

Aus dem Johannes-Müller-Zentrum für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Blut-Hirn-Schrankenstörung und Entstehung von Epilepsie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ernst Seiffert

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Uwe Heinemann
2. Prof. Dr. Andreas Draguhn
3. Prof. Dr. Heinz Beck

Datum der Promotion: 07.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	Seite 3
2. Einleitung und Zielstellung	Seite 4
3. Methodik	Seite 5-6
4. Ergebnisse und Diskussion	Seite 7-11
5. Literaturverzeichnis	Seite 12-13
6. Originalarbeiten	Seite 14
7. Anteilserklärung	Seite 15
8. Eidesstattliche Erklärung	Seite 16
9. Danksagung	Seite 17
10. Curriculum Vitae	Seite 18

1) Zusammenfassung

Störungen der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sind unter verschiedensten pathologischen Bedingungen sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch beschrieben worden¹. Allerdings ist bisher unklar, wie sich das Eindringen von Substanzen aus dem Blutstrom in das normalerweise abgeschirmte Gehirngewebe auf die Funktion der Nerven- und Gliazellen auswirkt. Insbesondere eine mögliche pathogenetische Rolle von Schrankenstörungen ist kaum untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell für eine gezielte, fokale, atraumatische Öffnung der BHS entwickelt. Dabei kamen in der Literatur beschriebene Gallensalze² zum Einsatz, welche direkt auf die kortikale Oberfläche von Rattengehirnen appliziert wurden. Auf diese Weise gelang es, die BHS auch für große Moleküle aus dem Serum durchlässig zu machen, wobei exemplarisch ein massiver Einstrom von Serum-Albumin in das zerebrale Parenchym nachgewiesen werden konnte. Eine neurotoxische bzw. neuromodulatorische Wirkung der Gallensalze selbst wurde für die verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen.

Bereits zwölf Stunden nach Applikation der Gallensalze *in vivo* zeigte sich in dem betroffenen kortikalen Areal eine prominente Aktivierung von Astrozyten, jedoch kein Hinweis auf eine entzündliche Reaktion oder signifikanten Neuronenverlust. Die Öffnung der BHS verursachte somit nicht die typischen Veränderungen traumatischer Läsionsmodelle³. Elektrophysiologische Messungen in Hirnschnitten zeigten bei ca. 70% der behandelten Tiere nach einer Frist von mindestens vier postoperativen Tagen einen Fokus mit epileptiformer Aktivität. Dagegen wiesen nur 10% der scheinoperierten Kontrollen ähnliche Aktivität auf.

Interessanterweise führte auch die kortikale Applikation einer Albumin-Lösung zur Entstehung eines epileptiformen Erregungsherd. In Hirnschnitten ließ sich eine Zunahme der Erregbarkeit einzelner Neurone unter Einwirkung von Albumin nachweisen. Dabei wurde das Albumin über einen TGF-beta abhängigen Transportprozeß, der sich selektiv hemmen ließ, in Astrozyten aufgenommen. In der Folge war in den behandelten Hirnregionen eine deutliche Reduktion der astrozytären Pufferkapazität für Kaliumionen festzustellen.

In einem anderen Kontext konnte schließlich gezeigt werden, daß epileptische Anfälle, die als unerwünschte Wirkung unter antiviraler Therapie mit Alpha-Interferon auftreten, durch eine vorbestehende BHS-Störung mitbedingt sein können.

Es wurden also zum ersten Mal klare Hinweise dafür geliefert, daß Beeinträchtigungen der BHS direkt an der Entstehung von Epilepsieherden beteiligt sein können. Der zugrundeliegende Pathomechanismus eröffnet hier neue therapeutische Möglichkeiten.

2) Einleitung und Zielstellung

Die Gesamtheit der Mechanismen, welche das physiko-chemische Milieu des Gehirngewebes gegenüber den übrigen Kompartimenten des Körpers abgrenzen, wird heute unter dem Begriff Blut-Hirn-Schranke zusammengefaßt. Lewandowsky⁴ prägte diese Bezeichnung im Jahre 1900, nachdem Paul Ehrlich⁵ 1885 gezeigt hatte, daß hydrophile Farbstoffe, die in den peripheren Blutstrom injiziert werden, sich weder im Gehirn noch im Liquor anreichern. Die herausragende Bedeutung der BHS für die zerebrale Homöostase ist heute allgemein akzeptiert. Dagegen sind pathophysiologische Mechanismen im Zusammenhang mit einer Schrankenstörung bisher wenig erforscht worden. Zwar ist hinreichend bekannt, daß zahlreiche neurologische Erkrankungen wie Epilepsie, zerebrale Ischämien, Blutungen, Hirntumore, Multiple Sklerose und viele andere mit einer gestörten Schrankenfunktion einhergehen⁶, doch genaue Zusammenhänge mit Aetiologie und Pathogenese sowie Einflüsse auf die Prognose der jeweiligen Krankheiten sind weitgehend unklar.

Im Bereich der Epilepsieforschung weisen klinische Daten darauf hin, daß eine Störung der Integrität der BHS an der Entstehung epileptischer Herde zumindest mitbeteiligt sein könnte⁷. So ließen sich in Gehirnen von Patienten mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen fokale Schrankenstörungen nachweisen, die oftmals mit pathologischer Slow-wave-Aktivität im Elektroenzephalogramm (EEG) kolokalisiert waren. Vor diesem Hintergrund ergibt sich als zentrales Thema der vorliegenden Arbeit die Frage, ob Läsionen der BHS ein möglicher Kausalfaktor bei der Epilepsieentstehung sein können.

In den für diese Dissertationsschrift verwendeten Studien wurden hierzu folgende Untersuchungen durchgeführt:

- (1) Anhand eines Tiermodells einer fokal induzierten, atraumatischen Schrankenstörung wurde analysiert, wie sich eine solche gezielte Schädigung der zerebralen Homöostase auf die Funktion der Nervenzellen auswirkt.
- (2) Nachdem Störungen der BHS als Ursache von epileptischer Aktivität identifiziert werden konnten, wurde versucht, die Pathomechanismen aufzuklären, welche der veränderten Nervenzellaktivität nach Schrankenstörung zugrundeliegen, da sich hieraus letztlich mögliche therapeutische Ansatzpunkte ergeben.
- (3) Angesichts der klinischen Beobachtung, daß unter antiviraler Therapie mit Alpha-Interferon epileptische Anfälle auftreten können, wurde untersucht, ob dieses normalerweise nicht-schrankengängige Medikament bei direkter kortikaler Applikation epileptogen wirkt.

3) Methodik

Atraumatische Öffnung der BHS durch Gallensalz-Applikation

Um eine gezielte Läsion der Blut-Hirn-Schranke zu erreichen, wurden physiologische Gallensalze (Dehydrocholin oder Deoxycholin) topisch auf die Hirnoberfläche appliziert (vgl. Greenwood et al.¹). Zu diesem Zweck wurden männliche Wistar-Ratten (180-250g) mit Thiopental (40mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und in einen stereotaktischen Rahmen eingesetzt. Die Haut wurde desinfiziert und mit einem Sagittalschnitt eröffnet. Die Schädelkalotte wurde freigelegt und ein 4 mm durchmessendes Knochenfenster über dem somatosensorischen Kortex gebohrt. Unter einem Operationsmikroskop wurden die Hirnhäute vorsichtig eröffnet, um das Gehirn direkt mit der Gallensalzlösung bzw. im Falle der Kontrollen mit künstlicher zerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF) zu überspülen. Die Applikationsdauer der jeweiligen Substanz betrug 30-60 Minuten. Als Kontrolle wurde im Rahmen einer Schein-Operation eine Hemisphäre nur mit aCSF behandelt. Nach der fokalen Applikation wurde das Knochenfenster vorsichtig verschlossen und die darüberliegende Haut genäht. Es wurden nur solche Ratten für nachfolgende Messungen verwendet, die keine erkennbare traumatische Schädigung oder Blutung an der kortikalen Oberfläche aufwiesen.

Beurteilung der BHS-Integrität und Quantifizierung der BHS-Öffnung

Zur Evaluation der Integrität der BHS wurde den Ratten intraperitoneal der wasserlösliche, mit hoher Affinität an Albumin bindende Farbstoff Evans-Blue injiziert. Zwei Stunden nach Injektion wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne entnommen. Zur Quantifizierung der Extravasation des Farbstoffes wurden zwei Methoden verwendet: 1) Transversalschnitte (0,5mm) wurden in 4%-Paraformaldehydlösung 24 Stunden lang fixiert und anschließend 24 Stunden in 30%-Saccharoselösung gelagert. Dann wurden 50 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 580 nm analysiert. Die Gewebeschnitte wurden unter standardisierten Bedingungen digital fotografiert, so daß die Menge des im Gewebe vorhandenen, fluoreszierenden Evans-Blue-Albumin-Komplexes durch eine Analyse der Farbtintensität in verschiedenen kortikalen Regionen quantifiziert werden konnte. 2) Im zweiten Ansatz wurde die behandelte bzw. scheinoperierte kortikale Region jeweils komplett aus dem Gehirn herauspräpariert, in einem 0,1 molaren Phosphatpuffer (10 µl/mg Gewebe), dem 1% SDS zugesetzt wurde, homogenisiert und zentrifugiert. Die Gewebekonzentration des Evans-Blue-Albumin-Komplexes wurde spektrophotometrisch im Überstand bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Histologie

Für die histologische Aufbereitung wurden die Rattengehirne nach der operativen Behandlung zunächst fixiert, indem die anästhesierten Tiere intrakardial mit Lillie-Fixativ⁸ perfundiert und die Gehirne danach 24 Stunden bei 4 °C in der Fixationslösung gelagert wurden. Anschließend wurden die Gehirne 24 Stunden in 96%-Alkohol gelagert und schließlich in Paraffin eingebettet. In 8-10 µm dicken Transversalschnitten wurden mit Hilfe verschiedener Färbeverfahren bzw. immunhistochemischer Marker Neuronen (MAP2), Astrozyten (GFAP), apoptotische Zellen (VAF und Toluidin-Blau) und Mikrogliazellen (CD40) visualisiert.

Elektrophysiologische Messungen

Für elektrophysiologische Experimente wurden die Ratten anästhesiert, dekapitiert und die Gehirne wurden rasch entnommen. Auf einem Vibratom wurden zügig transversale Schnitte (400 µm) vom somatosensorischen Kortex angefertigt und sogleich in eine befeuchtete, mit Carbogengas (5% CO₂ and 95% O₂) bedampfte Standard-Interface-Kammer transferiert, welche bei 36 °C kontinuierlich mit aCSF perfundiert wurde. Nach mindestens einer Stunde Inkubationszeit wurde mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen. Feldpotentiale wurden mit Hilfe von extrazellulären Glas-Mikroelektroden gemessen, die mit 154 mM NaCl-Lösung gefüllt waren. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration wurde mit ionensensitiven Mikroelektroden wie andernorts beschrieben¹⁰ bestimmt. Intrazelluläre Messungen wurden mit scharfen Mikroelektroden nach bekannter Vorgehensweise⁹ durchgeführt. Die elektrische Stimulation erfolgte mittels bipolarer Stimulationselektroden, welche an der Grenze von grauer und weißer Substanz plaziert wurden.

Pharmaka wurden jeweils durch Hinzufügen zur aCSF-Perfusionslösung appliziert. NMDA-Rezeptoren wurden mit einer 50 µM APV-Lösung blockiert, AMPA-Kainat-Rezeptoren durch 10 µM CNQX-Lösung, GABA-Rezeptoren durch 5 µM Bicucullin-Lösung und Kir-Kanäle durch Bariumchlorid. TGF-beta-Rezeptoren wurden entweder mit einem spezifischen Antikörper oder mit der Substanz SB431542 blockiert.

Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren/Hirnschnitten wurden mittels ANOVA-Analyse quantifiziert. Der Effekt pharmakologischer Agenzien wurde mit dem Wilcoxon Signed Rank Nonparametric Test für verknüpfte Variablen untersucht. P < 0,05 wurde als Grenzwert für statistische Signifikanz verwendet.

4) Ergebnisse und Diskussion

Induktion einer atraumatischen, fokalen BHS-Läsion

Um die pathophysiologischen Konsequenzen einer fokalen Läsion der BHS zu untersuchen, wurde ein Modell für eine atraumatische BHS-Öffnung entwickelt. Dabei wurden Gallensalze *in vivo* lokal auf den somatosensorischen Kortex von Ratten appliziert. Die erfolgreiche Öffnung der BHS wurde durch periphere Injektion des Albumin-bindenden Farbstoffs Evans-Blue eindrucksvoll bestätigt: Ausschließlich in der behandelten Gehirnregion zeigte sich eine deutliche Anfärbung, während das übrige Hirngewebe bei intakter BHS erwartungsgemäß keinen Farbstoff aufnahm. Die quantitative Analyse im Hirnschnitt bzw. im Gehirn-Homogenat erbrachte eine signifikant erhöhte Evans-Blue-Konzentration in behandelten gegenüber scheinoperierten oder unbehandelten Hirnregionen. Dabei ließ sich eine Extravasation des Farbstoffes im Bereich der BHS-Läsion in allen kortikalen Schichten nachweisen, nicht jedoch in der weißen Substanz. Eine signifikante BHS-Öffnung war mindestens eine Stunde nach der Gallensalzapplikation festzustellen und konnte auch nach sechs Tagen noch nachgewiesen werden. Sechzehn Tage nach der Behandlung kam es dagegen nicht mehr zu einer signifikanten Extravasation von Evans-Blue.

Durch einmalige topische Gallensalzapplikation konnte also eine ca. zwei Wochen anhaltende BHS-Öffnung induziert werden. Um eine direkte neurotoxische Wirkung der Gallensalze auszuschließen, wurden intra- und extrazelluläre elektrophysiologische Messungen in Hirnschnitten durchgeführt, welche mit Gallensalz-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen perfundiert wurden. In den für die BHS-Läsion verwendeten Konzentrationen (1-2 mM) bewirkte weder DHC noch DOC eine signifikante Veränderung der neuronalen Aktivität. Erst unter sehr hohen Gallensalzkonzentrationen (10 mM) kam es zu einer Reduktion der Amplitude evozierter Potentiale, nicht aber zu gesteigerter neuronaler Erregbarkeit oder epileptiformen Entladungen.

Elektrophysiologische Aktivität im Kortex nach BHS-Läsion

Zur Beurteilung der Konsequenzen der induzierten BHS-Läsion wurden elektrophysiologische Messungen in Hirnschnitten durchgeführt, die zwischen 2 Stunden und 49 Tage nach Öffnung der BHS angefertigt wurden. In einem unbehandelten Hirnschnitt war im somatosensorischen Kortex folgendes Aktivitätsmuster zu erwarten: Eine kurze Stimulation in der weißen Substanz bewirkt eine schnelle (<50 ms) synaptische Antwort in Form eines Feldpotentials, welches sich aus der Summe der einzelnen schnellen exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP und IPSP) ergibt. Berechnet man die maximale Amplitude

oder das Integral der schnellen Reizantwort (0-50 ms nach Stimulation), so ergibt sich regelhaft ein linearer Anstieg dieser Parameter mit zunehmender Stimulusintensität. Eine solche Input-Output-Kurve (I/O) wurde für Hirnschnitte von behandelten und scheinoperierten Ratten aufgezeichnet. In der behandelten Gruppe ergaben sich hier eine signifikant erhöhte Steigung der I/O-Kurve sowie eine signifikant verkürzte Zeitdauer bis zum Erreichen der maximalen Amplitude. Zusammengenommen sprechen diese Resultate für eine gesteigerte lokale neuronale Erregbarkeit in Hirnregionen mit BHS-Läsion.

Ab dem vierten postoperativen Tag zeigte sich in den mit Gallensalzen behandelten Arealen zusätzlich zu der schnellen evozierten Reizantwort ein verzögertes, paroxysmal nach der »Alles-oder-Nichts-Regel« auftretendes Feldpotential mit unterschiedlicher Latenzzeit (100-300 ms) und Dauer (100-500 ms). Diese Art von Aktivität trat in rund 70% der Hirnschnitte von behandelten Tieren auf und war stets auf die Region der BHS-Läsion begrenzt. Dagegen zeigten nur rund 10% der Gehirnschnitte scheinoperierter Tiere ähnliche verzögerte Nervenzellaktivität. Simultane intra- und extrazelluläre Messungen zeigten, daß die paroxysmale Aktivität synchron in einem großen Bereich der behandelten Gehirnregion generiert wurde. Das Integral der verzögerten neuronalen Aktivität (50-500 ms) war in den Schnitten behandelter Tiere unter allen Stimulusintensitäten signifikant größer als in der scheinoperierten Gruppe. Interessanterweise war die paroxysmale Erregung allerdings gerade bei geringer Reizstärke besonders prononciert. Zusammengenommen zeigten sich somit typische Charakteristika hypersynchroner Aktivität, wie sie in verschiedenen Tiermodellen der Epilepsie^{11,12,13} beschrieben sind.

Paroxysmale neuronale Aktivität konnte auch durch Stimulation kortikaler Bereiche ausgelöst werden, die außerhalb, aber in enger Nachbarschaft zu der BHS-behandelten Hirnregion lagen. Dagegen propagierte die hypersynchrone Erregung selbst nicht in benachbarte, unbehandelte kortikale Regionen. In einigen Fällen waren im Bereich der BHS-Läsion auch spontane, interiktale Nervenzellentladungen zu beobachten, welche in den scheinoperierten Tieren nie auftraten.

Veränderungen der Neurotransmission nach BHS-Öffnung

Durch Einsatz von Antagonisten der wichtigsten synaptischen Rezeptorenklassen im Hirnschnitt wurde die epileptiforme Aktivität nach BHS-Öffnung genauer charakterisiert. Ein Antagonist der AMPA-Kainat-Rezeptoren (CNQX, 10 µM) reduzierte die Amplitude sowohl der schnellen wie auch der verzögerten Feldpotentiale dramatisch (51% bzw. 20% des Ausgangswertes). Der NMDA-Antagonist APV (50 µM) hingegen reduzierte zwar die

Amplitude der verzögerten, pathologischen Aktivität auf 35% des Ausgangswertes, ließ jedoch das schnelle evozierte Feldpotential unverändert. Diese Ergebnisse weisen auf einen unterschiedlichen Entstehungsmechanismus für die schnelle und die verzögerte Erregung hin. Der GABA-A-Rezeptoren-Blocker Bicucullin (5 μ M) induzierte nach Applikation *in vitro* die typischen, in der Literatur beschriebenen langdauernden (bis 1s), hochamplitudigen Feldpotentiale, wobei der Effekt in der mit Gallensalzen behandelten Hirnregion signifikant größer war als in benachbarten Arealen. Daraus ergibt sich, daß die gesteigerte exzitatorische Neurotransmission nach BHS-Läsion offensichtlich noch durch effektive GABA-vermittelte Inhibition eingeschränkt wurde. Interessanterweise zeigte sich der Effekt der Disinhibition erst bei einer kompletten Blockade der GABA-Rezeptoren. Bei inkompletter Blockade war dagegen eine deutliche Reduktion der pathologischen Aktivität (auf 47% des Ausgangswertes) festzustellen. Dies deutet auf eine Beteiligung GABA-vermittelter Chloridströme an der paroxysmalen Aktivität hin. Kombinierte intra- und extrazelluläre Messungen zeigten dementsprechend, daß das paroxysmale Feldpotential in einigen Neuronen mit einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP) zusammenfiel.

Pathomechanismen infolge BHS-Öffnung

Als Ursache für die Entstehung eines Fokus mit epileptiformer Nervenzellaktivität nach experimenteller Öffnung der BHS ist in erster Linie die Exposition des Gehirngewebes gegenüber Substanzen aus dem Blutstrom anzunehmen, die unter physiologischen Bedingungen an der BHS zurückgehalten werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde der somatosensorische Kortex wie oben beschrieben operativ exponiert und lokal mit Blutserum von Ratten superfundiert. Eine Woche nach dieser Behandlung zeigten 67% der Hirnschnitte die gleiche paroxysmale Aktivität, welche nach der Gallensalzbehandlung aufgetreten war. Ebenso bewirkte die lokale Applikation von denaturiertem Serum sowie Serumalbumin in Konzentrationen $>25\%$ des normalen Serumspiegels die Entstehung paroxysmaler Feldpotentiale. Dagegen führte eine Anpassung der Elektrolytkonzentrationen der Perfusionslösung an die Serumwerte nicht zum Auftreten epileptiformer Aktivität.

Diese Ergebnisse deuten auf Serumalbumin als möglichen pathogenetischen Faktor bei der Entstehung pathologischer Nervenzellaktivität nach BHS-Öffnung hin. Um eine Modifikation der BHS durch Albumin selbst auszuschließen, wurde die Permeabilität in der oben beschriebenen Weise durch Evans-Blue-Injektion geprüft: Hier zeigte sich keine signifikant veränderte BHS-Durchlässigkeit im Vergleich zur Schein-Operation. Ein direkter, akuter Effekt von Albumin auf die neuronale Aktivität wurde durch Perfusion von Hirnschnitten *in*

vitro untersucht. In extra- und intrazellulären Messungen bis zu zwei (resp. eine) Stunden nach Perfusion zeigten sich keine Veränderungen der evozierten Feldpotentiale resp. des Ruhemembranpotentials und der Spiking-Eigenschaften kortikaler Neuronen.

In einer zweiten Studie gelang es jedoch, kontinuierlich über fünf Stunden hinweg die intrazelluläre neuronale Aktivität unter dem Einfluß von Albumin (25% der Serumkonzentration) zu messen. Nach drei Stunden war hier zum ersten Mal eine prolongierte Depolarisierung nach einem durch extrazelluläre Stimulation ausgelösten Aktionspotential zu beobachten. Fünf Stunden nach Beginn der Albumin-Perfusion löste schließlich ein knapp überschwelliger extrazellulärer Stimulus eine Salve von Aktionspotentialen aus – ein klares Indiz für eine gesteigerte Erregbarkeit des lokalen kortikalen Netzwerks.

Um die pathogenetische Rolle des Serumalbumins genauer zu charakterisieren, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Im HE-Präparat war innerhalb der ersten 48 Stunden nach Gallensalz-Behandlung ein leichtes Ödem in der behandelten Region zu erkennen, ebenso nach der Schein-Operation. Ein signifikanter Nervenzellverlust gegenüber der kontralateralen Kontrollregion war jedoch in beiden Fällen nicht festzustellen. In den Spezialfärbungen ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Mengen von apoptotischen Zellen (VAF-Färbung) oder Entzündungszellen (CD-40, GFS-IB4) nachweisen. Dagegen zeigte sich ab dem ersten postoperativen Tag eine prominente Aktivierung von Astrozyten (GFAP), die im Vergleich zu Kontrollschnitten deutlich gesteigert war. In der Zusammenschau der Befunde führte somit die BHS-Störung zu einer Penetration von Proteinen, insbesondere Albumin, in das Gehirnparenchym, und konsekutiv zu einer Aktivierung von Astrozyten.

Astrozytäre Dysfunktion nach BHS-Läsion

In der Folgestudie wurden die Vorgänge infolge der kortikalen Albumin-Extravasion genauer analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß Albumin nach BHS-Öffnung selektiv in Astrozyten aufgenommen wird, und zwar über einen aktiven Transportmechanismus, welcher durch TGF-beta-Rezeptoren vermittelt wird. Die Albuminaufnahme in Astrozyten hatte dabei eine Verminderung ihrer Pufferkapazität für extrazelluläre Kaliumionen zur Folge: In den Hirnschnitten BHS-behandelter Ratten konnte nach repetitiver Stimulation eine deutlich erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration gemessen werden, welche zu einer NMDA-vermittelten Übererregbarkeit kortikaler Neurone führte. Derartige Veränderungen der Astrozytenfunktion sind bereits in früheren Studien in epileptischem Gewebe nachgewiesen

worden^{14,15}, jedoch wurde hier zum ersten Mal gezeigt, daß sie der Entwicklung eines epileptischen Fokus *vorausgehen* und folglich an der Pathogenese beteiligt sein können.

Als Ursache für die reduzierte Kalium-Pufferkapazität der Astrozyten konnte eine verminderte Expression von Kir-4.1-Ionenkanälen identifiziert werden. Eine Blockade der TGF-beta-Rezeptoren im Hirnschnitt führte dosisabhängig zu einer signifikant geringeren astrozytären Albumin-Aufnahme und reduzierte zugleich das Auftreten epileptiformer Aktivität nach kortikaler Albumin-Exposition. Die TGF-beta-Rezeptoren erscheinen damit als vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt für alle neurologischen Erkrankungen, bei denen eine BHS-Störung an der Pathogenese beteiligt ist.

Interferon-alpha-Behandlung in Patienten mit BHS-Störung

Die Erkenntnisse über eine Beteiligung von BHS-Störungen an der Entstehung epilepsietypischer Aktivität wurden schließlich auch in einem klinischen Kontext bestätigt. In einer Fallstudie wurde zunächst folgende Beobachtung gemacht: Eine Patientin mit einer fokalen BHS-Störung nach Operation eines Meningeoms, welche später aufgrund einer Hepatitis-Infektion mit Interferon-alpha (IFN-alpha) behandelt wurde, entwickelte zwei Wochen nach Beginn der antiviralen Therapie erstmalig einen generalisierten, tonisch-klonischen epileptischen Anfall. In der Literatur sind derartige epileptische Anfälle unter Therapie mit IFN-alpha in 1-4 Prozent der Fälle beschrieben¹⁶. Um zu untersuchen, ob die Gabe von IFN-alpha in Kombination mit einer BHS-Schrankenstörung für die Epilepsieentstehung verantwortlich sein könnte, wurden Gehirnschnitte von Ratten *in vitro* klinisch relevanten Konzentrationen von IFN-alpha ausgesetzt.

Die akute IFN-alpha-Perfusion im Hirnschnitt erbrachte keine epilepsietypischen Veränderungen der neuronalen Aktivität. Wurde IFN-alpha dagegen in einer Operation wie oben beschrieben lokal auf den Kortex von Ratten appliziert, zeigte sich eine Woche nach der Behandlung im Hirnschnitt epileptiforme Aktivität in der exponierten Gehirnregion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Interferon durch direkte Einwirkung auf den zerebralen Kortex zur Entstehung eines epileptischen Fokus führen kann, welcher schließlich zum Ausgangspunkt für einen generalisierten Anfall werden kann. Ein solcher Effekt ist insbesondere beim Vorhandensein einer pathologisch reduzierten BHS-Funktion zu erwarten, so daß bei entsprechenden Patienten besondere Vorsicht bei der Anwendung dieses antiviralen Medikamentes zu empfehlen ist.

5) Literaturverzeichnis

1. Neuwelt EA (2004) Mechanisms of disease: the blood–brain barrier. *Neurosurgery* 54: 131–140.
2. Greenwood J, Adu J, Davey AJ, Abbott NJ, Bradbury MW (1991) The effect of bile salts on the permeability and ultrastructure of the perfused, energydepleted, rat blood–brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 644–654.
3. D'Ambrosio R, Perucca E (2004) Epilepsy after head injury. *Curr Opin Neurol.* 17(6): 731-5.
4. Lewandowsky M (1900) Zur Lehre der Cerebrospinal Flüssigkeit. *Z. Klin. Med.* 40: 480-494.
5. Ehrlich P (1885) Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Hirschwald-Verlag Berlin.
6. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16: 1–13.
7. Tomkins O, Kaufer D, Korn A, Shelef I, Golan H, Reichenthal E, Soreq H, Friedman A. (2001) Frequent blood-brain barrier disruption in the human cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol.* 21(6): 675-91.
8. Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhaupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg* 93: 658–666.
9. Fleidervish IA, Friedman A, Gutnick MJ (1996) Slow inactivation of Na current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *J Physiol (Lond)* 493: 83–97.
10. Lux HD, Neher E (1973) The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Exp Brain Res* 17: 190-205.
11. Prince DA, Tseng GF (1993) Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *J Neurophysiol* 69: 1276–1291.
12. Jacobs KM, Gutnick MJ, Prince DA (1996) Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb Cortex* 6: 514–523.

13. Sanabria ER, da Silva AV, Spreafico R, Cavalheiro EA (2002) Damage, reorganization, and abnormal neocortical hyperexcitability in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43 [Suppl 5]:96–106.
14. Heinemann U, Gabriel S, Jauch R, Schulze K, Kivi A, Eilers A, Kovacs R, Lehmann TN (2000) Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 41 [Suppl 6]: 185-189.
15. Janigro D, Gasparini S, D'Ambrosio R, McKhann IIG, DiFrancesco D (1997) Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. *J Neurosci* 17: 2813-2824.
16. Janssen HL, Berk L, Vermeulen M, Schalm SW (1990) Seizures associated with low-dose alpha-interferon. *Lancet* 336:1580.

6) Angabe der Originalarbeiten, die in die Publikationspromotion einfließen

1. Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A.
Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2004 Sep 8;24(36):7829-36.

2. Pavlovsky L*, Seiffert E*, Heinemann U, Korn A, Golan H, Friedman A.
Persistent BBB disruption may underlie alpha interferon-induced seizures.
J Neurol. 2005 Jan;252(1):42-6. (*: equal contribution)

3. Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A.
TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007 Feb;130(Pt 2):535-47.

7) Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Der Promovend Ernst Seiffert hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

- **Publikation 1:** Seiffert et al., J Neurosci. 2004 Sep 8;24(36):7829-36.
(Beteiligung: ca. 65 %)
Beiträge im einzelnen: *In-vivo*-Tieroperationen mit Applikation von Gallensalzen, Albumin etc., histologische und biochemische Validierung der BHS-Integrität, extra- und intrazelluläre elektrophysiologische Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form.

- **Publikation 2:** Pavlovsky, Seiffert et al., J Neurol. 2005 Jan;252(1):42-6.
(Beteiligung: ca. 40 %)
Beiträge im einzelnen: *In-vivo*-Tieroperationen, extra- und intrazelluläre elektrophysiologische Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form.

- **Publikation 3:** Ivens et al., Brain 2007 Feb;130(Pt 2):535-47.
(Beteiligung: ca. 25 %)
Beiträge im einzelnen: Extra- und intrazelluläre elektrophysiologische Messungen unter Albumin-Einwirkung, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form.

Prof. Dr. Uwe Heinemann
Betreuender Hochschullehrer

Ernst Seiffert
Promovend

8) Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ernst Seiffert, geb. am 09.12.1978 in Berlin, erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema »Blut-Hirn-Schrankenstörung und Entstehung von Epilepsie« in eigenständiger Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 12. November 2007

Ernst Seiffert

Promovend

9) Danksagung

Die vorliegende Dissertationsschrift ist die Frucht einer Forschungsarbeit, die ich gewiß nicht ohne die vielfältige Unterstützung vollendet hätte, die mir von allen Seiten zuteil wurde. Es ist daher an der Zeit, meine Dankbarkeit zum Ausdruck zu bringen.

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich und mit besonderem Nachdruck bei Professor Uwe Heinemann, der mich bereits im zweiten Jahr des Medizinstudiums für die Physiologie des Nervensystems derart begeistert hat, daß ich seither die Neurowissenschaften nicht mehr aus dem Blick verlor. Die Arbeit in seinem Labor war von einer freundschaftlichen und zutiefst wissenschaftlichen Atmosphäre geprägt, die heutzutage ihresgleichen sucht. Stellvertretend für eine lange Lobeshymne sei hier gesagt: Professor Heinemann, Sie waren für mich ein Doktorvater, der diesen Namen in jeder Hinsicht verdient hat!

Auf gleicher Ebene danke ich meinem Arbeitsgruppenleiter und Mentor Dr. Alon Friedman, den ich hier auf Englisch ansprechen möchte: Dear Alon, I thank you not only for your extraordinary scientific guidance, your manifold professional support, or your help with any kind of problem arising – equally important to me were your personal advice, the helpful and exemplary demonstrations of your *chutzpa* or the several occasions when I met you in Israel. What I learned from you goes far beyond the results of my thesis. I hope we stay in contact in the future!

Eine besonders enge Zusammenarbeit verbindet mich mit Sebastian Ivens, dem ich an dieser Stelle für seine tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit danken möchte. Bei Bedarf konnte ich mich stets darauf verlassen, von ihm noch einen Hirnschnitt zu »leihen«. Aus gemeinsamer Forschung ist auch hier echte Freundschaft entstanden.

Weiterhin danke ich den vielen Mitarbeitern des Instituts für Neurophysiologie, die mir bei inhaltlichen, methodischen, technischen oder organisatorischen Dingen zur Seite standen, insbesondere Dr. Christoph Behrens, Sonja Frosinski, Dr. Katerina Jandova, Dr. Oliver Kann, Dr. Siegrun Gabriel und ihrem Mann Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Dr. Richard Kovacs, Marleisje Njunting, Dennis Päsler, Dr. Katrin Schulze und Dr. Herbert Siegmund.

Ebenso danke ich allen externen wissenschaftlichen Kooperationspartnern, insbesondere Dr. Orie Brown, Dr. Jens Dreier, Dr. Lev Pavlovsky, Dr. Oren Tomkins und Dr. Dominik Zumsteg.

Allen anderen Helfern, deren Namen hier aus Platzgründen nicht aufgeführt werden konnten, sei ein herzlicher Dank ausgesprochen.

An exponierter Stelle danke ich zum Schluß meinen lieben Eltern Jürgen und Martha Seiffert, die mich während der Doktorarbeit stets in jeder Hinsicht unterstützt und mir die Kraft gegeben haben, das Projekt zu einem guten Ende zu bringen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

10) Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.