(1-2): p. 93-103.
199. Priel, M.R., N.F. dos Santos, and E.A. Cavalheiro, *Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy*. Epilepsy Res, 1996. **26**(1): p. 115-21.
200. Cavalheiro, E.A., et al., *The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent*. Brain Res, 1987. **465**(1-2): p. 43-58.
201. Klitgaard, H. and A. Matagne, *Levetiracetam suppresses spontaneous seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 2**: p. 19.
202. Klitgaard, H., et al., *Electrophysiological, neurochemical and regional effects of levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. Seizure, 2003. **12**(2): p. 92-100.
203. Glien, M., et al., *Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. Epilepsia, 2002. **43**(4): p. 350-7.
204. Margineanu, D.G., et al., *Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats*. Brain Res Bull, 2008.
205. Oliveira, A.A., et al., *Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic muscarinic system involvement*. Neurosci Lett, 2005. **385**(3): p. 184-8.
206. Oliveira, A.A., et al., *Effects of Levetiracetam in Lipid Peroxidation Level, Nitrite-Nitrate Formation and Antioxidant Enzymatic Activity in Mice Brain After Pilocarpine-Induced Seizures*. Cell Mol Neurobiol, 2007.
207. Sasa, M., *A new frontier in epilepsy: novel antiepileptogenic drugs*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 487-94.
208. van Vliet, E.A., et al., *Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy*. Epilepsia, 2008.
209. Loscher, W., *Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy*. Epilepsy Res, 2002. **50**(1-2): p. 105-23.
210. Amano, K., et al., *Antiepileptic effects of topiramate on amygdaloid kindling in rats*. Epilepsy Res, 1998. **31**(2): p. 123-8.
211. Turski, W.A., et al., *Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine*. Brain Res, 1987. **434**(3): p. 281-305.
212. Leite, J.P. and E.A. Cavalheiro, *Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats*. Epilepsy Res, 1995. **20**(2): p. 93-104.

213. Grotta, J.C. and S. Hickenbottom, *Neuroprotective therapy*. Rev Neurol (Paris), 1999. **155**(9): p. 644-6.
214. Wang, H., et al., *Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage*. Neurocrit Care, 2006. **5**(1): p. 71-8.
215. Hanon, E. and H. Klitgaard, *Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia*. Seizure, 2001. **10**(4): p. 287-93.
216. Leker, R.R. and M.Y. Neufeld, *Anti-epileptic drugs as possible neuroprotectants in cerebral ischemia*. Brain Res Brain Res Rev, 2003. **42**(3): p. 187-203.
217. Rekling, J.C., *Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation*. Neurosci Lett, 2003. **335**(3): p. 167-70.
218. Costa, C., et al., *Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia*. Stroke, 2006. **37**(5): p. 1319-26.
219. Stepien, K., M. Tomaszewski, and S.J. Czuczwar, *Profile of anticonvulsant activity and neuroprotective effects of novel and potential antiepileptic drugs--an update*. Pharmacol Rep, 2005. **57**(6): p. 719-33.
220. Mazarati, A.M., et al., *Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus*. Epilepsy Res, 2004. **58**(2-3): p. 167-74.
221. Pitkanen, A., *Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models*. Epilepsy Res, 2002. **50**(1-2): p. 141-60.
222. Gu, J., et al., *The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(2): p. 334-45.
223. Yan, H.D., et al., *Separation of antiepileptogenic and antiseizure effects of levetiracetam in the spontaneously epileptic rat (SER)*. Epilepsia, 2005. **46**(8): p. 1170-7.
224. Husum, H., et al., *Levetiracetam prevents changes in levels of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y mRNA and of Y1- and Y5-like receptors in the hippocampus of rats undergoing amygdala kindling: implications for antiepileptogenic and mood-stabilizing properties*. Epilepsy Behav, 2004. **5**(2): p. 204-15.
225. Brandt, C., et al., *Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats*. Neuropharmacology, 2007. **53**(2): p. 207-21.
226. Wirrell, E., et al., *Deterioration in cognitive function in children with benign epilepsy of childhood with central temporal spikes treated with sulthiame*. J Child Neurol, 2008. **23**(1): p. 14-21.
227. Specchio, N., et al., *Effects of levetiracetam on EEG abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy*. Epilepsia, 2008. **49**(4): p. 663-9.
228. Zenkov, L.R., K.I. Shevtsov, and N.B. Gubanova, *Levetiracetam (keppra) in the treatment of refractory status epilepticus*. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2007. **107**(5): p. 71-4.
229. Altenmuller, D.M., et al., *Termination of absence status epilepticus by low-dose intravenous levetiracetam*. Epilepsia, 2008. **49**(7): p. 1289-90.
230. Goraya, J.S., et al., *Intravenous levetiracetam in children with epilepsy*. Pediatr Neurol, 2008. **38**(3): p. 177-80.
231. Trabacca, A., et al., *Levetiracetam in nonconvulsive status epilepticus in childhood: a case report*. J Child Neurol, 2007. **22**(5): p. 639-41.
232. Patel, N.C., et al., *The use of levetiracetam in refractory status epilepticus*. Seizure, 2006. **15**(3): p. 137-41.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin	NPY	Neuropeptid Y
ACTH	Adrenocorticotropes Hormos	NT-3	Neurotrophin-3
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit- Hyperaktivitäts-Syndrom	P0-P21	postnatales Alter der Versuchstiere in Tagen
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazol-Propionsäure	PBS	Phosphate Buffered Saline
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	PSE-Modell	Post-Status-Epilepticus-Modell
BNS-Krämpfe	Blitz-Nick-Salaam-Krämpfe	PTZ-Modell	Pentylentetrazol-Krampf-Modell
bp	Basenpaare	SE	Status epilepticus
BRV	Brivaracetam	SEL	Seletracetam
CSWS	continuous spikes and waves during slow sleep	SER-Modell	Modell der spontan epileptischen Ratte
DMCM	Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta- Carbolin-3-Carboxylat	SSSE-Modell	Self-sustaining-status-epilepticus- Modell
ED50	effektive Dosis, bei der 50% der maximalen Wirkung auftritt oder bei 50% der Versuchstiere eine bestimmt Wirkung auftritt	SUL	Sultiam
ESES	electrical status epilepticus during sleep	SV2A	Synaptisches Vesikelprotein 2A
GH	Wachstumshormon	TD 50	Dosierung, bei welcher bei 50% der behandelten Individuen toxische Wirkungen auftreten
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure	TMS	Transkraniale Magnetstimulation
GAERS-Modell	Genetic-Absence-Epilepsy-Rats- from-Strasbourg-Model	TRH	Thyreotropes Hormon
GFAP	Glial fibrillary acidic proein	TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
i.p.	intraperitoneal	ZNS	Zentralnervensystem
IQ	Intelligenzquotient		
KG	Körpergewicht		
kD	Kilodalton		
LEV	Levetiracetam		
MES-Modell	Maximal-Elektroschock-Krampf- Modell		
(+)MK801	(+)5-methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> - dibenzo-cyclohepten-5,10-imine- Maleat (Dizocilpin),		
M \pm SEM	Mittelwert \pm Standardfehler		
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat		
NO	Stickoxid		

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.2. Publikationen

Sulthiame but not levetiracetam exerts neurotoxic effect in the developing rat brain.

(D. Manthey, S. Asimiadou, V. Stefovskaja, A.M. Kaindl, J. Fassbender, C. Ikonomidou, P. Bittigau) Exp. Neurol. 06/2005

Protection with estradiol in developmental models of apoptotic neurodegeneration.

(S. Asimiadou, P. Bittigau, U. Felderhoff-Mueser, D. Manthey, M. Siffringer, S. Pesditschek, M. Dzierko, A.M. Kaindl, M. Pytel, D. Studniarczyk, J.W. Mozrzymas, C. Ikonomidou) Ann Neurol. 08/2005

Antiepileptic drugs and the developing brain.

(A.M. Kaindl., S. Asimiadou, D. Manthey, M. v.d. Hagen, L. Turski and C. Ikonomidou) Cell Mol Life Sci. 01/2006

8.3. Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von April 2003 bis März 2004 in der Abteilung Pädiatrie m. S. Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, im Forschungshaus des Klinikums Westendunter der Leitung von Frau Prof. Dr. Hrissanthi Ikonomidou angefertigt. Hiermit danke ich Frau Prof. Ikonomidou für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Beratung.

Der Dank gilt ferner meiner Betreuerin Frau Dr. med. Petra Bittigau, die mir jederzeit mit ihrem Rat zur Seite stand und die mir mit der kritischen Durchsicht dieser Arbeit eine große Hilfe war. Für die Einführung und Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik danke ich Frau Jessica Fassbender und Frau Dr. Vanya Stefovskaja und Frau Dr. Bittigau. Ebenfalls möchte ich Frau Evelyn Strauß für die Hilfe bei der Durchführung der TUNEL-Färbung danken.

Die angenehme Arbeitsatmosphäre und viele helfende Hände möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ikonomidou, insbesondere Stella Asimiadou, Oliver Polly, Dr. Vanya Stefovskaja und Birte Krutz danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern, meinem Bruder und der Familie Daßinnies für die andauernde Unterstützung und Motivationshilfe während des Studiums und des Zeitraums dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Martin Daßinnies für das Verständnis, die liebevolle moralische Unterstützung und ethische Beratung bedanken. Allen, die meine Anwesenheit in dieser Zeit entbehren mussten gilt mein Dank für ihr Verständnis.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt worden.

Daniela Manthey

Berlin, 17.01.2009