

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

DISSERTATION

Antiepileptogenese nach experimentellem Status epilepticus:
Evaluation der Hypothermie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lara Mirja Steinbrenner, geb. Böll

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstrakt	5
1. Einleitung	9
1.1. Epidemiologie und Klinik der Epilepsie.....	9
1.2. Das hippocampale System.....	11
1.3. Pathophysiologie.....	14
1.4. Tierexperimentelle Ansätze.....	16
1.4.1. Postischämische Modelle.....	17
1.4.2. Posttraumatische Modelle.....	17
1.4.3. Status epilepticus-Modelle	18
1.5. Therapie und Therapieversuche der Epilepsie.....	19
1.5.1. Pharmakologische Ansätze.....	19
1.5.2. Hypothermie – ein non-pharmakologischer Ansatz.....	21
1.6. Ziele der Arbeit.....	22
2. Methodik	23
2.1. Versuchstiere.....	23
2.2. Versuchsgruppen.....	23
2.3. Technischer Aufbau.....	24
2.4. Elektrodenimplantation.....	25
2.5. Induzierung eines selbsterhaltenden Status epilepticus	29
2.6. Hypothermie und Normothermie.....	31
2.7. Video-EEG-Messung.....	31
2.8. Elektrophysiologie (Paired-Pulse-Paradigma).....	32
2.9. Versuchsprotokoll.....	34
2.10. Datenauswertung.....	36

2.11. Statistik.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1. Klinische und elektrophysiologische Charakteristika des SSSE.....	39
3.2. Temperaturverlauf [25°C- und 37°C-Gruppe].....	40
3.2.1. 37°C.....	40
3.2.2. 25°C.....	42
3.3. Spontane Anfälle im Verlauf nach SSSE.....	42
3.4. Anfallscharakteristika (Subanalysen der epileptischen Tiere).....	45
3.4.1. Anfallsdauer.....	46
3.4.2. Anzahl Anfälle/ 48-Stunden-Epochen.....	47
3.4.3. Anfallsstärke.....	49
3.5. Elektrophysiologie.....	50
3.5.1. Exzitatorische Parameter: Latenz vor Induktion des SSSE.....	50
3.5.2. Exzitatorische Parameter: Verlauf der Latenz nach SSSE.....	51
3.5.2.1. Intragruppenvergleich.....	51
3.5.2.2. Intergruppenvergleich.....	51
3.5.3. Inhibitorische Parameter: Paired-Pulse Messung vor Induktion des SSSE.....	54
3.5.4. Inhibitorische Parameter: Verlauf der Paired-Pulse Messung nach SSSE.....	54
3.5.4.1. Intragruppenvergleich.....	54
3.5.4.2. Intergruppenvergleich.....	57
4. Diskussion.....	61
4.1. Temperaturverlauf.....	62
4.2. Spontane Anfälle im Verlauf nach SSSE.....	63
4.3. Anfallscharakteristika.....	65
4.4. Elektrophysiologie.....	66
4.5. Limitationen.....	70
4.6. Translation.....	71

4.7. Fazit.....	72
Literaturverzeichnis.....	73
Eidesstattliche Versicherung.....	85
Lebenslauf.....	86
Publikationsliste.....	87
Danksagung.....	88

Abkürzungsverzeichnis

BHS	Blut-Hirn-Schranke
CA	Cornu ammonis
EC	Entorhinaler Kortex
EPSP	Exzitatorisch postsynaptisches Potential
GABA	γ -Aminobuttersäure
IPI	Interpulsintervall
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PPR	Paired-pulse-Ratio
SE	Status epilepticus
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SSSE	Selbst erhaltender Status epilepticus ("self sustaining status epilepticus")
TLE	Temporallappenepilepsie
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abstrakt

Einleitung: Erworbene Hirnläsionen infektiöser, traumatischer oder vaskulärer Genese oder ein Status epilepticus (SE) können zur Entwicklung einer Epilepsie führen. Eine der großen Herausforderungen in der Epilepsie-Forschung ist, die Entwicklung einer Epilepsie nach einer Hirnläsion zu verhindern oder diese zumindest in ihrem Verlauf abzuschwächen. Bisher konnte die Epileptogenese weder in transienten pharmakologischen Interventionen nach Hirnläsionen bei Patienten noch im Tiermodell verhindert oder wesentlich beeinflusst werden. Ziel dieser experimentellen Studie ist die Evaluation der Hypothermie hinsichtlich ihres antiepileptogenen Potenzials.

Methode: In einem chronischen Epilepsie-Tiermodell mit Ratten wurden die antiepileptogenen Eigenschaften einer 3-Std.-Kühlung auf 25°C direkt nach Beendigung eines elektrisch induzierten selbst-erhaltenden Status epilepticus (SSSE; self-sustaining status epilepticus) untersucht. Insgesamt gab es drei Versuchsgruppen, denen allen intrazerebrale Elektroden implantiert wurden (Ableitelektrode im Gyrus dentatus, Stimulationselektrode im Tractus perforans). Zwei Gruppen wurden elektrisch stimuliert mit nachfolgendem SSSE und im direkten Anschluss entweder mit Hypothermie (25°C) oder mit Normothermie (37°C) behandelt, bei der dritten Gruppe wurden den Tieren Elektroden implantiert, ohne dass diese elektrisch stimuliert wurden, die Tiere entwickelten somit keinen SSSE. Diese Kontrollgruppe sollte den Einfluss der Elektrodenimplantation kontrollieren. Das Auftreten spontaner Anfälle und die Anfallsstärke nach SSSE (1, 2, 4 und 8 Wochen) wurden mit 48-Stunden Epochen im Video – bei einigen Tieren ergänzend auch mittels EEG - untersucht. Weiterhin wurden zu mehreren Zeitpunkten nach SSSE elektrophysiologisch die inhibitorischen und exzitatorischen Parameter im Gyrus dentatus mit Hilfe des Paired-Pulse-Paradigmas erfasst.

Ergebnisse: Hypothermie nach SSSE konnte das Auftreten von epileptischen Anfällen bei keinem der Tiere verhindern. Acht Wochen nach SSSE zeigte sich ein Trend zu weniger stark ausgeprägten Anfällen nach Kühlung ($4,0 \pm 0,6$) im Vergleich zu den normothermen Kontrollen ($4,8 \pm 0,2$), der jedoch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche nicht signifikant war. Ein frühzeitiger Inhibitionsverlust, der typischerweise nach SSSE beobachtet wird, war bei den gekühlten Tieren drei Stunden nach SSSE etwas abgeschwächt. Dies drückte sich durch eine kleinere Paired-Puls-Ratio (PPR;

0,16±0,21) gegenüber den normothermen Kontrollen (0,54±0,21) aus, auch dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Latenz zwischen Stimulusartefakt und exzitatorischen post-synaptischem Potential war 3 Stunden nach SSSE in Tieren, die gekühlt wurden (8,29±2,45 ms) im Vergleich zu normothermen Kontrollen (4,82±0,66 ms), verlängert. Dieser Unterschied war aber nach Korrektur für Mehrfach-Vergleiche nicht signifikant.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte mittels der hier vorgestellten Experimente nicht gezeigt werden, dass kurzfristige Kühlung direkt im Anschluss an einen SSSE die Epileptogenese verhindert oder beeinflusst.

Abstract

Introduction: Acquired brain insult of infectious, traumatic or vascular origin can lead to the development of chronic epilepsy. In epilepsy research, one of the major challenges is to prevent or at least mitigate development of epilepsy following acquired brain insult by early, but transient therapeutic interventions. So far, all pharmacological antiepileptogenic treatment approaches were largely unsuccessful in clinical trials and in experimental animal studies. Aim of this study is the evaluation of hypothermia regarding its antiepileptogenic properties.

Methods: In a rat model of chronic epilepsy following electrically induced self-sustaining status epilepticus (SSSE), we assessed the antiepileptogenic properties of 3-h-cooling to 25°C induced directly after the end of SSSE. Altogether there were three study-groups, all of whom were implanted with intracerebral electrodes (recording in dentate gyrus, stimulating in perforant path). Two groups underwent stimulation with SSSE treated subsequently with either hypothermia (25°C) or normothermia (37°C), the third group remained unstimulated and controlled for influence of electrodes. Occurrence of spontaneous seizures and seizure severity after SSSE were examined in 48h epochs with video and, additionally, some animals with EEG (1, 2, 4 and 8 weeks). Furthermore, electrophysiological parameters assessing inhibition and excitation in the dentate gyrus were assessed at multiple time points using the paired-pulse-paradigm.

Results: Post SSSE hypothermia did not prevent the occurrence of seizures in any animal. Eight weeks after SSSE, Racine motor seizures trended to be less severe following cooling (4.0 ± 0.6) compared with normothermic controls (4.8 ± 0.2) but the difference was not significant when correcting for multiple comparisons. Early loss of inhibition that is typically seen following SSSE, was to some degree attenuated in hypothermically treated animals 3 h after SSSE as expressed by smaller paired-pulse-ratios (PPR; 0.16 ± 0.21) compared with normothermic controls (0.54 ± 0.21) but this difference was not significant either. Latency between stimulus artefact and excitatory post-synaptic potential 3 h after SSSE, reciprocally reflecting neuronal excitation, was higher in animals that underwent hypothermia (8.29 ± 2.45 ms) compared with controls (4.82 ± 0.66 ms), however, the difference was not significant after correction for multiple comparisons.

Conclusion: In summary, the current experiments were not able to demonstrate prevention or mitigation of epileptogenesis with immediate short-term cooling following SSSE.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Klinik der Epilepsie

Die Epilepsie ist eine der ältesten bekannten neurologischen Erkrankungen. Der Begriff *Epilepsie* kommt von dem altgriechischen Wort *epilambanein* und bedeutet soviel wie *von etwas ergriffen/ereilt werden*. Die Epilepsie tritt mit einer Prävalenz von 7,1/1000 auf. Das entspricht weltweit ca. 5,2 Mio und in Deutschland ca. 600 000 Betroffene, damit ist die Epilepsie nach dem Schlaganfall die zweithäufigste schwere neurologische Erkrankung (Hirtz et al., 2007).

Konzeptuell ist ein epileptischer Anfall von der Erkrankung Epilepsie abzugrenzen. Ein Anfall ist ein Symptom und das klinische Korrelat einer sich selbst limitierenden, exzessiven hypersynchronen Entladung von einer Ansammlung Neuronen im Gehirn. Diese kann sich dann auf die umgebenden Neuronen entweder in einer (fokaler Anfall) oder in beiden Hemisphären (sekundär generalisierter Anfall) des Gehirns ausbreiten (Blume et al., 2001b). Die Epilepsie wird von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) definiert als eine Krankheit mit wiederholt unprovokiert auftretenden Anfällen. Ausgeschlossen von dieser Definition sind unter anderem akut symptomatische Anfälle, die durch eine systemische Veränderung (z.B. Elektrolytstörung wie Hyponatriämie) oder eine akute Schädigung des Gehirns (z.B. cerebrovaskuläres Ereignis) verursacht werden können (ILAE, 1993). Epilepsien können nach ihrer Ätiologie (symptomatisch, idiopathisch, kryptogen), ihrem Alter zu Beginn der Erkrankung, dem lokalisatorischen Anfallsbeginn (fokal, primär generalisiert) oder der Frequenz der Anfälle in unterschiedliche Syndrome eingeteilt werden (Engel et al., 2001). Besonders herauszustellen ist auf Grund seiner klinischen Bedeutung der Status epilepticus (SE), der, wenn auch aus epileptologischer Perspektive kein häufiges Ereignis, nach dem Schlaganfall den zweithäufigsten neurologischen Notfall darstellt (Neligan et al, 2010). Ein SE kann mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen (konvulsiver SE) oder im Sinne von komplex-fokalen Anfällen mit dem führenden Symptom einer Bewusstseinsstörung (non-konvulsiver SE) auftreten. Der SE wird in Abgrenzung zum epileptischen Anfall über seine Dauer definiert: Es handelt sich also um einen Anfall, der länger andauert als Anfälle diesen Typs in der Mehrheit der Patienten bzw. um einen Anfall, der sich häufig wiederholt, ohne dass klinische Zeichen einer kompletten

Erholung zwischen den Anfällen eintreten (Blume et al., 2001b). Generalisierte tonisch-klonische Anfälle bei Erwachsenen dauern selten länger als 1-2 Minuten (Jenssen et al., 2006). Auf Grund der ungenauen Zeitangabe in der Definition des SE hatte sich früher - basierend auf Ergebnissen aus tierexperimentellen Studien - ein Zeitfenster von 30 Minuten zur diagnostischen Orientierung des SE etabliert (working group on SE, 1993). Erkenntnisse aus den letzten Jahren unterstützen eine modifizierte Zeitangabe, die einen SE als ein Ereignis von mindestens 5 Minuten definiert (Lowenstein et al., 1999). Anfälle, die länger als 5-10 Minuten andauern, haben eine geringere Wahrscheinlichkeit selbstlimitierend zu sein: häufig ist eine therapeutische Intervention notwendig, um sie beenden zu können (Eriksson et al., 2005).

Bei etwa zwei Drittel aller Patienten ist die Epilepsie eindeutig einem fokalen Ursprung zuzuordnen (Olafsson et al., 2005; Zarrelli et al., 1999). Die häufigste dabei auftretende Form ist die Temporallappen-Epilepsie (TLE); so haben in einer Population von Patienten mit einer neu diagnostizierten Epilepsie fast 30% aller Patienten Anfälle, die vom Temporallappen ausgehen (Manford et al., 1992). Unter diesen wiederum sind bei über 90% temporo-mesiale Strukturen betroffen (Blume et al., 2001a). Fokalen Epilepsien, wie der TLE, liegt in der Regel eine initial auslösende Schädigung zu Grunde, diese kann infektiöser, neurodegenerativer, traumatischer oder vaskulärer Genese sein (Olafsson et al., 2005). Genauso kann auch eine Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS) infolge eines SE zur Entwicklung einer Epilepsie führen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Risiko, eine Epilepsie zu entwickeln, - unabhängig von der auslösenden Grunderkrankung des SE - signifikant höher ist als bei Patienten, die bei vergleichbarer Ätiologie einen akut-symptomatischen Anfall hatten (Hesdorffer et al., 1998). Je länger der SE angehalten hat, desto häufiger entsteht danach eine Epilepsie. So entwickelten nach einem therapierefraktären SE bis zu 90% der Patienten eine Epilepsie. Unter einem therapierefraktären SE versteht man dabei einen SE, der nicht durch Therapeutika der ersten Wahl, wie Benzodiazepine oder Phenytoin, durchbrochen werden konnte, unabhängig von der bereits verstrichenen Zeit seit Einsetzen der Anfälle (Holtkamp et al., 2005b). In Folge eines Schädel-Hirn-Traumas (SHT) entwickeln, nach Ergebnissen verschiedener Studien, abhängig vom Alter zum Zeitpunkt des SHT und Schwere des SHT zwischen 2 und 53% der Patienten eine Epilepsie. Insgesamt macht das SHT unter den Ursachen einer symptomatischen Epilepsie einen Anteil von ca. 20% aus (Herman, 2002; Garga und Lowenstein, 2006).

Zwischen der auslösenden ZNS-Schädigung und der tatsächlichen Manifestation einer Epilepsie mit rekurrenten Anfällen verstreichen in der Regel Wochen bis hin zu mehreren Jahren (Lamy et al., 2003). Diesen Zeitraum bezeichnet man als Latenzperiode oder Epileptogenese. Die Epileptogenese beschreibt die Entwicklung, während der das normale neuronale Netzwerk in einen Zustand chronischer Übererregbarkeit übergeht. Der gesamte Vorgang, der zur Entwicklung einer Epilepsie führt, besteht demnach aus drei Phasen: initiale ZNS-Schädigung - Latenzperiode ohne Anfälle (Epileptogenese) - Epilepsie mit rekurrenten unprovokierten epileptischen Anfällen (Pitkänen et al., 2002).

1.2 Das hippocampale System

Der Hippocampus ist eine paarig angelegte Struktur, die sich im medialen (mesialen) Temporallappen befindet. Auf Grund der klinischen Häufigkeit der TLE kommt dieser anatomischen Struktur in der Epilepsie-Forschung eine besondere Aufmerksamkeit zu (siehe Absatz 1.3).

Die Hippocampus-Formation lässt sich in drei Hauptbereiche einteilen: Erstens, das Cornu ammonis (auch als Ammonshorn oder Hippocampus proper bezeichnet), das sich wiederum in die drei Unterfelder CA1- CA3 (CA= Cornu ammonis) einteilen lässt, zweitens den Gyrus dentatus (auch Fascia dentata) und drittens das Subiculum, das die Hippocampus-Formation mit dem entorhinalen Kortex verbindet (Abbildung 1.1). Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns, seine Rinde besteht aus drei Schichten und wird auch als Archikortex bezeichnet. Im Gegensatz dazu besteht der Isokortex, der die Struktur des Neokortex bildet, aus sechs Schichten.

Die Zellschichten des Hippocampus teilen sich von außen nach innen auf in:

- die Korbzellschicht (Stratum oriens),
- die Pyramidenzellschicht (Prinzipalzellschicht, Stratum pyramidale) und
- die Molekularzellschicht (Stratum moleculare)

Die dreischichtige Struktur ist, da sich der Hippocampus in seinem anterior-posterioren Verlauf krümmt, nicht immer leicht zu erkennen. Vor allem im Bereich, in dem sich der Gyrus dentatus dem Ammonshorn angliedert, liegen mehrere Dreierschichten des Archikortex übereinander.

Bei den im Stratum oriens befindlichen Korbzellen handelt es sich um verschiedene inhibitorische Interneurone. Die Pyramiden- bzw. Prinzipalzellschicht enthält im Ammonshorn hauptsächlich Pyramidenzellen, im Gyrus dentatus Körnerzellen (auch als Granularzellen bezeichnet). Sie wird im Gyrus dentatus als Körnerzellschicht (Stratum granulosum) bezeichnet. Die Abschnitte CA1-CA3 sind nach der Größe der in ihnen befindlichen Pyramidenzellen unterteilt. CA1 enthält kleinere, CA2 und 3 große in unterschiedlicher Dichte angeordnete Pyramidenzellen. Die zellarme Molekularzellschicht dient hauptsächlich der interneuronalen Verschaltung zwischen Prinzipalzellen und Korbzellen. Die Molekularschicht im Gyrus dentatus wird durch das Körnerzellband in eine innere und äußere Zone unterteilt. Die äußere wird hauptsächlich von den Dendriten der Körnerzellen gebildet, die innere dem Hilus anliegende Schicht aus den Axonen der Körnerzellen, den sogenannten Moosfasern. Die von der Körnerzellschicht U-förmig eingefasste Zellschicht wird als Hilus-Region bezeichnet. In ihr befinden sich in geringer Dichte die Zellkörper inhibitorischer Interneurone und exzitatorischer Mooszellen.

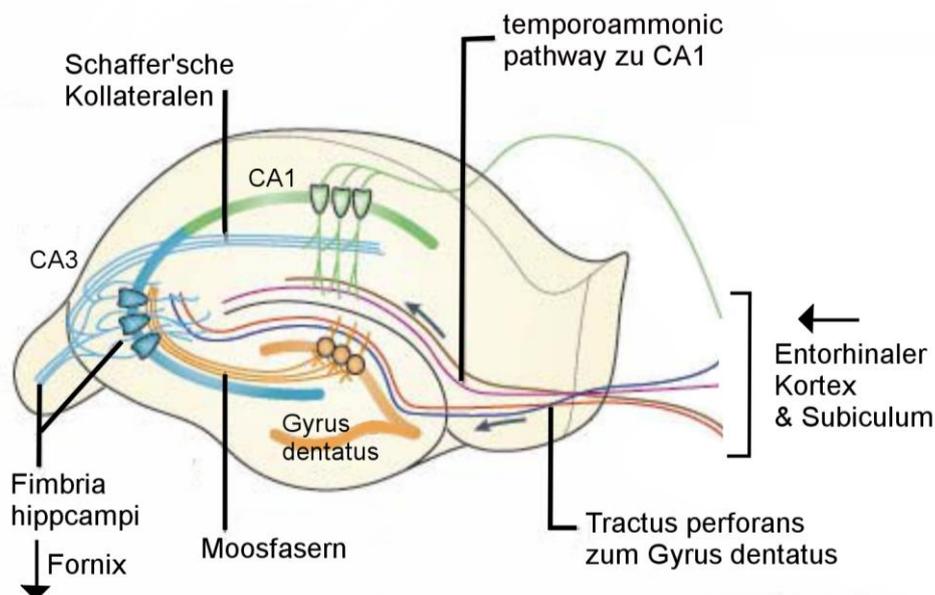


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über das hippocampale System und seine wichtigsten neuronalen Verschaltungen (modifiziert nach Neves et al., 2008).

Die glutamatergen Mooszellen innervieren die Prinzipalzellen und Interneurone des Gyrus dentatus und Ammonshorn beider Seiten (Freund und Buzsaki, 1996; Scharfmann, 1995; Bähr et al., 2009; Trepel et al., 2003).

Der Hauptteil der afferenten Eingangssignale zum Hippocampus kommt aus dem entorhinalen Kortex (EC), einem Bestandteil des Gyrus parahippocampalis. Seine Axone bilden den Tractus perforans. Großteile der Fasern des Tractus perforans durchdringen den Sulcus hippocampalis, um dann in die äußere und innere Molekularzellschicht des Gyrus dentatus zu ziehen und dort synaptische Verbindungen mit den Dendriten der Körnerzellen zu bilden, ein weiterer Teil zieht zur CA1-Region. Der Gyrus dentatus wird als das erste Glied der intrahippocampalen trisynaptischen Schleife betrachtet. Er ist die Zielstruktur für den Großteil der Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex (Andersen, 1971). Die Hauptstationen des sogenannten trisynaptischen Schaltkreises sind demnach: „Entorhinaler Kortex → Körnerzellen des Gyrus dentatus (erste Synapse) → Moosfasersystem → CA3-Pyramidenzellen (zweite Synapse) → Schaffer'sche Kollaterale → CA1-Pyramidenzellen (dritte Synapse)“ (Bähr et al., 2009). Die Fortleitung von Informationen über diese Verbindung wird durch diverse Interneurone moduliert und gefiltert. Dabei kommt in der Epilepsieforschung besonders den inhibitorischen Interneuronen im Gyrus dentatus eine entscheidende Rolle zu. Bei diesen besteht unter physiologischen Bedingungen eine hohe Schwelle für die Auslösung neuronaler Aktivität (Lothman, 1994). Für diesen Effekt werden zum einen die inhibitorischen Interneurone und das Fehlen rekurrenter exzitatorischer Kreisläufe und zum anderen spezifische Eigenschaften der Körnerzellen verantwortlich gemacht. Diese sind auf Grund eines sehr negativen Ruhemembranpotentials, einer ausgeprägten Hyperpolarisation nach einem Aktionspotential sowie einer Frequenzadaption bei repetitiven Stimuli nur schwer erregbar (Scharfmann und Schwartzkroin, 1990; Spruston und Johnston, 1992). Die wichtigsten inhibitorischen Interneurone im Gyrus dentatus sind die Korbzellen, die Chandelierzellen und die dendritischen inhibitorischen Zellen. Von allen drei Zellarten existieren verschiedene Untertypen, die über unterschiedliche synaptische Verbindungen und Mechanismen ihre inhibitorische Funktion ausüben (Freund und Buszaki, 1996).

Prinzipiell lassen sich zwei Arten der interneuronalen Hemmung unterscheiden: die afferente Vorwärtshemmung (feedforward inhibition) und die rekurrente Rückwärtshemmung (feedback inhibition) (Buzsaki, 1984). Bei der afferenten Vorwärtshemmung kommt es durch ein exzitatorisches Neuron in kurzer Folge zur Aktivierung einer Prinzipalzelle und einem mit der Prinzipalzelle synaptisch verbundenen Interneuron. Dadurch erreicht die Prinzipalzelle nach dem exzitatorischen

Potential mit kurzer zeitlicher Verzögerung ein inhibitorisches Potential durch ein mit ihm verbundenes gleichzeitig aktiviertes Interneuron (Pouille und Scanziani, 2001). Bei einer Rückwärtshemmung kommt es zu einer Exzitation eines Interneurons durch eine Prinzipalzelle. Durch rückläufige Axone kann das Interneuron daraufhin die Prinzipalzelle inhibieren (Andersen et al., 1963).

Als inhibitorischer Neurotransmitter der Interneurone überwiegt in der Hippocampus-Formation die γ -Aminobuttersäure (GABA) (Roberts, 1974). GABA agiert im Hippocampus und Neokortex an zwei pharmakologisch unterschiedlichen Rezeptortypen ($GABA_A$ und $GABA_B$), die für die meisten schnellen und langsamen inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSPs) zuständig sind (McCormick, 1989).

1.3 Pathophysiologie

Es wird angenommen, dass bei der Epileptogenese mehrere parallel wirkende pathophysiologische Mechanismen und neurochemische Modulatoren eine Rolle spielen. Die ZNS-Veränderungen nach einem Anfall haben einen dynamischen Verlauf. Multiple Faktoren tragen zum neuronalem Zelltod bei, darunter genetische Faktoren, das Ausmaß der durch Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität, mitochondriale Dysfunktionen, oxidativer Stress, das Fehlen oder ein vermindertes Vorhandensein von Wachstumsfaktoren sowie gesteigerte Konzentrationen von Zytokinen (Ferriero, 2005; Morimoto et al., 2004). Bei der Exzitotoxizität handelt es sich um einen pathologischen Prozess der durch exzessive Freisetzung von erregenden Neurotransmittern, wie z.B. Glutamat, zur Schädigung und zum Zelltod von Nervenzellen führt (Manev et al., 1989).

Obwohl während eines SE, der durch chemokonvulsiv wirkende Substanzen (z.B. Kainat oder Pilocarpin (siehe 1.4)) induziert wird, verschiedene Regionen des Gehirns betroffen sind, hat die Hippocampus-Region auf Grund ihrer hohen Plastizität und erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Anfällen die meiste Aufmerksamkeit erhalten (Parent et al., 1997, Rao et al., 2006). Im Zusammenhang mit der TLE ist der Gyrus dentatus eine der meist erforschten Regionen des Hippocampus. Dies ist er vor allem auf Grund seiner hohen Reizschwelle gegenüber Anfällen und seiner Funktion im gesunden Gehirn als Pforte („gate“), die die Ausbreitung von Anfällen im Hippocampus verhindert (Buckmaster und Dudek, 1999; Heinemann et al., 1992).

Bei der mesialen TLE, die nach einem SHT auftrat, konnte experimentell mehrfach gezeigt werden, dass sich eine stereotype Neurodegeneration im Hippocampus ausbildete. Am stärksten betroffen war in der Regel die Hilus-Region des Gyrus dentatus, zum Teil auch die CA3- und in wenigen Fällen auch die CA1- Region (Lowenstein, 1992; Grady, 2003; Swartz, 2006). Bereits moderate Verletzungen in Form von wiederholten kurzen induzierten Anfällen führten zu einem signifikanten Verlust hilarer Interneurone und damit zu einer Destabilisierung des hippocampalen Netzwerks (Sutula, 1988; Lukoyanov, 2004). Immunocytochemische Untersuchungen mit 5-Bromo-Deoxyuridin (einem Thymidin-Analogen, das während der Replikation in die DNA eingebaut wird) konnten zeigen, dass es ca. 1 Woche nach SHT im Gyrus dentatus nach anfänglicher Neurodegeneration zu einer deutlichen Vermehrung von mit 5-Bromo-Deoxyuridin markierten Progenitorzellen (Vorläuferzellen) kam (Dash et al., 2001; Urrea et al., 2007). Diskutiert wird, ob sich dabei aus einigen dieser Zellen ein neuronaler Phänotyp entwickelt, der aberrante Axone sowohl in die CA3- Region als auch in die Hilus- Region des Gyrus dentatus entsendet und damit möglicherweise zur Bildung neuer exzitatorischer Verbindungen führt (Parent et al., 1997; Parent et al., 1999; Jessberger et al., 2007; Shapiro et al., 2007).

Einen weiteren möglicherweise an der Epileptogenese beteiligter Mechanismus stellt das Aussprossen von Moosfasern (Axone der Granularzellen) dar. Hierbei kommt es zur Bildung neuer exzitatorischer Verbindungen mit Körnerzell- Dendriten im Gyrus dentatus und übergangsweise zu einer insgesamt Steigerung der Exzitabilität im Hippocampus. Die Ausbildung dieser aberranten Verbindungen bedeutet allerdings nicht, dass sie auch eine kritische Rolle bei der Auslösung von Anfällen spielen. Das Aussprossen von Moosfasern scheint zum einen über Verbindungen mit Körnerzellen zu neuen exzitatorischen Verschaltungen, andererseits über Verbindungen zu Korbzellen zur Wiederherstellung inhibitorischer Kreisläufe zu führen (Dudek et al., 1994; Sloviter, 2006). Die genaue funktionelle Bedeutung dieser gleichzeitigen Reinnervation ist noch nicht geklärt. Vermutlich ist die Moosfaser-Aussprossung eine Konsequenz der Degeneration postsynaptischer Zielzellen (CA3-Pyramidale Neurone) oder afferenter Neurone (hilarer Moosfasern) (Shetty et al, 2005). Es existieren widersprüchliche Aussagen, ob die Moosfasersprossung überwiegend zur Wiederherstellung der Inhibition im Gyrus dentatus führt oder zu einer chronischen Hyperexzitabilität, die die Entstehung von Anfällen begünstigt (Sloviter, 1992; Zhang et

al., 2002; Cavazos et al., 2003). In einer aktuellen tierexperimentellen Studie mit Mäusen bestand kein Zusammenhang zwischen Moosfasersprossung und dem Auftreten von Anfällen. Heng et al. stellten daher die Hypothese auf, dass es sich bei der Moosfasersprossung nur um ein Epiphänomen handeln könnte und sie keine Rolle bei der Entstehung der Temporallappenepilepsie spielen könnte (Heng et al., 2013).

Die während der Epileptogenese und der chronisch epileptischen Phase nach SE auftretende Ruptur der Blut-Hirn-Schranke (BHS), wie sie sowohl bei Patienten als auch tierexperimentell nachgewiesen werden konnte, scheint ebenfalls eine bedeutende Rolle für den Verlauf der sich später entwickelnden Epilepsie zu spielen (van Vliet, 2007).

1.4 Tierexperimentelle Ansätze

Ethische und methodische Limitationen in humanen Studien machen den Einsatz von tierexperimentellen Modellen notwendig. Mit Tiermodellen, die zu einer Induzierung einer chronischen Epilepsie führen, können Hypothesen bezüglich der Charakteristika des epileptogenen Prozesses und zellulärer Mechanismen der chronischen Epileptogenese überprüft werden. Das optimale Tiermodell wäre einfach und effizient reproduzierbar (z.B. niedrige Mortalität und hoher Anteil an Tieren mit rekurrenten Anfällen) und hätte die elektrographischen und anatomischen Charakteristika der menschlichen TLE, der häufigsten Form der Epilepsie (Hellier et al., 1998). Es existieren verschiedene Ansätze, um tierexperimentell eine Epilepsie zu induzieren. Je nach Modell ist es möglich, sowohl während der Epileptogenese als auch später bei dann bereits bestehender Epilepsie therapeutisch zu intervenieren oder pathophysiologische Veränderungen zu untersuchen. Im Folgenden werden die am häufigsten eingesetzten Modelle kurz vorgestellt.

1.4.1 Postischämische Modelle

Die häufigste Ursache für eine symptomatische Epilepsie sind zerebrovaskuläre Erkrankungen. Bei etwa 11% der Patienten mit Epilepsie liegt ätiologisch ein Schlaganfall zu Grunde (Hauser et al., 1993). Es existieren tierexperimentell verschiedene Möglichkeiten, eine zerebrale Ischämie zu induzieren. Zum einen kann mit Hilfe unterschiedlicher Techniken die Arteria cerebri media verschlossen werden.

Zum anderen gibt es die Möglichkeit, durch Injektion eines photosensitiven Farbstoffs, der zu Thrombosierungen führt, zerebrale Ischämien auszulösen. Der Anteil von Tieren, die in einem postischämischen Modell spontane rekurrente epileptische Anfälle entwickelten, lag bei einem Untersuchungszeitraum von 4 bis 12 Monaten bei ungefähr 4% (Karhunen et al., 2005).

1.4.2 Posttraumatische Modelle

Unter allensymptomatischen Epilepsien machen die durch ein SHT ausgelösten Epilepsien ca. 20% aus (Hauser, 1991). Eine Methode, um im Tierversuch eine traumatische Verletzung des Gehirns auszulösen, ist das Fluid-Perussion-Modell. Hierbei wird ein mechanischer Impuls über die Komprimierung einer Flüssigkeitssäule auf die freigelegte Dura eines sedierten Tieres übertragen (Abbildung 1.2). Dies führt in der Folge zu Verletzungen des darunter liegenden Hirngewebes (Pitkänen und McIntosh, 2006). Obwohl der Hippocampus vom Ort der gesetzten Verletzung deutlich entfernt ist, kommt es dort zu einem Neuronenverlust und sogar zu einer geringen Umorganisation von synaptischen Verbindungen im Gyrus dentatus und einer andauernden Hyperexzitabilität.

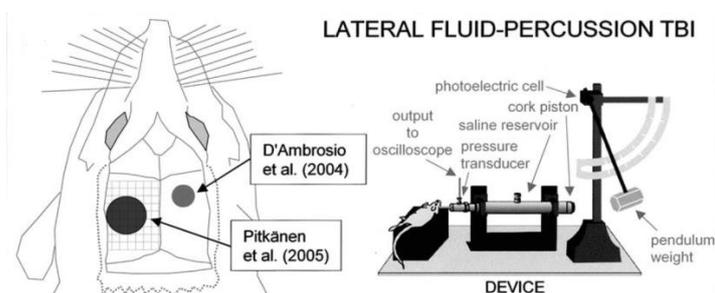


Abbildung 1.2: Übersicht über den experimentellen Aufbau des Fluid-Perussion-Modells nach Pitkänen und McIntosh, 2006.

Dennoch sind die vor allem durch die neokortikale Läsion ausgelösten Effekte nicht typisch für den Verlauf einer TLE beim Menschen. Weiterhin problematisch sind die zum Teil recht hohe Morbidität und Mortalität unter den Versuchstieren (Buckmaster, 2004). In posttraumatischen Tiermodellen entwickeln etwa 43-50% der Ratten eine chronische Epilepsie (Pitkänen und McIntosh, 2006; Kharatishvili, 2006).

1.4.3 Status epilepticus- Modelle

Ein SE kann sowohl elektrisch als auch chemokonvulsiv ausgelöst werden. Chemokonvulsiv besteht unter anderem die Möglichkeit der Injektion von Kainat (KA) und Pilocarpin. Beide Substanzen werden meist in Form mehrerer Injektionen

intraperitoneal gegeben. Es gibt aber beim Kainat auch die Möglichkeit, direkt in den Hippocampus zu injizieren. Je nach Dosis und Substanz treten nach drei bis fünf Injektionen Anfälle auf (Cavalheiro, 1982; Hellier et al., 1998; Parent et al., 1997).

Elektrisch erfolgt die Induktion eines SE üblicherweise mittels Tractus perforans-Stimulation. Die neuropathologischen Schädigungsmuster, die durch den SE verursacht werden können, sind der bei Patienten mit Epilepsie beobachteten Hippocampus-Sklerose sehr ähnlich (Walker et al., 1999).

Sowohl bei dem elektrisch als auch dem chemokonvulsiv ausgelösten SE kommt es zu Verlusten von hilaren Neuronen und Pyramidenzellen der CA3-Region, während die Granularzellen im Gyrus dentatus und die Pyramidenzellen der CA2-Region resistent sind. Den Hauptunterschied zum Krankheitsverlauf beim Menschen bildet der Zellverlust in CA1, der bei Patienten mit Epilepsie häufiger auftritt, im Tiermodell allerdings nicht vorkommt. Es existiert allerdings eine signifikante Gruppe von Patienten, bei denen eine isolierte Schädigung hilarer Neurone im Gyrus dentatus und Pyramidenzellen in CA3 auftritt und deren Schädigungsmuster dem im Tiermodell nahezu entspricht (Sloviter, 1991). Ähnlich der klinischen Situation beim Menschen entwickeln 80 bis 100% der Ratten innerhalb von 4 bis 8 Wochen nach einem experimentell induzierten SE (chemokonvulsiv oder mittels elektrischer Stimulation) spontane rezurrenente epileptische Anfälle (Cavalheiro, 1982; Holtkamp, 2005a).

Im Vergleich zu den posttraumatischen und postischämischen Modellen stellt der experimentell induzierte SE auf Grund des hohen prozentualen Anteils der später epileptischen Tiere sowie des mit der Klinik vergleichbaren Schädigungsmuster eine geeignete neurologische Modellerkrankung dar. In diesem Modell können tierexperimentell, nah am klinischen Vorbild, therapeutische Interventionen nach einer ZNS-Schädigung hinsichtlich ihrer antiepileptogenen und neuroprotektiven Eigenschaften untersucht werden.

1.5 Therapie und Therapieveruche bei Epilepsie

1.5.1 Pharmakologische Ansätze

Die pharmakologischen Ansätze zur Therapie akuter Anfallserkrankungen wie SE, der sich anschließenden Epileptogenese und schließlich der Epilepsie unterscheiden sich deutlich.

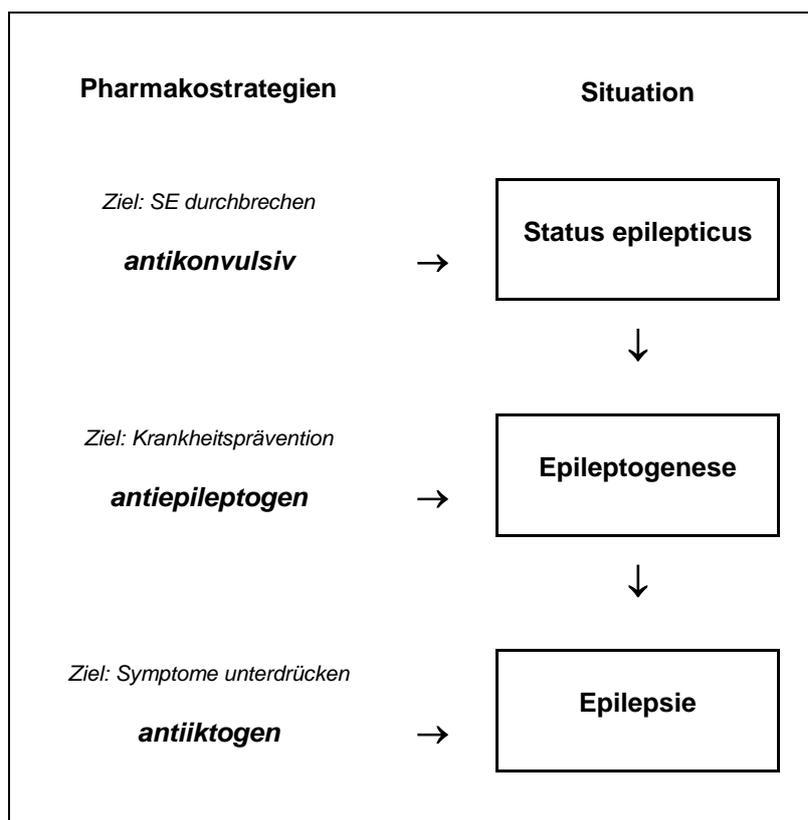


Abbildung 1.3: Pharmakostrategien, ihre Behandlungsziele und Anwendungssituationen (modifiziert nach Holtkamp und Meierkord, 2007).

Bei einem SE ist das wichtigste Ziel, die anhaltende epileptische Aktivität des Gehirns so schnell wie möglich zu unterbinden. Diese Pharmakostrategie wird häufig als *antikonvulsiv* bezeichnet, auch wenn sich nicht alle klinischen Formen des SE als konvulsiv darstellen. Nachdem das Gehirn eine Schädigung (SE, SHT, Schlaganfall etc.) erlitten hat, liegt der Fokus der Behandlung auf der Krankheitsprävention, also der Verhinderung der Entwicklung einer Epilepsie. Dieser Ansatz wird als *antiepileptogen* bezeichnet. Bei einer bereits bestehenden Epilepsie geht es um die Anfallskontrolle, d.h. um die Unterdrückung von Anfällen. Dies bezeichnet man als *antiiktogen* (lat. ictus: Schlag, Anfall) (Abbildung 1.3). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es aber weder gelungen,

das Auftreten einer Epilepsie nach vorherigem Trauma zu verhindern, noch eine bestehende Epilepsie über die Unterdrückung der Anfälle hinaus mit Hilfe pharmakologischer Interventionen zu modifizieren (Holtkamp und Meierkord, 2007).

Insgesamt ist etwa ein Drittel der Betroffenen mit Epilepsie pharmakoresistent (Wiebe et al., 2001). Das entspricht ca. 200 000 in Deutschland. Von einer Pharmakoresistenz spricht man dann, wenn unter der Gabe von zwei adäquat gewählten und in ausreichend hoher Dosis gegebenen Antiepileptika (als sukzessive Monotherapie oder als Kombinationstherapie) über 12 Monate keine anhaltende Anfallsfreiheit erzielt werden kann (Kwan et al., 2010). Bei ca. der Hälfte bis zu drei Viertel der pharmakoresistenten Fälle (ca. 100 000 – 150 000 Betroffene in Deutschland) ist ein epilepsiechirurgischer Eingriff - oft die letzte Therapiemöglichkeit - entweder nicht möglich oder er bietet keinen ausreichenden Gewinn für den Patienten (Wiebe et al., 2001; Engel, 1992). Pharmakoresistente schwer kontrollierbare Epilepsien sind assoziiert mit kognitiven und neuropsychologischen Defiziten und einer verminderten Lebensqualität (Helmstaedter, 2006) sowie einer 0,5 - 1% erhöhten jährlichen Mortalität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Wiebe, 2004; Thom, 2010).

In mehreren randomisiert kontrollierten Studien wurden daher bei Patienten mit SHT häufige in der Klinik verwendete antiiktogene Medikamente (Carbamazepin, Phenobarbital und Phenytoin) auf ihre antiepileptogenen Eigenschaften hin untersucht. Bei keiner der verwendeten Substanzen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Placebo (Temkin et al., 2009). Die in verschiedenen Tierexperimenten nach SE erfolgte Gabe von in der Klinik üblicherweise verwendeten antiiktal wirksamen Substanzen hatte keinen antiepileptogenen oder krankheitsmodifizierenden Effekt. So waren die Einsätze von Ketamin (Hort, 1999), Koffein (Rigoulot, 2003), Lamotrigin (Halonen, 2001), Levetiracetam (Klitgaard, 2001), MK-801 (Brandt, 2003), Valproinsäure (Brandt, 2006), Vigabatrin (André, 2001) bzw. Lacosamid (Licko et al., 2013) ohne ausreichenden Effekt. Vor kurzem wurden in einer Phase II Studie neuere Antiepileptika wie Levetiracetam bei Patienten mit SHT untersucht (Klein et al., 2012). Eine Phase III Studie zur weiteren Feststellung antiepileptogener Eigenschaften dieser Substanzen steht zurzeit noch aus. Zusammenfassend konnte jedoch in keiner dieser Studien ein antiepileptogener Effekt gezeigt werden (Holtkamp und Meierkord, 2007; Kobow et al., 2012; Löscher und Brandt, 2010).

1.5.2 Hypothermie – ein non-pharmakologischer Ansatz

Eine Senkung der Körpertemperatur (Hypothermie) führt zu einer Verbesserung der strukturellen und funktionellen Prognose- Parameter sowohl nach experimentellem als auch klinischem SHT (Polderman, 2008; Wang, 2011). Es ist weiterhin gut bekannt, dass Hypothermie insgesamt zu einer Reduzierung der kortikalen Erregbarkeit führt. Wegen dieser Eigenschaft ist sie während epilepsiechirurgischer Eingriffen angewendet worden, um intraoperativ Spikes zu unterdrücken (Karkar et al., 2002). In einigen Fällen konnte Hypothermie auch im therapeutischen Management von therapierefraktärem SE einen Beitrag leisten (Guilliams et al., 2013; Orłowski et al., 1984).

In verschiedenen Modellen mit lebenden Tieren (in vivo) konnte experimentell der akute antikonvulsive Effekt der Hypothermie nachgewiesen werden. In einem Modell mit chemokonvulsiv induzierten Anfällen mit Kainat konnten bei einer Hypothermie von 28°C ictale Entladungen um 50 % reduziert, bei einer Körpertemperatur von 23°C diese sogar vollständig unterdrückt werden. Eine Senkung der Körpertemperatur auf 28°C hat im weiteren Verlauf jegliche hippocampale Neuronenverluste verhindert, wohingegen umgekehrt eine Hyperthermie bei 42°C zu deutlich stärkeren Zellverlusten und Anfällen bis zum Tod der Tiere führte (Liu et al., 1993). Ein ähnlicher Effekt mit vermindertem neuronalen Zellschaden in neocorticalen Strukturen und in den Basalganglien nach Kühlung konnte auch bei 32,5°C reproduziert werden (Lundgren, 1994). Bei einer Hypothermie von 30°C zeigte sich zudem ein verminderter Glucose-Verbrauch der Zellen (Maeda et al., 1999). In posttraumatischen Modellen bei 30-33°C konnte das verminderte Aussprossen von Moosfasern- allerdings nicht der nach SHT auftretenden Verlust von Neuronen im Gyrus dentatus - beobachtet werden (Bramlett 1997; Atkins, 2010).

Die Kombination von systemischer Hypothermie bei 29°C und einer subtherapeutischen Dosis Diazepam (2 mg/kg i.p.) nach elektrisch induziertem SE zeigte eine signifikante Reduktion von Frequenz und Amplitude von epileptischen Entladungen im EEG. Dieser Effekt war reversibel, die ictalen Entladungen waren nach Erwärmen der Tiere wieder vorhanden (Schmitt et al., 2006). Bei Kühlung auf 20°C im gleichen Modell zeigte sich auch nach Wiedererwärmen eine anhaltende komplette Unterdrückung von motorischer Anfallsaktivität und elektrophysiologischen Entladungen (Kowski et al., 2012).

Die therapeutischen Effekte der Hypothermie reduzieren sich jedoch nicht nur auf Anfallskontrolle und verminderte Neuronenverluste. Zusätzlich konnten auch eine verminderte intrazerebrale Ödembildung und verbesserte kognitive Funktion bei Ratten nach chemokonvulsiv induziertem SE gezeigt werden (Wang et al., 2010). Weiterhin zeigte sich nach Hypothermie eine reduzierte Freisetzung freier Sauerstoffradikale (Maier et al., 2002), eine Hemmung der Apoptose (Maier et al., 1998), eine allgemeine Reduktion des metabolischen Bedarfs (Schaller und Graf, 2003), Veränderungen postsynaptischer spannungsabhängiger Kanäle (Schiff and Somjen, 1985; Shen und Schwartzkroin, 1988; Thompson et al., 1985), Veränderungen von Membraneigenschaften über Ionenkanäle (Aihara et al., 2001; Volgushev et al., 2000) und eine präsynaptisch deutlich verminderte Freisetzung von exzitatorischen Transmittern (Volgushev et al., 2004; Yang et al., 2005).

Relevante, an der Epileptogenese beteiligte pathophysiologische Veränderungen wie die Akkumulation von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (McNamara et al., 2006) treten in der ersten Stunde nach experimentellem SE auf (Naylor et al., 2013). Hieran anknüpfend und auf Grund von vorbeschriebenen antiglutamatergen Effekten der Hypothermie (Van Hemelrijck et al., 2003; Winfree et al., 1996) wurde in der Planung der hier vorgestellten Studie die Hypothese aufgestellt, dass die Anwendung von Hypothermie über 3 Stunden direkt im Anschluss an einen experimentell induzierten SE antiepileptogene Eigenschaften haben könnte.

1.6 Ziele der Arbeit

Gängige Therapien und Interventionen gegen Epilepsie erreichen im besten Fall eine gute Kontrolle der Anfälle, haben aber bisher keinerlei Einfluss auf die Entstehung der Epilepsie. Es gibt daher eine dringende Notwendigkeit, therapeutische Ansätze zu entwickeln, die die Epileptogenese nach ZNS-Schädigungen, wie einem SE, verhindern. Die Hypothermie stellt eine bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend erforschte non-pharmakologische Alternative dar. Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte der Hypothermie zum einen auf das Auftreten von Anfällen nach SE und zum anderen auf die Entwicklung der Inhibition im Gyrus dentatus zu untersuchen. Die Hypothese ist, dass die Tiere, die gekühlt werden, weniger oder im besten Fall gar keine Anfälle entwickeln und dass der bekannte transiente Inhibitionsverlust im Gyrus dentatus in den ersten Tagen und Wochen nach SE unterdrückt werden kann.

2 Methodik

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (bezogen über die Tierzucht der Charite, FEM (Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin) Steglitz, Deutschland, sowie über die Tierzucht der Firma Janvier, Frankreich) im Alter von 6-8 Wochen mit einem Gewicht von 230-400 g verwendet. Vor der Elektroden-Implantation wurden die Tiere in Gruppen von zwei bis zu sechs Tieren in Kunststoffboxen („Typ 4“, 55 x 33 x 20 cm, Ebeco, Deutschland) mit Gitterdeckeln („Typ 4 Standard“, 55,7 x 33,2 x 0,5 cm, Ebeco, Deutschland) gehalten. Nach der Elektroden-Implantation waren die Tiere einzeln in den Käfigen, um ein gegenseitiges Verletzungsrisiko zu vermeiden. Die Haltung erfolgte in einer kontrollierten Umgebung mit konstant gehaltener Temperatur (19-23°C) und Luftfeuchtigkeit (55-60%) bei einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus. Wasser und Futter („Altromin 1326 Standard-Diät Ratten-Mäuse“, Altromin, Lage, Deutschland) waren für die Tiere jeder Zeit frei verfügbar. Das Käfigstreu („Altromin animal bedding“, Altromin, Lage, Deutschland) wurde mindestens einmal wöchentlich gewechselt. Zur Zahnpflege und Beschäftigung wurden den Tieren kleine Holzblöcke (ca. 10x2x2cm) zum Nagen in den Käfig gelegt.

Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte gemäß dem in Deutschland geltenden Tierschutzgesetz (TierSchG, 5. Abschnitt, §7-§9 Tierversuche). Sämtliche Eingriffe und Prozeduren waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G 0407/08).

2.2 Versuchsgruppen

Die Tiere (n=28) wurden in drei Gruppen eingeteilt: 1) Eine Studiengruppe (n=9) (im Folgenden: „Hypotherme Tiere/ 25°C-Gruppe“), die nach Stimulation und selbsterhaltendem Status epilepticus (engl. self-sustaining status epilepticus, SSSE) auf eine Körpertemperatur von 25°C gekühlt wurde. 2) Einer Gruppe von Tieren (n=9) wurden Elektroden implantiert, die Tiere wurden aber nicht elektrisch stimuliert, sodass kein Status epilepticus auftrat (im Folgenden: „Elektrodenkontroll-Gruppe“). 3) Eine weitere Gruppe von Tieren (n=10) wurde nach Elektrodenimplantation in den Status epilepticus stimuliert, es erfolgte im Anschluss jedoch keine therapeutische Intervention

in Form einer Kühlung, die Tiere wurden im Gegenteil auf einer Körpertemperatur von 37°C gehalten (im Folgenden: „Normotherme Tiere/ 37°C-Gruppe“) (Abbildung 2.8). Die Elektrodenkontroll- Gruppe wurde gebildet, um den Einfluss der implantierten Elektroden zu untersuchen. Die 37°C-Gruppe diente der Untersuchung des Effekts der Kühlung auf die Epileptogenese und mögliche elektrophysiologischen Veränderungen.

2.3 Technischer Aufbau

Zur Durchführung der Experimente waren mehrere technische Geräte notwendig. Zum einen, um elektrische Stimuli zu applizieren, zum anderen, um Signale ableiten und aufzeichnen zu können.

Während der Stimulation, dem SSSE und während der folgenden Messungen befanden sich die Tiere in einem nach oben offenen Käfig (30cm x 40cm x 55cm) und waren über den auf ihrem Kopf befindlichen Sockel über ein Kabel mit einer Halterung (Swivel Commutator, SL6C, Plastics One Inc, USA) verbunden. Der untere Teil dieser Halterung (im Folgenden Swivel genannt) konnte sich auf Grund eines Kugellagers drehen. Dadurch war es den Tieren möglich, sich frei zu bewegen. Der Swivel war mit zwei komplementären Steckern ausgestattet. An dem unteren Stecker war das Tier über sein Kabel verbunden. Auf der Oberseite waren die Kabel der Geräte des im Folgenden beschriebenen NeuroLog-Systems angeschlossen und über den Swivel mit dem Tier verbunden.

Das NeuroLog besteht aus einem Vorverstärker (NeuroLog System, A.C. Preamplifier NL104, Digitimer LTD., Hertfortshire, UK), über den die abgeleiteten Signale aufgenommen wurden. An das NeuroLog war ein Oszilloskop (TDS 210 Two Channel Digital Real Time Oscilloscope, Tektronix, Beaverton, USA) angeschlossen, über welches Signale abgelesen werden konnten. Weiterhin besteht es aus einem Stimulusgenerator (NeuroLog System, Pulse Generator NL 301, Digitimer LTD., Hertfortshire, UK) und -isolator (NeuroLog System, Stimulus Isolator NL 800, Digitimer LTD., Hertfortshire, UK), über welche zum einen Stimuli appliziert, als auch deren genaue Eigenschaften (Stromstärke, Pulsdauer) eingestellt werden konnten. Das ganze System war über einen Analog-Digital-Wandler (CED, ADC12) mit einem Computer verbunden, wodurch alle Messungen mit Hilfe des Programms WinTida (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet werden konnten.

Darüber hinaus war über den Swivel auch noch ein Temperaturmessgerät (Ahlborn ALMEMO 2290-3) angeschlossen. Die Temperaturdaten wurden mit der Software AMR WinControl (Version 2.2.3.0, akrobit software Schmidt&Sloboda) während der Stimulation, dem SSSE und der Kühlung bzw. Warmhaltung bei 37°C im Minutentakt aufgezeichnet. Über WinControl war es möglich, einen Grenzwert festzulegen, unter den die Körpertemperatur des Tieres nicht fallen sollte. Die Messung erfolgte über eine bei den Versuchstieren subdural implantierte Temperaturelektrode (siehe Abs. 2.4). Das Temperaturmessgerät (Ahlborn ALMEMO 2290-3) war über einen Relaisadapter (Ahlborn Relaisadapter 2280 RA) mit einer Wärmelampe verbunden. Diese schaltete sich ein, sobald die Körpertemperatur unter den Grenzwert fiel und schaltete sich bei Erreichen der Zieltemperatur wieder aus. Bei den hypothermen Tieren lag der untere Grenzwert bei 24,90°C, Zieltemperatur war 25°C. Bei den normothermen Tieren lag der untere Grenzwert bei 36,90°C, die Zieltemperatur bei 37°C.

Für die Langzeit- Aufzeichnung konnte aus technischen Gründen nicht das NeuroLog-System verwendet werden. Für die Aufzeichnung des 48 Stunden-EEGs wurden Geräte der Firma Cambridge Electronic Design (CED) verwendet. Über einen mit dem Swivel verbundenen Vorverstärker (CED, 1902 pre-amplifier), wurde das Signal an einen Verstärker (CED, Micro 1401 mk1) weitergeleitet. Über die Verbindung mit einem Analog-Digital-Wandler (CED, ADC12) wurde das Signal an einen Computer weitergeleitet. Mit dem Programm Spike2 (CED, Spike2, Version 7) wurde das EEG aufgezeichnet und später auch ausgewertet (Abbildung 2.9). Die Daten der Kamera wurden mit Hilfe einer Videocapture-Karte (Firma Lupus, Deutschland) direkt auf der Festplatte gespeichert und konnten im Nachhinein mit Hilfe der mitgelieferten Software ausgewertet werden.

2.4 Elektrodenimplantation

Alle Tiere wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion mit 52 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (4 g Pentobarbital (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland)/ 500 ml Aqua dest. + 500 ml Propylenglykol) sediert und durch eine subkutane Injektion mit 0,05 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, Deutschland) analgesiert. Nach ca. 1,5 Stunden wurde erneut die Narkosetiefe geprüft und bei Bedarf 4mg/kg KG Pentobarbital-Lösung nachgespritzt. Zur Überprüfung der Narkose-Tiefe wurde mit Hilfe einer Pinzette ein Schmerzreiz an der Schwanzspitze gesetzt ("tail pinch response").

Erfolgte darauf keine Reaktion, war das Tier ausreichend tief sediert. Zu Beginn der Operation wurde dem Tier, zum Schutz der Hornhaut, Panthenol-Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Roche, Deutschland) auf die Cornea aufgetragen. Anschließend wurde der Kopf des Tieres, mit Hilfe eines handelsüblichen Elektrorasierers, im Bereich zwischen den Ohren bis kurz vor die Augen rasiert. Danach wurde es in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Dabei war der Kopf des Tiers seitlich über eine Ohrenhalterung (=earbars) und an der Schnauze über einen Nasenbügel fixiert. Die Längsseiten des Rahmens waren bemaßt, sodass man die genaue Position der Stereotaxiearme, die darauf befestigt wurden, einstellen konnte.

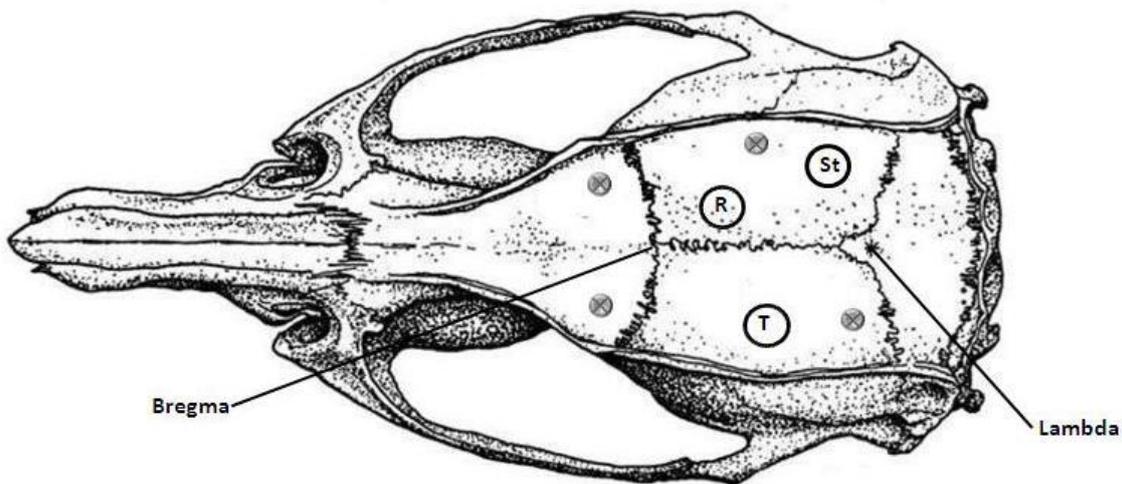


Abbildung 2.1: Schematische Abbildung der Position der Bohrlöcher für Schrauben und Elektroden; R: (Recording) Ableitelektrode; St: Stimulationselektrode; T: Temperaturelektrode; modifiziert nach Paxinos und Watson, 1998.

Nach kreisförmiger Entfernung der Kopfhaut mit Hilfe von Schere und Pinzette wurde das subkutane Gewebe und Periost vom Knochen entfernt. Um später eine bessere Haftbarkeit des Dentalkunststoffes gewährleisten zu können, wurde der Knochen mit einem Knochenschaber aufgeraut. Anschließend wurde ein Tropfen 3%-H₂O₂-Lösung auf die freigelegte Kalotte appliziert, um letzte Rückstände von Fett zu entfernen. Aus dem gleichen Grund wurde eine dünne Schicht Cyanacrylatkleber (Weicon, VA 100) aufgetragen, um kleinere Löcher im Knochen, durch die Blut oder Liquor austreten könnten, zu verschließen.

Bevor die Koordinaten für die Bohrlöcher ausgemessen wurden, musste überprüft werden, ob die beiden Orientierungspunkte Lambda und Bregma in der richtigen Ebene zueinander lagen. Das Bregma ist die Kreuzungsstelle von Sutura coronalis (Kranznaht zwischen Stirn- und beiden Scheitelbeinen) und Sutura sagittalis (Pfeilnaht zwischen

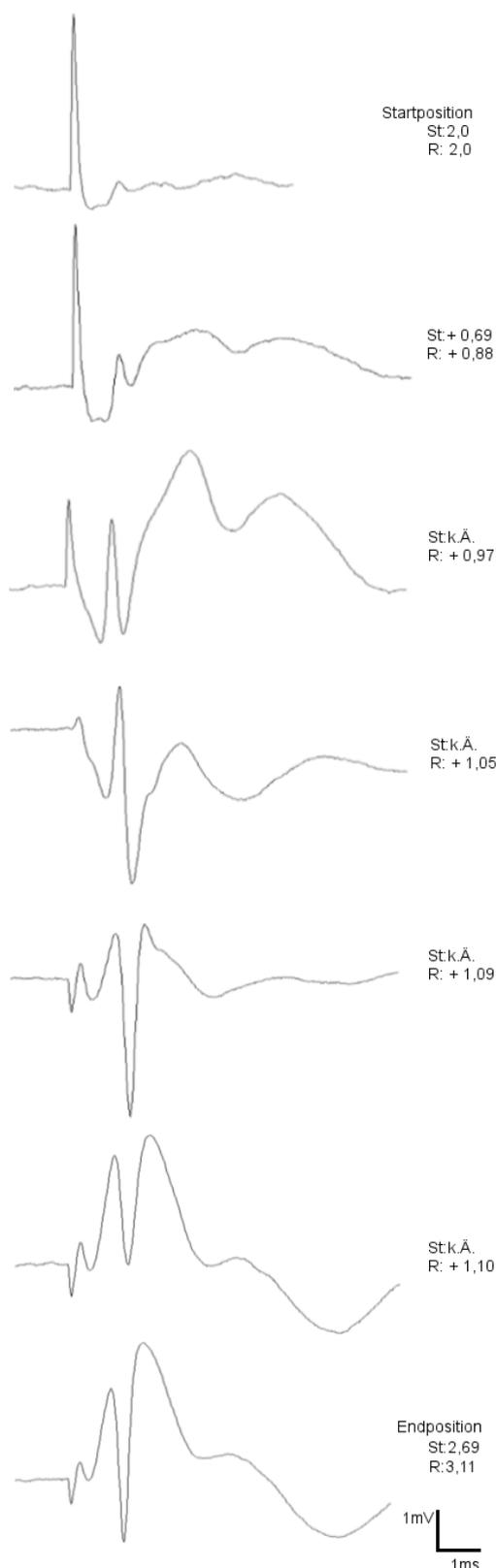


Abbildung 2.2: Verlauf des EPSP während des Absenkens der Elektroden.

St: Tiefe der Stimulationselektrode in mm;
R: Tiefe der Ableitelektrode in mm;
k.Ä.: Keine Änderung der Eindringtiefe.

rechtem und linkem Scheitelbein). Das Lambda ist die Kreuzungsstelle von Sutura lambdoidea (Lambdanaht zwischen Hinterhauptbein und beiden Scheitelbeinen) und Sutura sagittalis (Abbildung 2.1). Das Bregma sollte 1 mm höher liegen, als das Lambda. Die genaue Einstellung war über Verstellung des Nasenbügels zu erreichen. Anschließend wurde in einen der Stereotaxiearme eine an ihrer Öffnung begradigte Kanüle eingespannt. Diese wurde unter Mikroskopsicht exakt auf das Bregma aufgesetzt und die Koordinaten am Rahmen abgelesen. Den Daten aus dem stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (Paxinos & Watson, 1998) folgend wurden die Koordinaten für die Bohrlöcher der Elektroden berechnet, eingestellt und mit der in Tinte getauchten Kanüle markiert. Die Koordinaten für die Stimulationselektrode, die in das *Angular bundle* des Tractus perforans eingesetzt werden sollte, betragen vom Bregma +6,9 mm posterior und +4,1 mm lateral. Für die Ableitelektrode, die in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus eingesetzt werden sollte, betragen die Koordinaten vom Bregma +3,1 mm posterior und +1,9 mm lateral (Abbildung 2.1). Zusätzlich zu den zwei markierten Positionen wurde auf der kontralateralen Seite (der linken Schädelhälfte) auf Höhe der Position der Ableitelektrode ein weiteres Loch für die Temperaturelektrode gebohrt (Bohrmaschine Proxxon FBS 230/E, Proxxon, Niersbach, Deutschland; Bohrerdurchmesser 2 mm), sowie vier weitere mit

geringerem Durchmesser (Position siehe Abbildung 2.1; Durchmesser 0,8 mm), in die später Edelstahlschrauben (Schließblockschrauben VI-076/C, Optotec, Rathenow, Deutschland) eingedreht wurden. Die Kalotte wurde dabei, aus Gründen der Stabilität, unter Schonung der Dura, an möglichst weit auseinander liegenden Stellen durchbohrt. Die vier Schrauben dienten einerseits zur besseren Fixierung des später zu applizierenden Dentalkunststoffs, andererseits wurden die beiden anterioren Schrauben jeweils mit einem der beiden Schenkel der Erdeelektrode (zwei ca. 3 cm lange Silberdrähte (Silberdraht, 0,2 mm Durchmesser, hart, Allgemeine Gold- und Silberscheideanstalt AG, Pforzheim, Deutschland)) umwickelt. Die Temperaturelektrode (Mikro-Thermistor, Delta, München) wurde im dafür vorgesehenen Loch vorsichtig in den Epiduralraum vorgeschoben, anschließend wurde das Temperaturmessgerät angeschlossen und dessen Funktionalität überprüft. Ableit- (unipolare 0,28 mm dicke Polymide-isolierte Edelstahlelektrode mit Sockel (intracranial electrode with socket, E363/1, Plastics One Inc., USA)) und Stimulationselektrode (zwei miteinander verdrehte 0,15 mm dicke Formvar-isolierte Edelstahlelektroden mit Sockel (intracranial electrode with socket, E363/3, Plastics One Inc., USA)) wurden in je einem der beiden Stereotaxiearme fixiert, anschließend wurden noch einmal, vom Bregma ausgehend, die Koordinaten vermessen und berechnet. Beide Elektroden wurden über Kabel mit dem NeuroLog-System verbunden und danach bis auf die Dura abgesenkt. Anschließend wurden beide Elektroden um 2,0 mm in das Hirngewebe abgesenkt und nach Überprüfung des Vorhandenseins eines Stimulusartefaktes (siehe Abbildung 2.2), für 10-15 Minuten unmanipuliert in ihrer Anfangsposition belassen. Nach dieser Pause wurde die Ableitelektrode in 0,01 - 0,25 mm Schritten tiefer in das Gewebe abgesenkt. Nach jedem Schritt wurde mindestens ein Einzelreiz (4mA, 150µs Pulsdauer) appliziert. Nach jeweils 10 Einzelreizen wurde eine zweiminütige Pause eingelegt. Diese sollte verhindern, dass die gereizten Zellen refraktär werden, wodurch man kein Signal mehr hätte ableiten können. Entsprechend der Amplitude und Form des Antwortpotentials erfolgte die Orientierung bezüglich der Position der Elektroden. Ein beispielhafter Verlauf ist der Abbildung zu entnehmen. Nach Erreichen der Endposition wurde das Potential mit dem Programm WinTida aufgezeichnet.

Anschließend wurde der Zahnzement angemischt (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG). Sobald dieser eine zähflüssige Konsistenz erlangt hatte, wurde die Kalotte damit bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Ableitelektrode so einzementiert wurde, dass beim späteren Lösen der Stereotaxiearme die Position der Elektrode nicht

mehr verändert werden konnte. Sobald der Zahnzement ausgehärtet war, konnten die Stereotaxiarme gelöst werden. Die Enden der Elektroden wurden nun in einen mit 6 Kanälen ausgestatteten Elektrodensockel (*Pedestal*, MS363, Plastics One Inc.) eingefügt (Abbildung 2.3). Die einzelnen Elektroden sollten sich nicht berühren, um mögliche Wechselwirkungen (z.B. Kurzschlüsse, elektrisches „rauschen“) zu vermeiden, die unter Umständen später die Ableitung des Signals stören könnten. Dieser Sockel wurde dann mit einer zweiten Schicht Zahnzement fixiert.

Abschließend wurde das Tier über den Sockel noch einmal mit dem NeuroLog-System verbunden, um die Funktion der Elektroden zu überprüfen. Im Anschluss wurde den Tieren 5 ml 5%-Glucose- Lösung (Glucose 5%-Infusionslösung, B.Braun) s.c. in das Nackenfell gespritzt. Bis zum Nachlassen der Narkose wurden die Ratten beobachtet und bei Bedarf mit Hilfe einer Wärmelampe aufgewärmt.

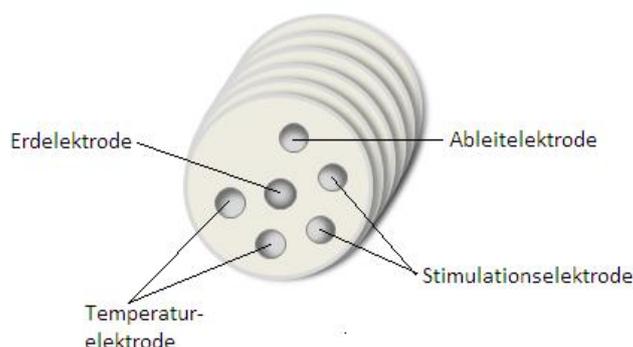


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Elektrodensockels und Lokalisation in welche die Kontakte der Elektroden eingeführt wurden.

2.5 Induzierung eines selbsterhaltenden Status epilepticus

Die Induzierung des SSSE, im Folgenden Stimulation genannt, erfolgte 8-11 Tage nach der Implantation der Elektroden. Die Stimulation erfolgte für zwei Stunden mit einem kontinuierlichen Stimulus bei einer Frequenz von 20 Hz und einer Pulsdauer von 150 μ s. Es wurde die für die zuvor durchgeführte Paired-Pulse-Messung für jedes Tier individuell ermittelte submaximale Stimulusintensität beibehalten (siehe 2.7). Während der Stimulation wurden Anzahl und Stärke der auftretenden Anfälle sowie das generelle Verhalten der Tiere protokolliert. Bei der Beschreibung der Anfälle wurde die Klassifikation von Racine verwendet (Racine, 1972) (Tabelle 2.1).

Anfallsklassifikation modifiziert nach Racine

Schweregrade	Klinisches Erscheinungsbild
1	schwache faziale Klone (stereotypes Schnuppen, Schließen der Augen)
2	starke faziale Klone (Kaubewegungen, Kopfnicken)
3	wie Stadium 2, zusätzlich ein- oder beidseitige Klone der vorderen Extremität
4	wie Stadium 3, zusätzlich Aufrichten auf den Hinterbeinen
5	wie Stadium 4, zusätzlich nach hinten oder zur Seite Umfallen (Verlust der posturalen Kontrolle)

Tabelle 2.1 Klassifikation um die Stärke epileptischer Anfälle bei Ratten und Mäusen zu beschreiben.

Nach zwei Stunden wurde die Stimulation beendet, die Tiere wurden für drei Stunden im SSSE belassen. In der Ableitung des lokalen Feldpotenzials (im Weiteren vereinfachend EEG genannt) waren nun hochamplitudige Entladungen zu beobachten (diese waren während der Stimulation durch Artefakt-Überlagerung nicht erkennbar). Die Frequenz musste definitionsgemäß größer 1 Hz sein, um die Kriterien eines selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) zu erfüllen (Walker et al., 1999) (Abbildung 2.4).

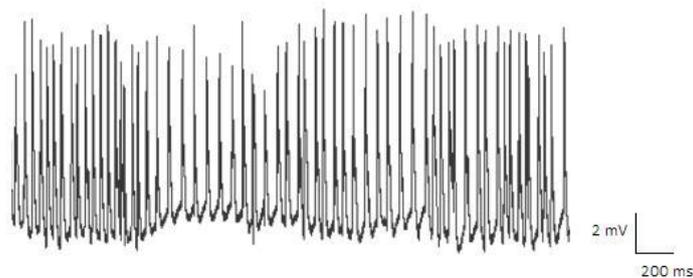


Abbildung 2.4: Ausschnitt aus der elektrophysiologischen Darstellung eines SSSE. Zu sehen sind die hochfrequenten Entladungen abgeleitet aus dem Gyrus dentatus mit $> 1\text{ Hz}$.

Zur Dokumentation des SSSE wurde eine Minute, eine Stunde, zwei Stunden und drei Stunden nach Ende der Stimulation für jeweils zwei Minuten ein EEG mit dem Programm WinTida aufgezeichnet und die momentane Frequenz der Entladungen notiert. Nach drei Stunden wurde den Tieren zur Durchbrechung des SSSE 52 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal appliziert. Danach wurde 1 min nach SSSE noch eine EEG-Spur aufgezeichnet, um festzuhalten, dass sich das Tier elektrophysiologisch nicht mehr im SSSE befand.

2.6 Hypothermie und Normothermie

Nach der Durchbrechung des SSSE mit Pentobarbital wurden die Tiere der Versuchsgruppe 3 Stunden lang auf 25°C gekühlt oder bei 37°C warm gehalten. Die Auswahl, in welche Gruppe die Tiere nach Ende des SSSE eingeteilt wurden, erfolgte alternierend. Die Zuordnung stand bereits vor Beginn der Stimulation fest.

Die Kühlung erfolgte mit Kühlakkus, die um das Tier platziert wurden. Um Erfrierungen zu vermeiden, durften die Kühlakkus die Tiere nicht direkt berühren. Zusätzlich wurden empfindliche Körperteile wie Schwanz, Pfoten und Ohren in Schaumstoff eingepackt bzw. mit Gaze umwickelt. Die Körpertemperatur wurde wie auch schon während der Stimulation und des SSSE mit dem Programm WinControl minütlich über den gesamten Untersuchungszeitraum aufgezeichnet. Um die Zieltemperatur zu gewährleisten, wurden die Kühlakkus alle 30 Minuten ausgetauscht. Bei Unterschreitung der Zieltemperatur schaltete sich die Relais-gesteuerte Wärmelampe ein (siehe 2.3). Nach Abschluss der 3 Stunden wurden die Tiere, die gekühlt worden waren, mit Hilfe der Wärmelampe über einen Zeitraum von ca. 1 Stunde bis auf 37°C Körpertemperatur wiedererwärmt. Die Tiere der Elektrodenkontroll-Gruppe wurden wie die normothermen Tiere für 3 Stunden bei 37°C Körpertemperatur gehalten.

2.7 Video-EEG-Untersuchung

Die Video-EEG-Untersuchungen wurden zu vier Zeitpunkten, für jeweils 48 Stunden Seiten, standen vier der bereits beschriebenen, nach oben offenen Käfige. Darüber war



Abbildung 2.5: Ansicht eines Tieres im Video-Monitoring mit Blick von oben.

über zwei an den Seiten stehenden Stativen eine Stange befestigt, an der die Kamera, die Rotlichtlampe für die Nachtaufzeichnung, der Vorverstärker für die Ableitung des

EEG, sowie in der Mitte über jedem Käfig je ein Swivel befestigt waren. Die Aufzeichnungen des Videos erfolgten mit Sicht von oben auf die Tiere (Abbildung 2.5).

2.8 Elektrophysiologie (Paired-Pulse-Paradigma)

Die Paired-Pulse-Technik ist eine vielfach angewendete Messmethode, mit der sowohl Inhibitions- als auch Exhibitionsparameter im hippocampalen Kreislauf von gesunden und epileptischen Tieren gemessen werden können (Waldbaum und Dudek, 2009). Bei der Paired-Pulse-Messung werden mit kurzem zeitlichem Abstand zwei aufeinanderfolgende elektrische Stimuli induziert. Die Zeit zwischen den beiden Stimuli wird als Interpuls-Intervall (IPI) bezeichnet. Um die Stimulusintensität zu ermitteln, mit der die Messung durchgeführt werden sollte, wurde vor jeder Paired-Pulse-Messung eine Input-Output-Kurve erstellt. Dabei wurde die Stromstärke, ausgehend von 1 mA bis 10 mA, in 0,5 mA -Schritten erhöht. Die niedrigste Stromstärke, bei der die Amplitude des exzitatorisch postsynaptischen Potentials (EPSP) maximal war, wurde als der maximale Stimulus definiert. Die Messung wurde dann mit einem submaximalen Stimulus durchgeführt (0,5 mA unterhalb des Maximums).

Der Doppel-Puls wurde mit Hilfe eines Scripts, welches im Programm WinTida integriert war, ausgelöst. Vor Auslösung der Stimuli musste über den Puls-Generator vor jeder Einzelmessung die entsprechende Frequenz eingestellt werden, damit das entsprechende IPI ausgelöst werden konnte (Tabelle 2.2).

Korrespondierende Frequenz zu Interpulsintervall (IPI)

Frequenz [Hz]	IPI [ms]
50	20
40	25
30	30
25	40
20	50
10	100
3	300
2	500
1	1000

Tabelle 2.2: Einzustellende Frequenz am Puls-Generator vor der Paired-Pulse-Messung, um ein korrespondierendes IPI zu erhalten

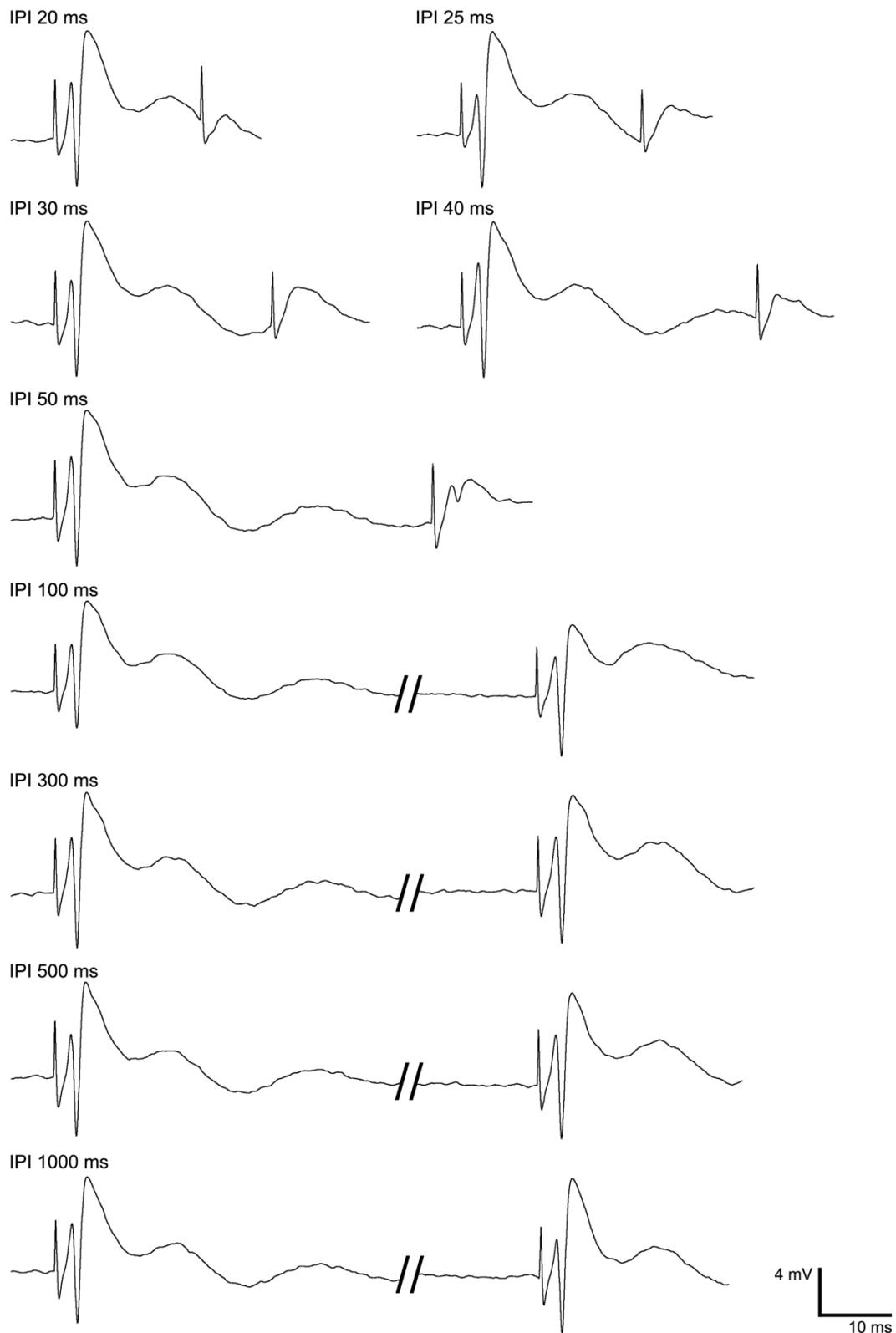


Abbildung 2.6: Verlauf der Paired-Pulse-Messung im naiven Tier, IPI 20 ms - 1000 ms. Zu sehen ist, dass mit zunehmendem IPI, das EPSP nach dem zweiten Stimulus weniger inhibiert wird und, dass es bei 100ms sogar zu einer Fazilitierung kommt (2. EPSP größer als das 1.).

Die Messung wurde mit Stimulus-Intervallen von 20 ms, 25 ms, 30 ms, 40 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 500 ms und 1000 ms durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter erhoben: Die Latenz (der Abstand vom Stimulus bis zum negativsten Punkt des Summenaktionspotentials) als Maß für die Exzitation und die Paired-Pulse-Ratio (PPR; Ratio der Amplitude des zweiten und ersten Summenaktionspotenzial) als Maß für die Inhibition im Gyrus dentatus (Abbildung 2.6).

Es ließ sich, je größer das IPI wurde, eine Abnahme der Inhibition bis zur Fazilitierung (die Amplitude des zweiten Summenaktionspotenzials ist größer als die des ersten) bei 100 ms beobachten und einer bei größeren IPIs wieder folgenden Zunahme der Inhibition (Abbildung 2.7). Dies lässt sich durch die inhibierenden Interneurone im Gyrus dentatus erklären (siehe Absatz 1.2).

Aus technischen Gründen konnten im Verlauf nicht bei allen Tieren Werte für jeden Messzeitpunkt erhoben werden.

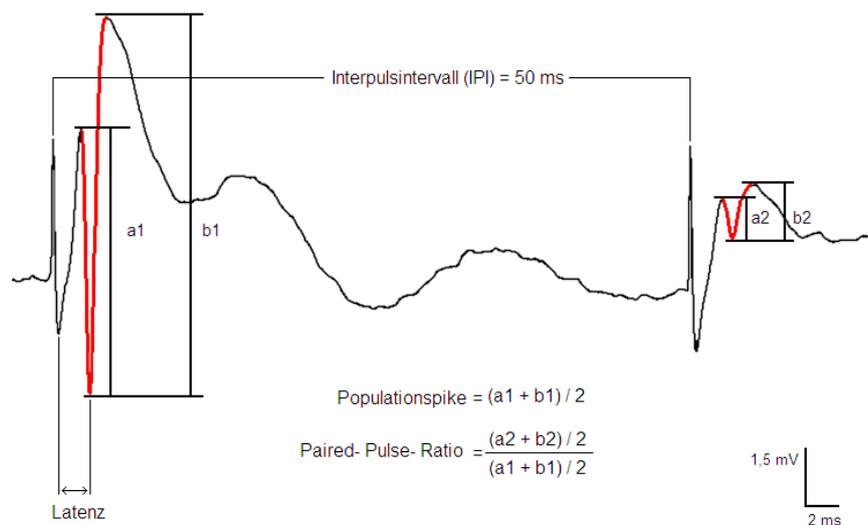


Abbildung 2.7: Darstellung einer Paired-Pulse-Messung bei einem IPI von 50ms. Rot ist der Populationsspike, das Summenaktionspotential. Unter der Graphik sind die Formel zur Berechnung der Größe des Populationspikes und der Paired-Pulse-Ratio aufgeführt.

2.9 Versuchsprotokoll

Allen Tieren wurde eine Stimulations-Elektrode in den Tractus perforans und eine Ableit-Elektrode in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus implantiert. Bei der 25°C- und 37°C-Gruppe erfolgte 8-11 Tage nach der Implantation die zweistündige Stimulation zur Induktion eines SSSE. Der SSSE wurde für 3 Stunden beibehalten. Anschließend erfolgte eine Durchbrechung des SSSE durch die intraperitoneale (i.p.)

Injektion mit 52 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital. Bei beiden Gruppen wurden dann für 3 Stunden die Zieltemperatur (25°C bzw. 37°C) konstant gehalten. Den Tieren der Elektrodenkontroll-Gruppe wurde lediglich 8-11 Tage nach der Operation 52 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital injiziert. In den folgenden Tagen und Wochen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten das Auftreten von spontanen Anfällen sowie elektrophysiologische Parameter im Gyrus dentatus untersucht (Abbildung 2.8a).

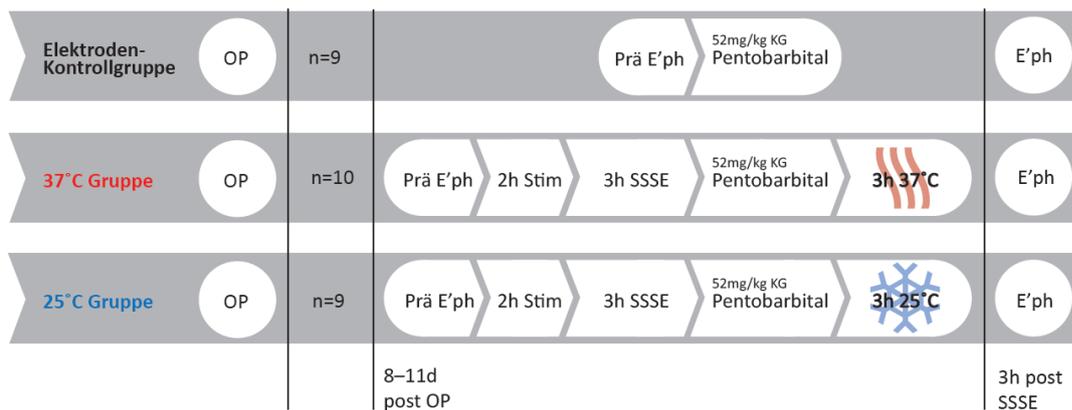


Abbildung 2.8 a: Darstellung der drei Gruppen mit Übersicht über die verschiedenen Messzeitpunkte von der OP bis zum Ende des ersten Versuchstages; OP, Operation (Elektroden-Implantation); E'ph, Elektrophysiologie; h, Stunden; d, Tage; Stim, Stimulation; SSSE, self-sustaining status epilepticus

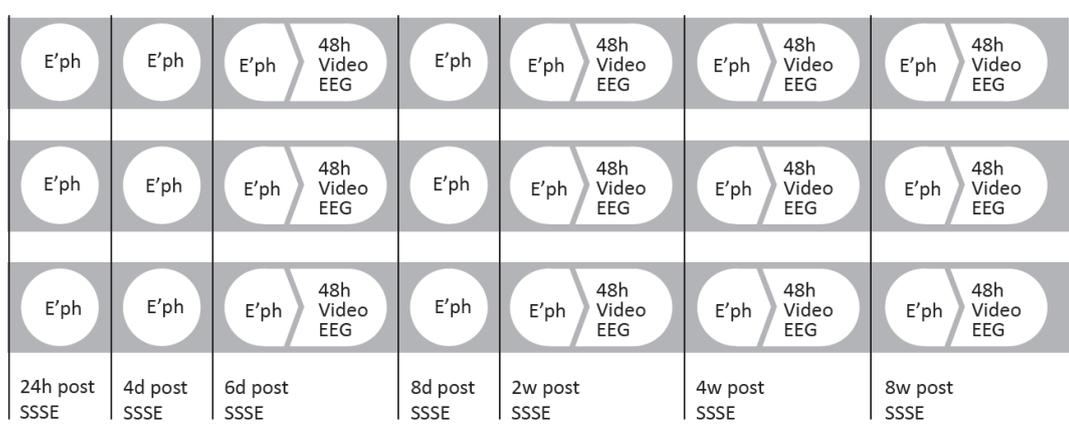


Abbildung 2.8 b: Darstellung der drei Gruppen mit Übersicht über die verschiedenen Messzeitpunkte 24 Stunden bis 8 Wochen nach SSSE. OP, Operation (Elektroden-Implantation); E'ph, Elektrophysiologie; h, Stunden; d, Tage; Stim, Stimulation; SSSE, self-sustaining status epilepticus

Zielparameter waren zum einen die Überwachung per Video-EEG zur Erfassung von Anfällen und zum anderen Paired-Pulse-Messungen zur Erfassung elektrophysiologischer Parameter, um Veränderungen der Inhibition und Exzitation im Gyrus dentatus untersuchen zu können. Die Untersuchungszeitpunkte für das Video-EEG waren: Tage 6-8, Tage 13-15, Tage 26-30 und Tage 54-58 nach Status epilepticus, im Folgenden als Messung nach Woche 1, 2, 4 und 8 bezeichnet. Die

elektrophysiologischen Messungen wurden direkt vor der Induktion des SE, 3 Stunden, 24 Stunden, 4 Tage und am sechsten und achten Tag nach SSSE durchgeführt. Es gab demnach zusätzlich eine prä- und vier postinterventionelle elektrophysiologische Messungen (Abbildung 2.8b).

Kontrolltiere wurden in gleicher Weise gemessen bzw. überwacht wie die Tiere aus der Versuchsgruppe.

2.10 Datenauswertung

Um Unterschiede in der Sensitivität bezüglich der Anfallsdetektion in Video- und EEG-Monitoring differenzieren zu können, wurden die Datensätze getrennt ausgewertet. Um einen systematischen Fehler durch die Subjektivität des Auswerters zu vermeiden, wurden erst die Videos und dann die EEGs ausgewertet.

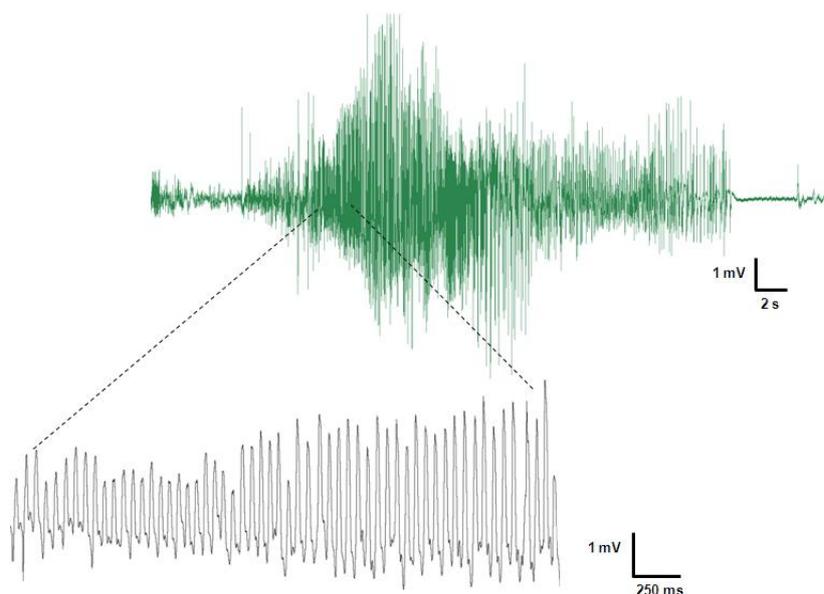


Abbildung 2.9: Typisches Beispiel eines epileptischen Anfalls aufgezeichnet mit dem Programm Spike2. Zu Beginn langsame Rhythmisierung mit dann zunehmender Frequenz und Amplitude und nach der am Ende folgenden klonischen Phase die Depression des Potenzials. In dem vergrößerten Ausschnitt kann man gut die rhythmische elektrische Aktivität während des Anfalls sehen.

Die Videos wurden auf dem Computer in einem speziellen Komprimierungsformat der Firma Lupus abgespeichert und konnten mit der dazugehörigen Software der Video-Capture-Card der Firma Lupus angeschaut und ausgewertet werden. Anfälle wurden nach der Klassifikation nach Racine eingeteilt (Tabelle 2.1). Die EEGs wurden mit Hilfe von Spike2 (Version 7, Cambridge Electronic Design) ausgewertet. Dabei wurde ein Anfall definiert als ein Ereignis von mindestens 10 s Dauer, mindestens einer

Verdoppelung der Baseline-Amplitude und einer Frequenz der Entladungen > 5 Hz (modifiziert nach (Pitkänen et al, 2005)) (Abbildung 2.9).

Die elektrophysiologischen Parameter wurden – bezüglich der Fragestellung der Zu- und Abnahme der Inhibition sowie der Exzitationsparameter im Verlauf – mit dem Programm Signal (Version 3.07, Cambridge Electronic Design) ausgewertet.

2.11 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Da das Ergebnis signifikant war und der Datensatz damit als nicht normalverteilt zu betrachten war, wurden nonparametrische Tests angewandt. Im Weiteren wurden bei Parametern (Inhibition, Latenz, Anfallsstärke, Anfallsdauer, Vergleich Video-EEG), die über alle drei Gruppen verglichen werden sollten, der nonparametrische Kruskal-Wallis-Test mit Posthoc-Test Mann-Whitney sowie die Bonferroni-Holms-Korrektur für Mehrfach-Vergleiche eingesetzt.

Das Signifikanzniveau war definiert bei $p < 0,05$. Bei den elektrophysiologischen Messungen bestand nach Bonferroni-Holms-Korrektur bei Messungen zu acht Zeitpunkten eine Signifikanz bei $p < 0,006$ ($p=0,05/8$). Für die spezifischen Anfallscharakteristika bei Messungen zu vier Zeitpunkten war ein Ergebnis signifikant bei $p < 0,012$ ($p=0,05/4$). Die Daten werden mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

Bei 48 Tieren wurden erfolgreich Elektroden implantiert. Elf Tiere wurden nicht stimuliert und erhielten 8-11 Tage nach der Operation eine Injektion mit Pentobarbital. Von 37 im wachen Zustand elektrisch stimulierten Tieren, entwickelten 29 Tieren einen SSSE. Demnach konnte bei 81 Prozent der Tiere, die stimuliert wurden, ein SSSE induziert werden. Von den 29 Tieren, die erfolgreich in einen SSSE stimuliert wurden, wurden 15 Tiere anschließend auf 25°C Körpertemperatur abgekühlt, die 14 anderen Tiere wurden mit Hilfe einer Wärmelampe auf 37°C gehalten. Acht von den 37 stimulierten Tieren konnten nicht eingeschlossen werden. Von diesen acht verstarben zwei Tiere während der Stimulation. Die Letalität unter Stimulation betrug demnach 6,4 Prozent. Bei den anderen sechs Tieren zeigte sich zu Beginn der zweistündigen elektrischen Stimulation zunächst ein stimulationstypisches Verhalten (siehe Absatz 3.1), d.h. stereotype Verhaltensweisen und wiederkehrende generalisierte Anfälle. Im weiteren Verlauf sistierten jedoch die Anfälle, die Tiere nahmen wieder normale Verhaltensweisen, wie Fressen und Putzen auf. Stellte man den Strom zur Kontrolle des EEGs aus, so sah man entweder keine oder nur niederfrequente Spikes (<1Hz), d.h. dass die elektrophysiologischen Bedingungen für einen SSSE nicht erfüllt waren (siehe Absatz 2.4).

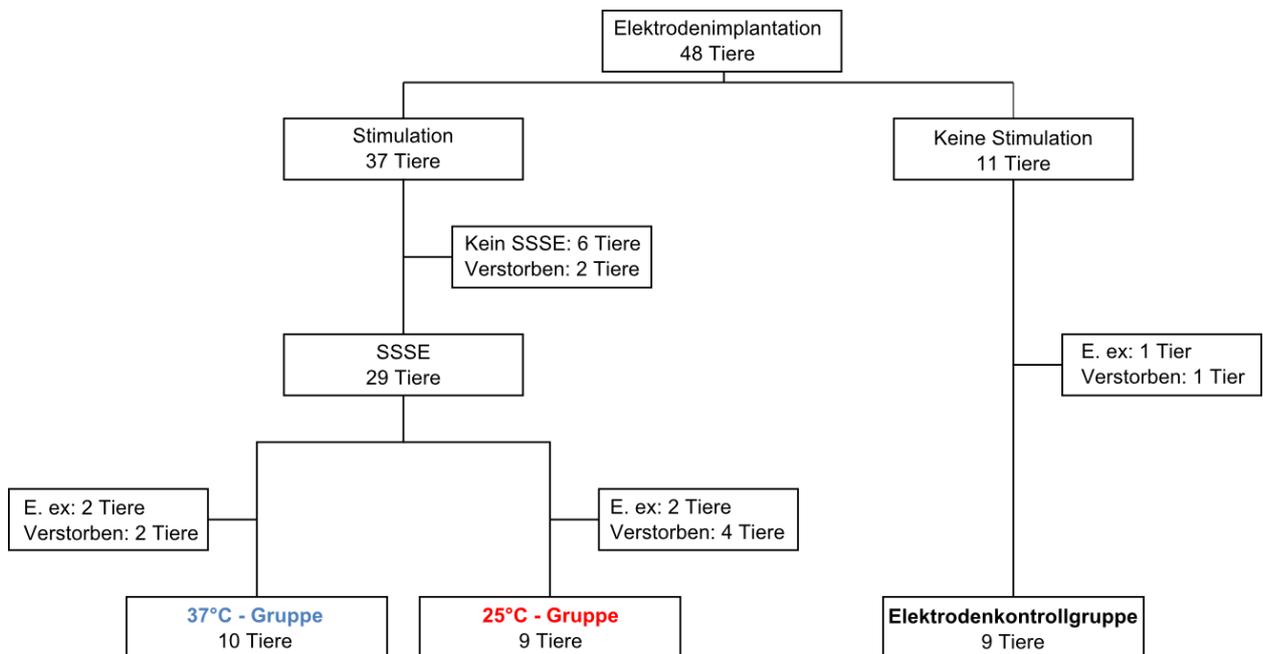


Abbildung 3.1: Übersicht über Verteilung der Tiere in die Versuchsgruppen und Letalität während und nach den einzelnen Messschritten. SSSE: selbst-erhaltender Status epilepticus; E. ex: Verlust des Elektrodensockels.

Eine Veränderung der Stimulationsparameter wie die Erhöhung der Stromstärke führte weder zum Wiederauftreten eines stimulationstypischen Verhaltensmusters der Tiere noch zu einem Anstieg der Spike-Frequenz. Es war nicht möglich, diese Tiere in einen SSSE zu stimulieren.

Von den 15 gekühlten Tieren starben im Verlauf innerhalb der ersten 24 Stunden drei Tiere, ein weiteres innerhalb der ersten 6 Tage, zwei weitere verloren ihren Elektrodensockel (1 Woche bzw. 2 Wochen nach SSSE). Insgesamt standen neun Tiere nach Kühlung für die Langzeituntersuchung zur Verfügung. Die Letalität nach SSSE und Hypothermie betrug 26,7%. In der 37°C-Gruppe starb ein Tier 3 Stunden nach SSSE, ein weiteres nach vier Tagen, zwei Tiere verloren nach vier Tagen ihren Elektrodensockel. Somit standen in der ungekühlten Gruppe 10 Tiere zur Verfügung. Die Letalität nach SSSE und 37°C betrug 14,3%. In der Elektrodengruppe starb ein Tier zwei Wochen nach Messbeginn, ein Tier verlor nach sechs Tagen seinen Elektrodensockel (Abbildung 3.1). Somit standen in dieser Gruppe 9 Tiere zur Verfügung.

3.1 Klinische und elektrophysiologische Charakteristika des SSSE

Neunzehn Tiere befanden sich nach Ende der zweistündigen elektrischen Stimulation im SSSE und konnten in der Folge auch die weiteren geplanten Messungen durchlaufen. Elektrophysiologisch konnten, nachdem die Stimulation beendet war, Spikes hoher Amplitude mit einer Frequenz von > 1 Hz abgeleitet werden (siehe Absatz 2.4). Der Mittelwert der Frequenz, die direkt nach dem Ende der Stimulation ermittelt wurde, betrug in der 37°C-Gruppe $1,5 \pm 0,2$ Hz und in der 25°C-Gruppe $1,4 \pm 0,1$ Hz. Es lag kein signifikanter Unterschied bezüglich der Spike-Frequenz vor. Drei Stunden nach Ende der Stimulation, kurz vor der Durchbrechung des SSSE mit Pentobarbital, betrug der Mittelwert der Spike-Frequenz bei den normothermen Tieren $1,2 \pm 0,3$ Hz und bei den hypothermen Tieren $1,3 \pm 0,2$ Hz. Auch hier lag kein signifikanter Unterschied vor.

Klinisch unterschied sich der SSSE nicht von dem Bild, welches sich auch während der elektrischen Stimulation zeigte. Zum einen konnte man stereotype Verhaltensmuster beobachten wie andauerndes Laufen im Kreis, ein Verharren über mehrere Minuten auf einer Stelle, das zum Teil mit einem leichten Hin- und Herschwanken verbunden war,

sowie exploratives Schnuppern. Äußere Stimuli, wie das Produzieren lauter Geräusche, zum Beispiel durch Klatschen in die Hände, oder das Angebot von Flüssigkeit oder Nahrung wurden nicht wahrgenommen bzw. es wurde nicht darauf reagiert. Auch sonstige für das naive Tier typische Verhaltensweisen wie das Putzen wurden während Stimulation und SSSE nicht beobachtet. Zusammenfassend traten diese stereotypen Verhaltensmuster bei erhaltenem, aber gestörtem Bewusstsein auf. Dieser Zustand wurde als limbischer SSSE bezeichnet.

Die Tiere hatten im Durchschnitt während der Stimulation $6,7 \pm 2,6$ Anfälle der Racine-Klasse, $6,4 \pm 2,2$ Anfälle der Racine-Klasse 4 und $0,7 \pm 0,8$ Anfälle der Racine-Klasse 5 (Tabelle 2.1). Der sich anschließende SSSE stellte sich bei 15 von 19 Tieren als limbisch dar, d.h. diese Tiere hatten während des gesamten Zeitraums keine motorischen Anfälle, aber diskrete Verhaltensauffälligkeiten. Bei vier Tieren traten während des SSSE auch motorische Anfälle auf, der Status wurde in diesen Fällen als konvulsiv bezeichnet. Drei von vier Tieren hatten im Mittel $1,3 \pm 0,6$ Anfälle während des SSSE, bei einem Tier traten über die gesamten 3 Stunden des SSSE mit nur kurzen Unterbrechungen Anfälle der Racine-Klasse 2 und 3 auf. Drei von diesen vier Tieren waren in der 37°C-Gruppe eingeschlossen, davon auch das Tier mit den anhaltenden Anfällen der Racine-Klasse 2 und 3 während des SSSE, sowie eines in der 25°C-Gruppe. Es lag kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens eines limbischen und konvulsiven SSSE zwischen den Gruppen vor. Die vier Tiere mit konvulsivem SSSE hatten mit $37,0 \pm 9,4$ Anfällen während der Stimulation mehr Anfälle als der Durchschnitt ($24,12 \pm 3,59$). Es lag jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Anzahl der Anfälle während der Stimulation und dem Auftreten eines konvulsiven SSSE vor.

3.2 Temperaturverlauf [25°C- und 37°C-Gruppe]

Zu Beginn der Messung lag die Temperatur im Mittel in der 25°C-Gruppe bei 37,66°C und in der 37°C-Gruppe bei 37,61°C.

3.2.1 37°C

Die normothermen Tiere wurden nach dem SSSE nicht gekühlt, sondern mit Hilfe einer Wärmelampe bei 37°C gehalten. Dies war nötig, da die Tiere nach Durchbrechung des

SSSE mit Pentobarbital sediert waren und, wenn sie nicht durch die Lampe erwärmt worden wären, auf niedrigere Temperaturen abgekühlt wären.

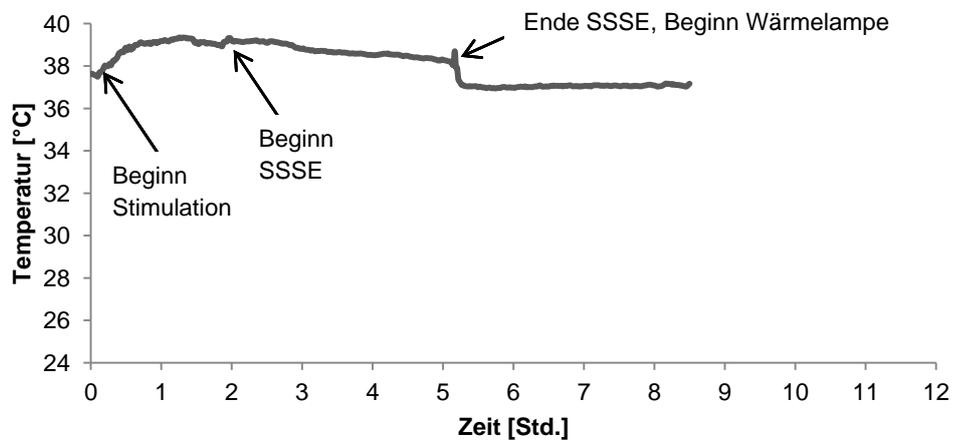


Abbildung 3.2 a: Temperaturverlauf in der 37°C-Gruppe. Messdaten während Stimulation, SSSE und anschließend warm halten bei 37°C

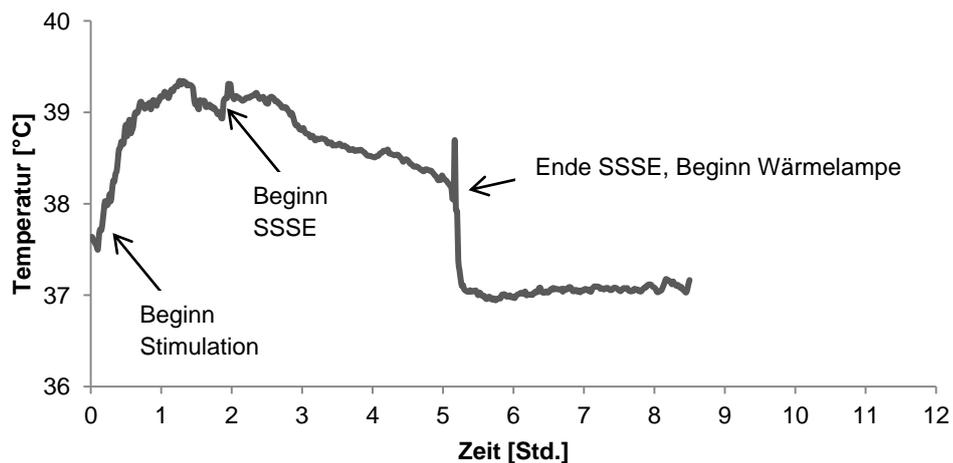


Abbildung 3.2 b: Temperaturverlauf in der 37°C-Gruppe mit Dehnung der y-Achse zur besseren Darstellung. Messdaten während Stimulation, SSSE und anschließend warm halten bei 37°C-Körpertemperatur.

In Abbildung 3.2 a und b sind die Mittelwerte der Temperaturen aller Tiere, die in die 37°C-Gruppe eingeschlossen wurden, über die Zeit dargestellt. Zehn Minuten nach Beginn der Aufzeichnung der Temperaturdaten wurde mit der Stimulation begonnen. Es ist zu diesem Zeitpunkt innerhalb weniger Minuten ein Temperaturanstieg von 37,6°C auf 38°C zu sehen, der innerhalb einer Stunde bis auf maximal 39,3°C weiter ansteigt. Über die nächsten 2 Stunden bleiben die Werte der Temperatur, mit einigen leichten Schwankungen (max. $\pm 0,3^\circ\text{C}$), bei 39°C.

Im Verlauf des sich an die Stimulation anschließenden dreistündiger SSSE sinkt die Temperatur langsam bis auf 38°C ab. Kurz vor der Injektion von Pentobarbital, 5 Stunden nach Beginn der Stimulation, steigen die Werte wieder bis auf 38,7°C an, fallen dann aber nach der Injektion schnell bis auf 37°C ab. Während der folgenden 3 Stunden, in denen die Tiere sediert waren, blieb die Temperatur bis zum Ende der Messung mit einigen Schwankungen bei 37°C.

3.2.2 25°C

Die hypothermen Tiere wurden nach Durchbrechung des SSSE mit Pentobarbital für 3 Stunden auf 25°C gekühlt. Dabei dauerte es im Mittel 40 ± 13 Minuten, bis die Tiere von 37°C auf 25°C gekühlt waren. Die Tiere waren 138 ± 11 Minuten bei 25°C Körpertemperatur gehalten.

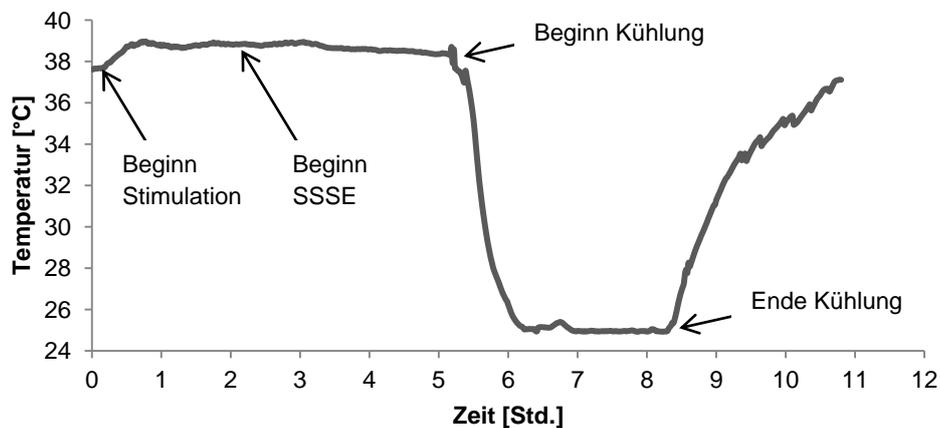


Abbildung 3.3: Der gemittelte Temperaturverlauf in der 25°C-Gruppe ($n=9$). Messdaten während Stimulation, SSSE, Kühlung und anschließend wieder erwärmen erhoben.

Die Tiere befanden sich 24 ± 6 Minuten im Stadium einer milden Hypothermie von 32°C -34°C und 211 ± 22 Minuten einer starken Hypothermie von $< 32^\circ\text{C}$. Drei Stunden nach Beginn der Kühlung wurden die Tiere mit Hilfe einer Wärmelampe wieder aufgewärmt. Bis die Tiere von 25°C ausgehend wieder 37°C erlangten, dauerte es 158 ± 33 Minuten (Abbildung 3.3).

3.3 Spontane Anfälle im Verlauf nach SSSE

Bei allen in der Studie eingeschlossenen Tieren konnte zu vier Zeitpunkten (Woche 1, 2, 4, 8) nach SSSE ein 48-Std.-Video-Monitoring durchgeführt werden. Zusätzlich war es möglich, bei etwa der Hälfte der Tiere parallel zum Video ein intrakranielles EEG aus

dem Gyrus dentatus abzuleiten (Abbildung 3.4). Im Verlauf nach der Durchbrechung des SSSE mit Pentobarbital entwickelten 18 von 19 Tieren (94,7%), die stimuliert wurden und einen SSSE hatten, spontane Anfälle. Das prinzipielle Auftreten von Anfällen konnte demnach nicht durch die Hypothermie verhindert werden.

Tiere mit spontanen Anfällen werden im Weiteren als epileptisch bezeichnet. Dabei wurde prinzipiell von der Grundannahme ausgegangen, dass Tiere ab dem erstmaligen Auftreten eines epileptischen Anfalls eine chronische Epilepsie entwickelt hatten. Tiere, die zum entsprechenden Beobachtungszeitpunkt noch keine Anfälle hatten, werden als nicht-epileptisch bezeichnet. Die Tiere der Elektrodenkontroll-Gruppe entwickelten zu keinem Zeitpunkt Anfälle.

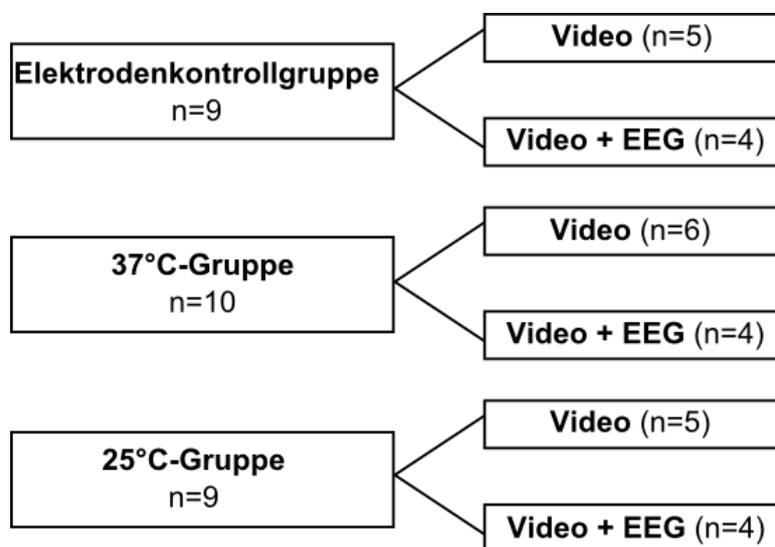


Abbildung 3.4: Übersicht darüber wie viele Tiere in den jeweiligen Versuchsgruppen während der 48-Std-Monitoring-Epochen nur Video- oder Video- und EEG-Monitoring erhalten haben.

Geht man nun auf den prozentualen Anteil epileptischer Tiere und nicht epileptischer Tiere zu den einzelnen Zeitpunkten ein, so zeigte sich bei den Tieren in der reinen Videoüberwachung (Abb. 3.5 a und b) eine leichte Rechtsverschiebung bei dem Auftreten der Anfälle bei den hypothermen gegenüber den normothermen Tieren - allerdings ohne signifikanten Unterschied. Ein Tier aus der 37°C-Gruppe hatte in der Videoüberwachung zum Zeitpunkt Woche 8 keine Anfälle und war damit nicht-epileptisch.

Bei den Tieren mit Video- und EEG-Überwachung war diese Rechtsverschiebung sogar noch deutlicher zu beobachten. In der 25°C-Gruppe war in Woche 1 und 2 kein Tier epileptisch (Abbildung 3.6 b). In der 37°C-Gruppe hatten in Woche 1 und 2 ein Viertel

bzw. die Hälfte der Tiere bereits Anfälle, auch hier war dies für keinen der Zeitpunkte statistisch signifikant. Zusammenfassend konnten in der 37°C-Gruppe zwei Tiere, die im Video noch nicht epileptisch waren, zu einem früheren Zeitpunkt schon als epileptisch identifiziert werden. Ein weiteres Tier aus der 37°C-Gruppe zeigte in der Video-Aufzeichnung keine Anfälle, wohl aber im EEG. Demnach hatten also auch in der 37°C-Gruppe 100% der Tiere in Woche 8 epileptische Anfälle.

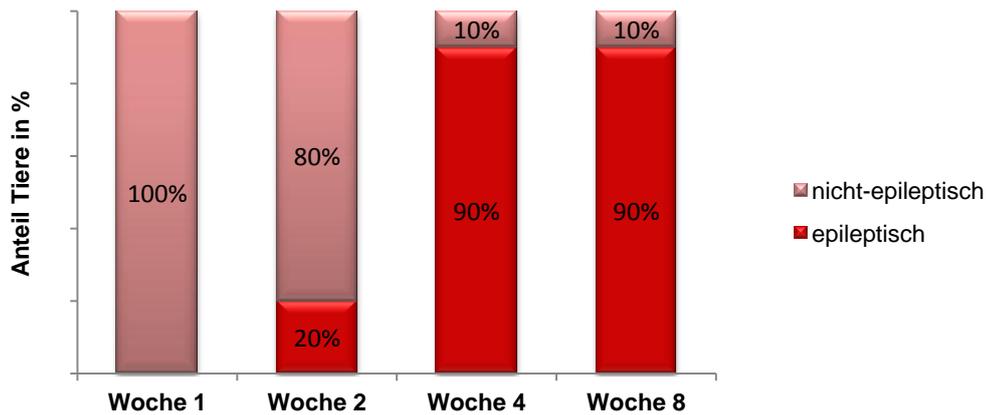


Abbildung 3.5 a: Anteil epileptischer Tiere in Prozent in der Videoüberwachung der 37°C-Gruppe zu den Zeitpunkten Woche 1 – 8.

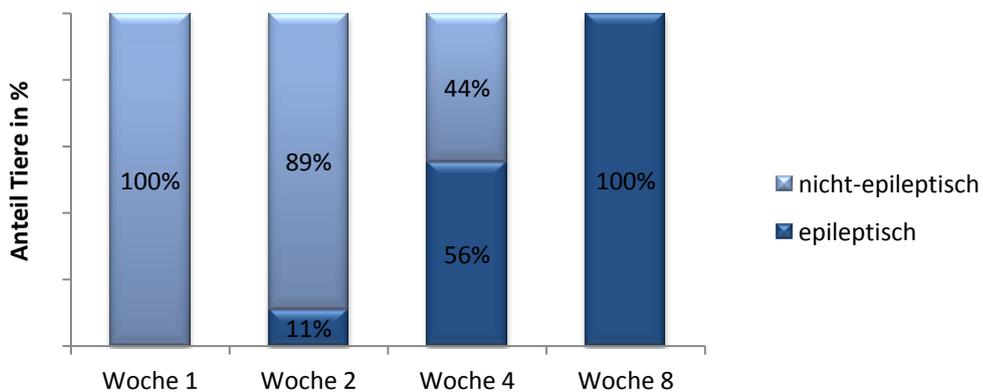


Abbildung 3.5 b: Anteil epileptischer Tiere in Prozent in der Videoüberwachung der 25°C-Gruppe zu den Zeitpunkten Woche 1 – 8

Bezogen auf die detektierten Anfälle wurden in der 37°C- und 25°C-Gruppe 70 Epochen von 48-Stunden aufgezeichnet. Dabei konnte in 32 Epochen die Video-Überwachung mit EEG ergänzt werden. In 15 der 32 Epochen mit Video und EEG trat mindestens ein Anfall pro Epoche auf. Wiederum in 11 dieser 15 Epochen konnte im Video vor der EEG-Analyse ein klinisches Korrelat (Anfälle der Racine-Klasse 3-5) zu dem dann im EEG detektierten Anfall gesehen werden. Insgesamt waren in den 15

Epochen 49 Anfälle detektiert worden, 35 davon mit einem klinischen Korrelat im Video. Bei den restlichen im EEG detektierten 14 Anfällen waren in der post-hoc Video-Analyse keine oder - wenn überhaupt - ausgesprochen diskrete Verhaltensänderungen zu sehen.

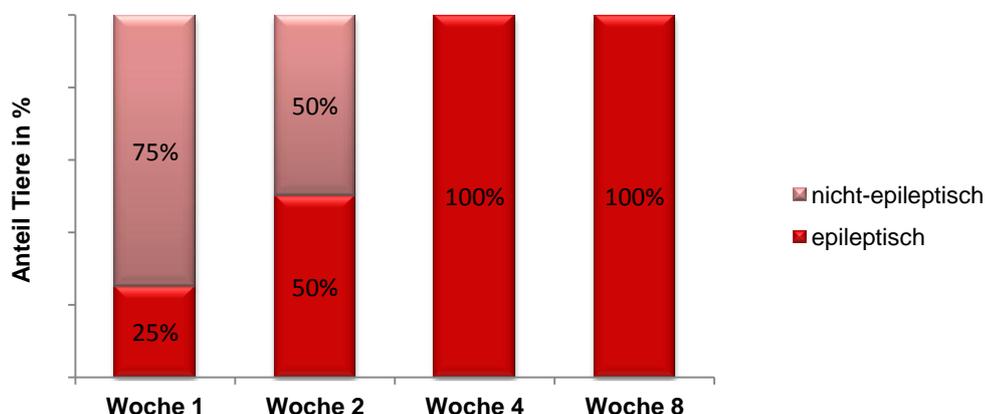


Abbildung 3.6 a: Anteil epileptischer Tiere in Prozent in der Video-EEG-Überwachung der 37°C-Gruppe zu den Zeitpunkten Woche 1 – 8.

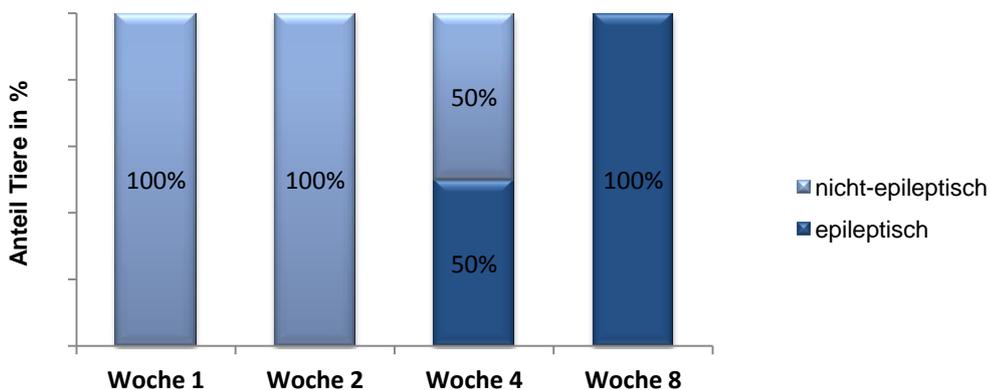


Abbildung 3.6 b: Anteil epileptischer Tiere in Prozent in der Video-EEG-Überwachung der 25°C-Gruppe zu den Zeitpunkten Woche 1 – 8.

Für die Detektion motorischer Anfälle der Racine-Klasse 3-5 lag die Sensitivität im Video bei 100%. Von allen im EEG aufgezeichneten Anfällen konnten im Video 69,4% der Anfälle detektiert werden. Somit ist also davon auszugehen, dass auch bei den 54,3% der Epochen in denen nur Video und kein EEG zur Verfügung standen, mindestens 70% der Anfälle erkannt wurden.

3.4 Anfallscharakteristika (Subanalysen der epileptischen Tiere)

Bei der Auswertung der Video-EEG-Daten konnte nicht nur eine Aussage über das generelle Auftreten und die Häufigkeit von Anfällen getroffen werden, sondern auch die Anfallsstärke und Anfallsdauer beurteilt werden.

Aufgrund unseres Versuchsaufbaus konnten die Tiere nur von oben gefilmt werden. Aus dieser Perspektive war es nicht möglich, leichte Anfälle (Anfälle der Racine-Klasse 1-2), die mit orofazialen Myoklonien, Augenschließen und Kopfnicken einhergingen, von normalem Verhalten abzugrenzen. Es ließen sich nur Anfälle der Stärke 3 bis 5 auf der Racine-Skala reproduzierbar erkennen.

3.4.1 Anfallsdauer

Die Anfallsdauer konnte sowohl im Video als auch im EEG erfasst werden. Der Unterschied lag darin, dass im Video die Dauer des Anfalls nach Ende und Beginn der klinischen Symptome beurteilt wurde, demnach der subjektiven Bewertung der Auswerterin unterlag. Im EEG wurde die Dauer bestimmt, Beginn und Ende des Anfalls waren durch elektrophysiologische Parameter definiert (Abbildung 2.9; siehe Absatz 2.8).

Die im Video ermittelte klinische Anfallsdauer war in beiden Gruppen kürzer als die im EEG (Abbildung 3.7 a und b). Zum Zeitpunkt Woche 2 betrug sie 32 ± 3 Sekunden in der 37°C -Gruppe und 24 ± 3 Sekunden in der 25°C -Gruppe. Zum Zeitpunkt Woche 4 betrug sie 28 ± 9 Sekunden in der 37°C -Gruppe und 27 ± 4 Sekunden in der 25°C -Gruppe.

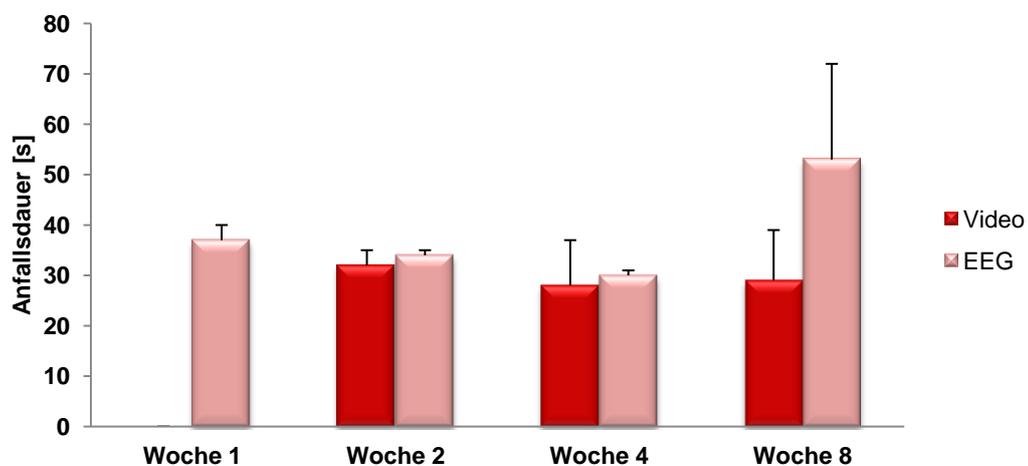


Abbildung 3.7 a: Mittelwerte der Anfallsdauer ermittelt im Video und EEG in der 37°C -Gruppe

Zum Zeitpunkt Woche 8 lag die klinische Anfallsdauer bei 29 ± 10 Sekunden in der 37°C -Gruppe und bei 35 ± 7 in der 25°C -Gruppe.

Im EEG betrug die Anfallsdauer 37 ± 3 Sekunden in Woche 1 und 34 ± 1 Sekunden in Woche 2 in der 37°C -Gruppe. Es gab keine Tiere aus der 25°C -Gruppe, die in Woche 1 und 2 Anfälle im EEG hatten. Zum Zeitpunkt Woche 4 lag die mittlere Anfallsdauer 30 ± 1 Sekunden in der 37°C -Gruppe und 33 ± 4 Sekunden in der 25°C -Gruppe.

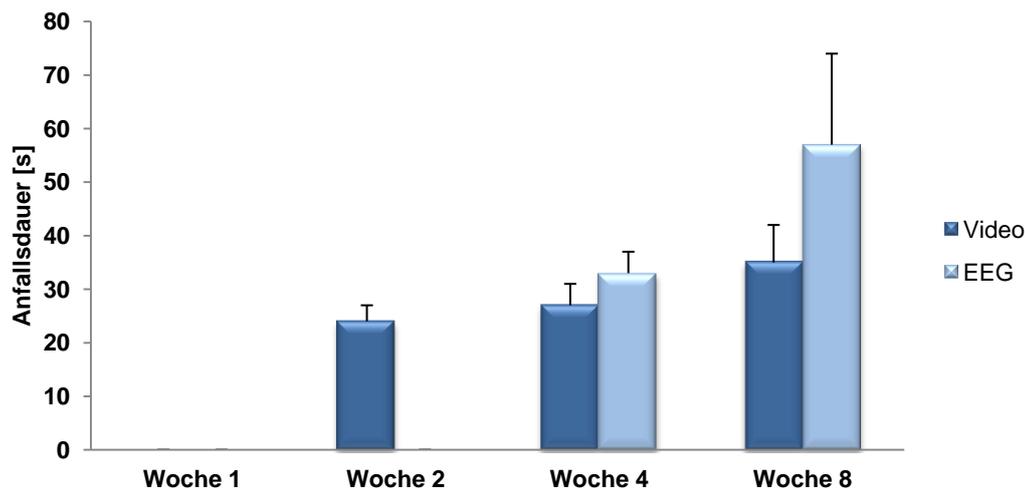


Abbildung 3.7 b: Mittelwerte der Anfallsdauer ermittelt im Video und EEG in der 25°C -Gruppe

In Woche 8 betrug die Anfallsdauer 53 ± 19 Sekunden in der 37°C -Gruppe und 57 ± 17 in der 25°C -Gruppe.

Insgesamt lassen sich für die Anfallsdauer weder im Video noch im EEG statistisch signifikante Unterschiede zwischen der 37°C - und 25°C -Gruppe feststellen.

3.4.2 Anzahl Anfälle/ 48-Stunden-Epoche

Zusammengefasst konnten über die Tiere der 37°C - und 25°C -Gruppe 70 48-Stunden-Epochen aufgezeichnet werden. Davon waren 38 Epochen nur mit Video und 32 Epochen mit Video und EEG aufgezeichnet worden. In 14 Epochen, die nur mit Video aufgezeichnet wurden, traten Anfälle auf. Hierbei konnten 22 Anfälle aufgezeichnet werden, mit $6 \pm 4,6$ Anfällen im Mittel und einem Median von 5 Anfällen pro Epoche. In 15 der 32 Epochen, die mit Video und EEG aufgezeichnet wurden, konnten Anfälle aufgezeichnet werden. Hierbei traten 49 Anfälle über alle 15 Epochen auf, mit $12 \pm 11,7$ Anfällen und einem Median von 3 Anfällen pro Epoche. Die deutlich höhere Anzahl an

Anfällen in den Epochen mit Video und EEG erklärt sich durch einen Ausreißer, der zum Zeitpunkt Woche 4 und 8 jeweils >12 Anfälle hatte. In 11 von 15 Epochen zeigte sich ein klinisches Korrelat im Video, damit konnten 35 von 49 Anfällen, die im EEG detektiert wurden auch im Video gesehen werden.

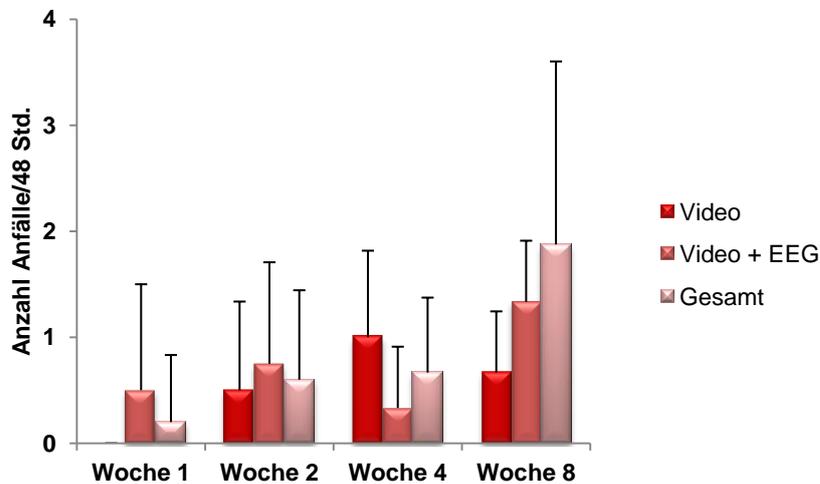


Abbildung 3.8 a: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von Anfällen pro 48Std. Monitoring in der 37°C- Gruppe, aufgeteilt nach Tieren, die nur mit Video oder mit Video und EEG überwacht wurden, sowie die beobachteten Anfälle aller Tiere zusammengefasst.

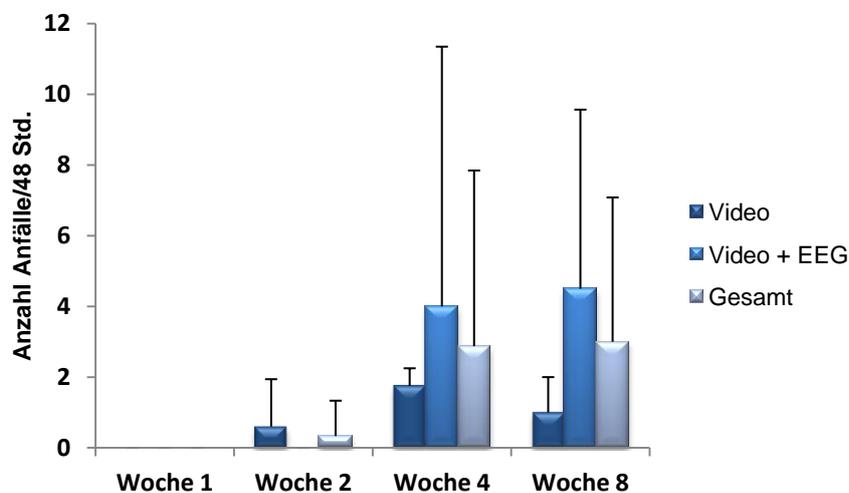


Abbildung 3.8 b: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von Anfällen pro 48 Std. Monitoring in der 25°C- Gruppe, aufgeteilt nach Tieren, die nur mit Video oder mit Video und EEG überwacht wurden, sowie die beobachteten Anfälle aller Tiere zusammengefasst.

Weiterhin kann man die Mittelwerte der aufgetretenen Anfälle unterteilt nach der Gruppe als auch der Art des Monitoring betrachten (siehe Abbildung 3.8 a und b). In Woche 1 war in der 37°C-Gruppe ein Tier epileptisch und hatte zwei Anfälle, die jedoch nur im EEG detektiert wurden. In Woche 2 waren vier Tiere aus der 37°C-Gruppe

epileptisch. Je zwei befanden sich im Video bzw. im Video- und EEG-Monitoring und hatten im Mittel bei den Tieren, die nur im Video aufgezeichnet wurden, $0,5 \pm 0,84$ Anfälle sowie im Video und EEG $0,75 \pm 0,96$ Anfälle (Abbildung 3.8 a). Zum Zeitpunkt Woche 4 waren in der 37°C-Gruppe sieben Tiere epileptisch; unter diesen wurden bei fünf Tieren zu diesem Zeitpunkt erstmalig Anfälle beobachtet, davon bei drei Tieren in der reinen Videoüberwachung und bei zweien in Video und EEG. Im Mittel hatten die drei Tiere im Video $1,0 \pm 0,8$ Anfälle, die zwei im Video und EEG $0,3 \pm 0,6$ Anfälle und insgesamt $0,7 \pm 0,7$ Anfälle. In Woche 8 waren alle Tiere epileptisch. Zu diesem Zeitpunkt hatten sechs der Tiere Anfälle, davon drei in der reinen Videoüberwachung und drei in der Video und EEG-Überwachung. Im Mittel hatten die Tiere im Video $0,7 \pm 0,6$ und im Video und EEG $1,3 \pm 0,6$ Anfälle und insgesamt $1,9 \pm 1,7$ Anfälle.

In der 25°C-Gruppe hatte in Woche 1 kein Tier Anfälle. Zum Zeitpunkt Woche 2 hatte ein epileptisches Tier, welches nur mit Video überwacht wurde, drei Anfälle, das entspricht über alle Tiere im Mittel $0,33 \pm 1$ Anfällen (Abbildung 3.8 b). In Woche 4 waren sechs Tiere epileptisch, alle hatten zu diesem Zeitpunkt Anfälle, vier in der reinen Video-Überwachung, zwei in Video und EEG. Im Mittel hatten die Tiere im Video $1,8 \pm 0,5$ Anfälle, während in Video und EEG die Tiere $4,0 \pm 7,4$ Anfälle hatten. Eines der Tiere im Video und EEG hatte zu diesem Zeitpunkt 15 Anfälle. Insgesamt lag der Mittelwert bei $2,9 \pm 5,0$ Anfällen. In der 25°-Gruppe zum Zeitpunkt Woche 8 hatten sechs Tiere epileptische Anfälle, davon zwei in der reinen Videoüberwachung und vier in Video und EEG. Im Mittel hatten die Tiere im Video $1,0 \pm 1,0$ Anfälle, im Video und EEG $4,5 \pm 5,0$ Anfälle und insgesamt $3,0 \pm 4,0$ Anfälle.

Es gab keinen signifikanten Unterschied unter den gekühlten und nicht gekühlten Tieren bezüglich der Manifestation der Anfälle zu den einzelnen Zeitpunkten (Abbildung 3.8 a und b).

3.4.3 Anfallsstärke

In Woche 1 hatte in beiden Gruppen kein Tier einen klinisch erkennbaren Anfall der Anfallsstärke Racine 3 oder größer. In Woche 2 hatten die normothermen Tiere im Durchschnitt Anfälle der Stärke $4,3 \pm 0,6$ und die hypothermen Tiere 4 ± 0 . In Woche 4 betrug die Anfallsstärke in der 37°C-Gruppe $4,3 \pm 0,5$ und $4,3 \pm 0,8$ in der 25°C-Gruppe.

In Woche 8 waren es $4,7 \pm 0,5$ in der 37°C-Gruppe und $3,9 \pm 0,6$ in der 25°C-Gruppe. Bezogen auf die einzelnen Zeitpunkte zeigte sich für den Zeitpunkt Woche 8 ein Trend bezüglich stärkerer Anfälle in der 37°C- gegenüber der 25°C-Gruppe ($p=0,026$). Dieser Wert war jedoch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni-Holms-Korrektur ($p<0,0125$) nicht mehr signifikant (Abbildung 3.9).

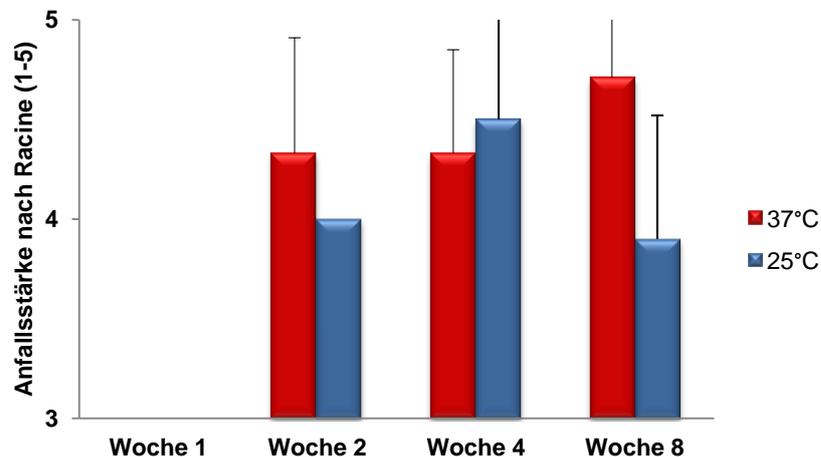


Abbildung 3.9: Anfallsstärke nach Racine in der 37°C- und 25°C-Gruppe zu den Zeitpunkten Woche 1 bis 8.

Subjektiv machten wir die Beobachtung, dass die gekühlten Tiere in den Wochen nach dem Status epilepticus weniger aggressiv im Handling waren, als die Tiere der 37°C-Gruppe. Hierzu wurde jedoch keine systematische Analyse durchgeführt.

3.5 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologische Messung zur Erhebung des exzitatorischen Parameters Latenz und des inhibitorischen Parameters Paired-Pulse-Ratio (PPR) wurde vor Induktion des SSSE bzw. Injektion von Pentobarbital durchgeführt. Im folgenden sind nur die Tiere in die Auswertung einbezogen worden, die in der normothermen und hypothermen Gruppe erfolgreich in den SSSE stimuliert worden waren und nicht aus anderen diversen Gründen ausgeschlossen werden mussten (siehe Abbildung 3.1). Somit verblieben 28 Tiere, 9 in der Elektrodenkontroll-Gruppe, 10 in der normothermen Gruppe und 9 in der hypothermen Gruppe.

Im Laufe der 8 Wochen Beobachtungszeitraum verloren insgesamt sechs Tiere ihren Elektroden-Sockel. Es konnten in der Folge keine weiteren elektrophysiologischen Messungen an diesen Tieren durchgeführt werden. So waren in der Elektroden-

Kontroll-Gruppe von anfänglich neun in Woche 1 zum Zeitpunkt Woche 8 noch sieben Tiere, in der 37°C-Gruppe von 10 Tieren noch acht und in der 25°C-Gruppe von neun noch sieben Tiere übrig.

3.5.1 Exzitatorischer Parameter: Latenz vor Induktion des SSSE

Die Latenz vor Induktion des SSSE bzw. der Injektion von Pentobarbital betrug $3,80 \pm 0,57$ ms in der Elektrodenkontroll-Gruppe, $3,53 \pm 0,42$ ms in der 37°C-Gruppe, $3,45 \pm 0,38$ ms in der 25°C-Gruppe und $3,60 \pm 0,47$ für alle Tiere insgesamt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3.1).

3.5.2 Exzitatorischer Parameter: Verlauf der Latenz nach SSSE

3.5.2.1 Intragruppenvergleich

Im Verlauf nach SSSE zeigten sich in der Elektrodenkontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Prä- und Folgemessungen. In der 37°C-Gruppe war die Latenz zu dem Zeitpunkt 24 Stunden auch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mittels der Bonferroni-Holms-Korrektur ($p < 0,006$) signifikant länger als in der Prä-Messung ($p = 0,003$) (Tabelle 3.1). Zu den Zeitpunkten 3 Stunden und 4 Tage post SSSE zeigte sich ein Trend ($p = 0,011$, $p = 0,009$). Auch in der 25°C-Gruppe war die Latenz zum Zeitpunkt 24 Stunden post SSSE signifikant verlängert ($p = 0,005$). Zum Zeitpunkt 3 Stunden post SSSE zeigte sich ebenso wie in der 37°C-Gruppe nur ein leichter Trend ($p = 0,012$). Zusammengefasst bestand somit zum Zeitpunkt 24 Stunden post bei den hypothermen Tieren eine geringere Exzitabilität des Gehirns als bei den normothermen Tieren. Dieser Effekt persistierte jedoch nicht. Vier Tage post SSSE war nur noch ein Trend erkennbar, selbst dieser war im Verlauf nicht mehr erkennbar.

3.5.2.2 Intergruppenvergleich

Im Vergleich der 37°-Gruppe mit der Elektrodenkontroll-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Latenz. Im Vergleich der 25°C-Gruppe mit der Elektrodenkontrollgruppe zeigte sich für den Zeitpunkt 3 Stunden post Intervention ($p = 0,003$) nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni-Holms-Korrektur eine in der 25°C-Gruppe signifikant verlängerte Latenz (Abbildung 3.10).

Tabelle 3.1. Exzitation unter Hypothermie

Gruppe	Prä		3h post		24h post		4d post		6d post		8d post		2w post		4w post		8w post	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Elektroden- kontrollgruppe	3,80 ± 0,57		4,05 ± 0,51		3,94 ± 0,70		3,89 ± 0,58		3,97 ± 0,65		4,05 ± 0,72		3,81 ± 0,65		3,87 ± 0,75		4,01 ± 1,12	
37°C-Gruppe	3,53 ± 0,42		4,73 ± 0,66**		4,82 ± 0,87		4,51 ± 0,90		4,15 ± 1,05		3,88 ± 0,62		4,05 ± 0,85		3,47 ± 0,57		3,23 ± 0,34	
25°C-Gruppe	3,45 ± 0,38		8,29 ± 2,45*		4,74 ± 0,85		4,10 ± 0,44		3,96 ± 0,46		3,83 ± 0,44		3,76 ± 0,25		3,68 ± 0,49		3,49 ± 0,37	

*Ergebnisse der Latenz in der Elektrodenkontroll-, 37°C- und 25°C-Gruppe. Im Intragruppenvergleich der Prä-Werte mit nachfolgenden Zeitpunkten sind nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Holms-Bonferroni-Korrektur Zusammenhänge ab einem Wert von $p < 0,006$ signifikant. Signifikante Werte $p < 0,006$ sind mit * markiert, prä/post: vor und nach Pentobarbital-Injektion; h: Stunden; d: Tage; w: Wochen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.*

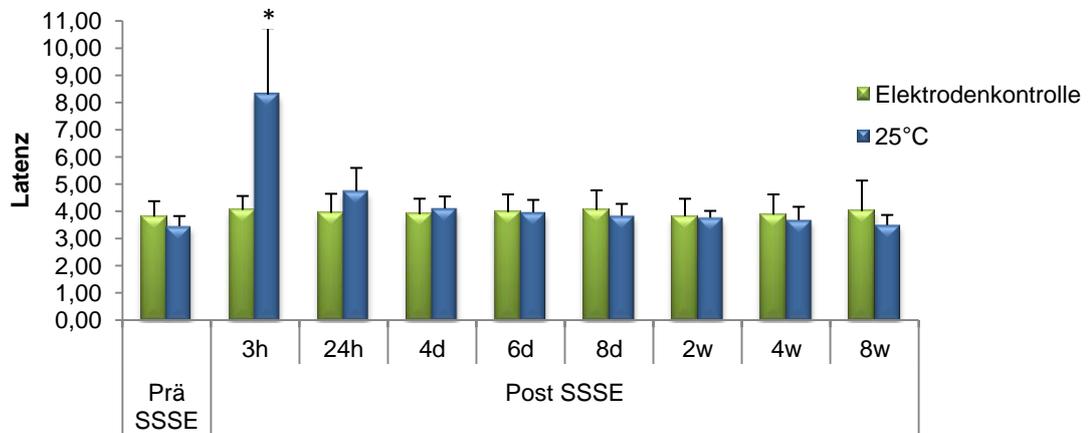


Abbildung 3.10: Vergleich der Latenz von Elektrodenkontrolle- und 25°C-Gruppe über alle Messzeitpunkte. ms: Millisekunden; prä/ post: vor/ nach ; h:Stunden; d: Tage; w: Wochen.

In der 25°C-Gruppe im Vergleich zur 37°C-Gruppe zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Stunden nach SSSE eine reduzierte neuronale Exzitation ($p=0,014$). Dieser Wert war jedoch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni-Holms-Korrektur ($p<0,006$) nicht signifikant. Auch in den folgenden 8 Wochen waren keine signifikanten antiexzitorischen Effekte vorhanden (Abbildung 3.11).

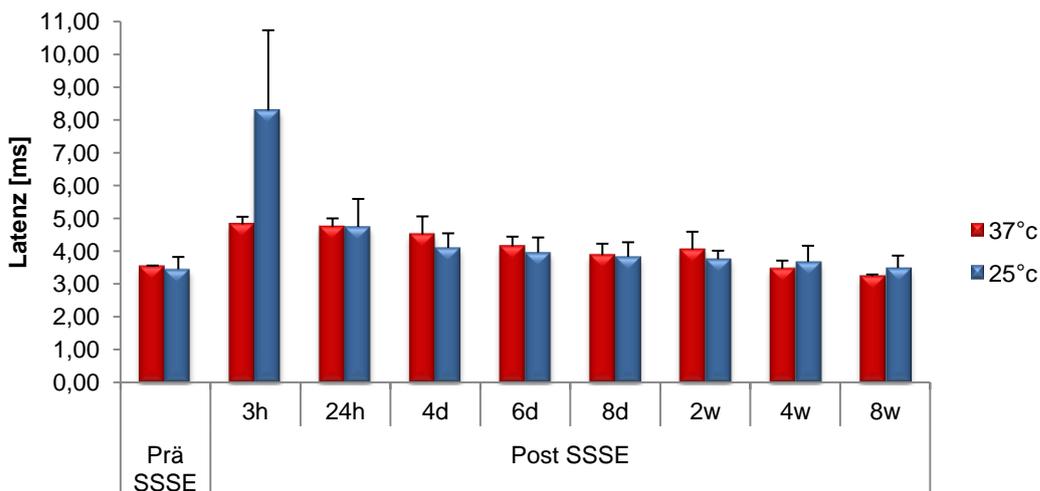


Abbildung 3.11: Vergleich der Latenz von 37°C- und 25°C-Gruppe über alle Messzeitpunkte. ms: Millisekunden; prä/ post: vor/ nach ; h:Stunden; d: Tage; w: Wochen.

3.5.3 Inhibitorische Parameter: Paired-Pulse Messung vor Induktion des SSSE

Die PPR („paired pulse ratio“) ist das mittlere Verhältnis aus der Amplitude des zweiten Summenaktionspotentials zur Amplitude des ersten:

$$PPR = \frac{(a_2+b_2)/2}{(a_1+b_1)/2}$$

Vor Induktion des SSSE betrug die PPR für das IPI 20ms $0,03 \pm 0,12$, für das IPI 25ms $0,03 \pm 0,08$, für das IPI 30ms $0,07 \pm 0,14$, für das IPI 40ms $0,37 \pm 0,52$, für das IPI 50ms $0,74 \pm 0,43$, für das IPI 100ms $1,15 \pm 0,37$, für das IPI 300ms $0,89 \pm 0,19$, für das IPI 500ms $0,85 \pm 0,17$ und für das IPI 1000 ms $0,96 \pm 0,15$ (Abbildung 3.12). Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

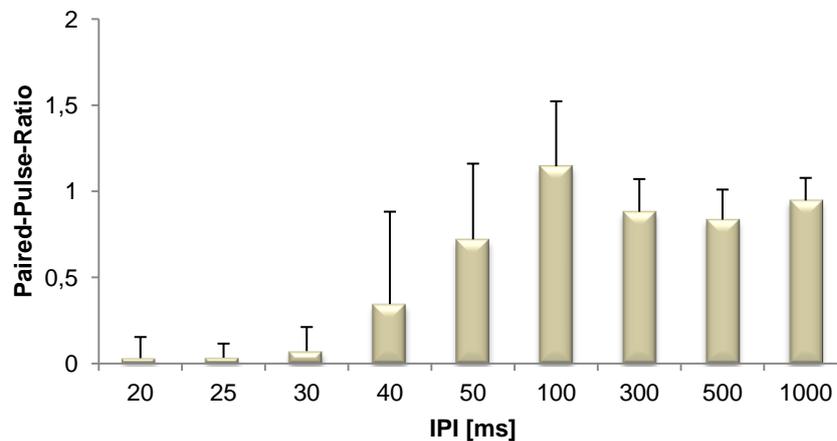


Abbildung 3.12: Verlauf der Paired - Pulse- Ratio vor Induktion des SSSE bzw. Pentobarbital-Injektion; ms: Millisekunden; prä/ post: vor/ nach ; h:Stunden; d: Tage; w: Wochen.

3.5.4 Inhibitorische Parameter: Verlauf der Paired-Pulse-Messung nach SSSE

3.5.4.1 Intragruppenvergleich

Im Intragruppenvergleich zwischen prä- und post-Messungen in der Elektrodenkontrollgruppe zeigten sich mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede. Die Ausnahme war das IPI 50ms für den Zeitpunkt 3 Stunden post ($p=0,001$) (Tabelle 3.2).

In der 37°C-Gruppe zeigte sich ein transienter Inhibitionsverlust, der sich nach 4 bis 8 Wochen wieder vollständig zurückbildete. Dabei sah man auch eine Fazilitierung.

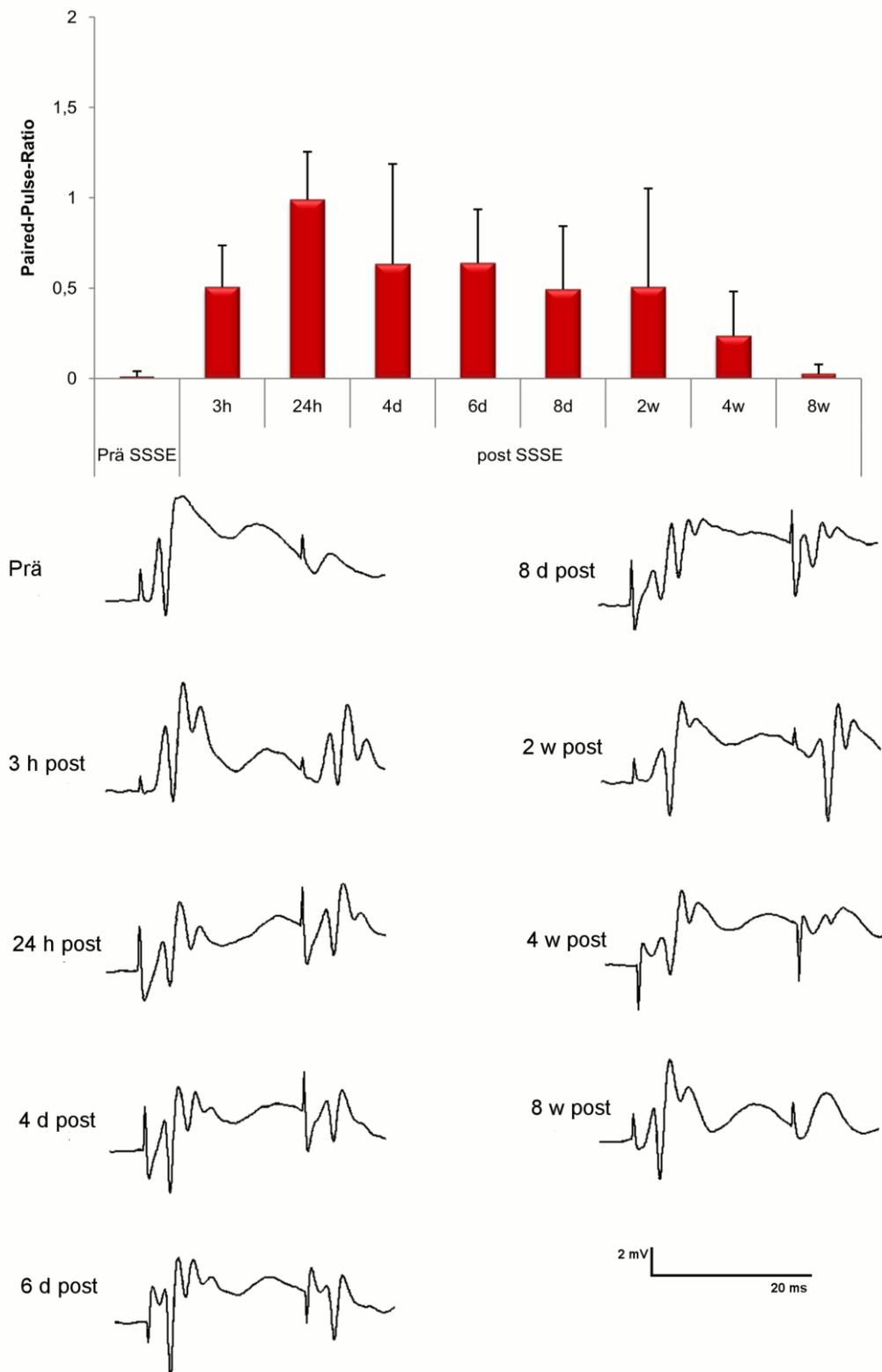


Abbildung 3.13: Verlauf der Paired-Pulse-Ratio bei IPI 20ms über alle Messzeitpunkte in der 37°C-Gruppe; ms: Millisekunden; prä/ post: vor/ nach ; h:Stunden; d: Tage; w: Wochen. Der transiente Inhibitionsverlust nach SSSE in der 37°C-Gruppe entspricht dem schon zuvor beschriebenen Verlauf (Holtkamp et al., 2005a), mit einem vollständigen Inhibitionsverlust 24h post SSSE einer kompletten Wiederherstellung der GABAergen Inhibition 8 Wochen nach SSSE, wahrscheinlich auf der Basis neuronaler Reorganisationsprozesse,.

Tabelle 3.2. Inhibition in der Elektrodenkontrollgruppe

IPI [ms]	Prä		3h post		24h post		4d post		6d post		8d post		2w post		4w post		8w post	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
20	0,08 ± 0,21		0,00 ± 0,00		0,04 ± 0,12		0,00 ± 0,00		0,00 ± 0,00		0,00 ± 0,00		0,02 ± 0,05		0,00 ± 0,00		0,02 ± 0,04	
25	0,04 ± 0,11		0,00 ± 0,00		0,21 ± 0,40		0,27 ± 0,75		0,13 ± 0,24		0,16 ± 0,41		0,04 ± 0,07		0,01 ± 0,01		0,23 ± 0,51	
30	0,11 ± 0,21		0,02 ± 0,06		0,25 ± 0,47		0,37 ± 0,67		0,20 ± 0,21		0,35 ± 0,51		0,10 ± 0,25		0,56 ± 0,95		0,02 ± 0,04	
40	0,61 ± 0,82		0,02 ± 0,05		0,63 ± 0,65		0,62 ± 0,60		0,59 ± 0,58		0,77 ± 0,72		0,46 ± 0,58		0,58 ± 0,58		0,54 ± 0,66	
50	0,90 ± 0,56		0,17 ± 0,26**		0,87 ± 0,59		0,84 ± 0,51		0,86 ± 0,34		0,88 ± 0,51		0,60 ± 0,43		0,71 ± 0,59		1,01 ± 0,92	
100	1,33 ± 0,57		0,93 ± 0,44		1,31 ± 0,28		1,28 ± 0,47		1,11 ± 0,21		1,45 ± 0,50		1,26 ± 0,26		1,31 ± 0,52		1,34 ± 0,41	
300	0,91 ± 0,23		1,05 ± 0,43		0,72 ± 0,14		0,92 ± 0,23		0,95 ± 0,19		0,90 ± 0,21		1,06 ± 0,43		0,76 ± 0,25		0,70 ± 0,33	
500	0,75 ± 0,22		0,77 ± 0,23		0,88 ± 0,36		0,77 ± 0,22		0,77 ± 0,22		0,80 ± 0,18		0,91 ± 0,29		0,87 ± 0,19		0,75 ± 0,19	
1000	0,90 ± 0,11		0,89 ± 0,16		0,82 ± 0,19		1,00 ± 0,20		1,00 ± 0,37		0,93 ± 0,12		0,86 ± 0,19		0,61 ± 0,50		0,81 ± 0,26	

Ergebnisse der Paired-Pulse-Ratio (PPR) in der Elektrodenkontrollgruppe: PPR > 1 bedeutet eine Fazilitierung, d.h. dass die Antwort auf den zweiten Reiz größer ist als die Antwort auf den ersten Reiz. Eine Fazilitierung bei einem IPI von 100ms ist physiologisch (Holtkamp et al., 2005a); siehe auch graphischer Verlauf vor Intervention Abb. 29. Im Intragruppenvergleich der Prä-Werte mit nachfolgenden Zeitpunkten sind nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Holms-Bonferroni-Korrektur Unterschiede ab einem Wert von $p < 0,006$ signifikant. Signifikante Werte $p < 0,006$ sind mit * , $p < 0,001$ mit ** markiert. IPI: Interpulsintervall in Millisekunden; prä/post: vor und nach Pentobarbital-Injektion; h: Stunden; d: Tage; w: Wochen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

bei kürzeren Interpulsintervallen (20-50ms). Am deutlichsten kann man diesen Verlauf bei dem Interpulsintervall 20ms erkennen (Abbildung 3.13). Ein Maximum des Inhibitionsverlustes zeigte sich zum Zeitpunkt 24 Stunden post SSSE. Im Vergleich zur prä-Messung bestand hier bei $p < 0,001$ auch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni-Holms-Methode ($p < 0,006$) ein signifikanter Unterschied. Für die IPIs 25 und 30ms zeigte sich ein signifikanter Unterschied für den Zeitpunkt 6 Tage post SSSE ($p = 0,003$; $p = 0,002$), für das IPI 40ms für die Zeitpunkte 24 Stunden, 4 und 8 Tage post SSSE ($p = 0,003$; $p = 0,002$; $p < 0,001$) (Tabelle 3.3). In der 25°C-Gruppe bestanden im Vergleich der prä-Werte mit den Folgemessungen für das IPI 20-40ms für die Zeitpunkte 24 Stunden, 4 und 6 Tage post SSSE signifikante Unterschiede und für das IPI 50ms ergab sich 24 Stunden post SSSE kein signifikanter Unterschied ($p = 0,014$) jedoch für 4 und 6 Tage post SSSE ($p = 0,001$; $p = 0,005$) (Tabelle 3.4). Für die IPIs 100-1000ms zeigten sich im Intragruppenvergleich weitere vereinzelt signifikante Unterschiede in der Elektrodenkontroll-, 37°C- und 25°C-Gruppe (Tabelle 3.2- 3.4), die am ehesten im Rahmen der zu erwartenden biologischen Variabilität verstanden werden können.

3.5.4.2 Intergruppenvergleich

Im Vergleich der 37°C-Gruppe mit der Elektrodenkontrollgruppe zeigten sich für das IPI 20ms für die Zeitpunkte 3 Stunden bis 8 Tage post Intervention signifikante Unterschiede ($p = 0,001$; $p = 0,001$; $p = 0,002$; $p = 0,001$; $p = 0,003$) (Abbildung 3.14) sowie für das IPI 25ms für den Zeitpunkte 3h post SSSE ($p = 0,003$).

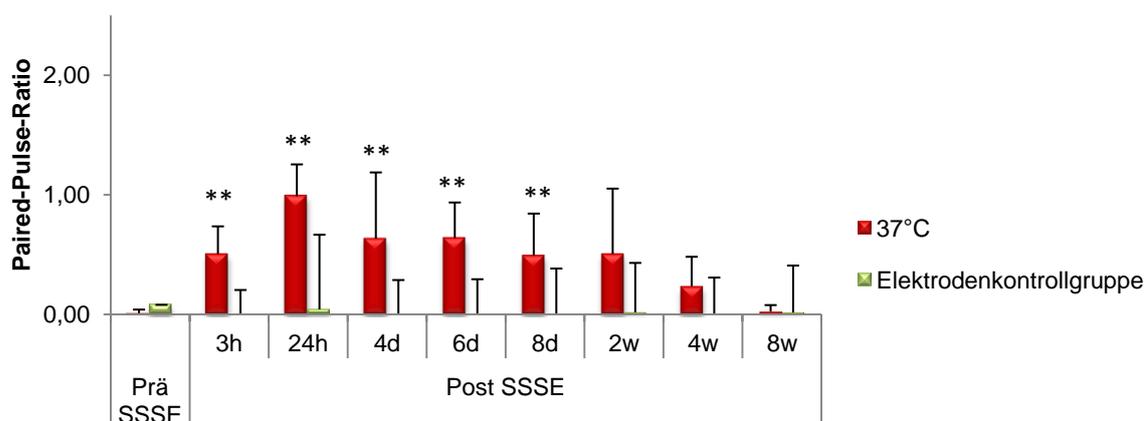


Abbildung 3.14: Vergleich der Paired-Pulse-Ratio von Elektrodenkontroll- und 37°C-Gruppe über alle Messzeitpunkte für das IPI 20ms.

Tabelle 3.3: Inhibition unter Normthermie

IP1 [ms]	Prä		3h post		24h post		4d post		6d post		8d post		2w post		4w post		8w post	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
20	0,01 ± 0,03		0,51 ± 0,23		0,99 ± 0,27**		0,63 ± 0,55		0,64 ± 0,30*		0,49 ± 0,35		0,51 ± 0,55		0,24 ± 0,25		0,02 ± 0,05	
25	0,05 ± 0,08		0,54 ± 0,21		1,02 ± 0,55		0,51 ± 0,42		0,54 ± 0,21*		0,57 ± 0,38		0,60 ± 0,47		0,19 ± 0,28		0,04 ± 0,05	
30	0,04 ± 0,07		0,49 ± 0,35		1,04 ± 0,55		0,53 ± 0,44		0,71 ± 0,29*		0,47 ± 0,40		0,64 ± 0,49		0,36 ± 0,25		0,08 ± 0,11	
40	0,28 ± 0,28		0,63 ± 0,42		1,00 ± 0,28*		0,81 ± 0,29*		0,72 ± 0,23		0,73 ± 0,50**		0,68 ± 0,43		0,45 ± 0,42		0,10 ± 0,17	
50	0,76 ± 0,37		0,85 ± 0,36		1,00 ± 0,28		0,73 ± 0,27		0,78 ± 0,25		0,84 ± 0,40		0,88 ± 0,35		0,49 ± 0,40		0,42 ± 0,43	
100	1,04 ± 0,24		1,18 ± 0,43		1,10 ± 0,12		0,91 ± 0,18		1,00 ± 0,13		0,88 ± 0,15		0,89 ± 0,21		0,85 ± 0,27		0,72 ± 0,19	
300	0,84 ± 0,22		0,94 ± 0,23		1,00 ± 0,15		0,82 ± 0,16		0,92 ± 0,13		0,92 ± 0,21		0,91 ± 0,21		0,96 ± 0,12		0,76 ± 0,20	
500	0,86 ± 0,14		1,09 ± 0,40		0,94 ± 0,13		0,99 ± 0,22		0,85 ± 0,15		1,00 ± 0,04		0,90 ± 0,07		1,00 ± 0,09		0,79 ± 0,17	
1000	1,00 ± 0,18		0,87 ± 0,08		0,99 ± 0,13		0,93 ± 0,15		1,03 ± 0,21		0,96 ± 0,06		0,91 ± 0,14		0,97 ± 0,11		0,92 ± 0,18	

Ergebnisse der Paired-Pulse-Ratio (PPR) in der 37°C-Gruppe; PPR > 1 bedeutet eine Fazilitierung, d.h. dass die Antwort auf den zweiten Reiz größer ist als die Antwort auf den ersten Reiz. Eine Fazilitierung bei einem IP1 von 100ms ist physiologisch (Holtkamp et al., 2005a); siehe auch graphischer Verlauf vor Intervention Abb. 29. Im Intragruppenvergleich der Prä-Werte mit nachfolgenden Zeitpunkten sind nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Holms-Bonferroni-Korrektur Unterschiede ab einem Wert von $p < 0,006$ signifikant. Signifikante Werte $p < 0,006$ sind mit *, $\leq 0,001$ mit ** markiert. IP1: Interpulsintervall in Millisekunden; prä/post: vor und nach Pentobarbital-Injektion; h: Stunden; d: Tage; w: Wochen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Tabelle 3.4: Inhibition unter Hypothermie

IPI [ms]	Prä		3h post		24h post		4d post		6d post		8d post		2w post		4w post		8w post	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
20	0,00 ± 0,00		0,19 ± 0,20		1,35 ± 0,62**		0,87 ± 0,29**		0,86 ± 0,29**		0,26 ± 0,38		0,34 ± 0,41		0,29 ± 0,31		0,30 ± 0,39	
25	0,01 ± 0,03		0,16 ± 0,21		1,48 ± 0,58**		0,74 ± 0,26**		0,74 ± 0,24**		0,46 ± 0,36		0,49 ± 0,40		0,30 ± 0,27		0,19 ± 0,33	
30	0,06 ± 0,10		0,21 ± 0,25		1,32 ± 0,43**		0,98 ± 0,51*		0,76 ± 0,18**		0,53 ± 0,50		0,62 ± 0,36		0,38 ± 0,38		0,22 ± 0,39	
40	0,12 ± 0,12		0,19 ± 0,26		1,41 ± 0,42**		0,92 ± 0,26**		0,89 ± 0,25**		0,58 ± 0,37		0,65 ± 0,34		0,52 ± 0,51		0,58 ± 0,48	
50	0,48 ± 0,28		0,23 ± 0,31		1,26 ± 0,48		1,01 ± 0,16**		0,92 ± 0,22*		0,69 ± 0,25		0,85 ± 0,42		0,77 ± 0,40		0,57 ± 0,54	
100	1,07 ± 0,11		0,37 ± 0,49		1,06 ± 0,21		1,02 ± 0,15		0,94 ± 0,25		1,09 ± 0,16		1,04 ± 0,26		0,96 ± 0,12		0,88 ± 0,12	
300	0,90 ± 0,11		0,65 ± 0,32		0,98 ± 0,17		1,02 ± 0,07		0,93 ± 0,19		1,02 ± 0,18		0,96 ± 0,10		0,98 ± 0,07		0,92 ± 0,08	
500	0,91 ± 0,12		0,81 ± 0,31		0,99 ± 0,10		0,92 ± 0,23		0,93 ± 0,17		0,98 ± 0,15		0,96 ± 0,08		0,95 ± 0,07		0,84 ± 0,21	
1000	0,93 ± 0,07		0,90 ± 0,18		0,73 ± 0,29		0,95 ± 0,13		1,01 ± 0,05		1,01 ± 0,11		0,97 ± 0,13		0,92 ± 0,10		1,04 ± 0,20	

Ergebnisse der Paired-Pulse-Ratio (PPR) in der 25°C-Gruppe; PPR > 1 bedeutet eine Fazilitierung, d.h. dass die Antwort auf den zweiten Reiz größer ist als die Antwort auf den ersten Reiz. Eine Fazilitierung bei einem IPI von 100ms ist physiologisch (Holtkamp et al., 2005a); siehe auch graphischer Verlauf vor Intervention Abb. 29. Im Intragruppenvergleich der Prä-Werte mit nachfolgenden Zeitpunkten sind nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Holms-Bonferroni-Korrektur Unterschiede ab einem Wert von $p < 0,006$ signifikant. Signifikante Werte $p < 0,006$ sind mit * , $\leq 0,001$ mit ** markiert. IPI: Interpulsintervall in Millisekunden; prä/post: vor und nach SSSE; h: Stunden; d: Tage; w: Wochen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Ebenso zeigten sich für den Vergleich der 25°C-Gruppe mit der Elektrodenkontrollgruppe für das IPI 20ms für die Zeitpunkte 3 Stunden bis 6 Tage post Intervention ($p=0,003$; $p=0,001$; $p<0,001$, $p=0,001$) (Abbildung 3.15) sowie für das IPI 25ms für die Zeitpunkte 24h und 6d post Intervention ($p=0,002$; $p=0,005$) signifikante Unterschiede.

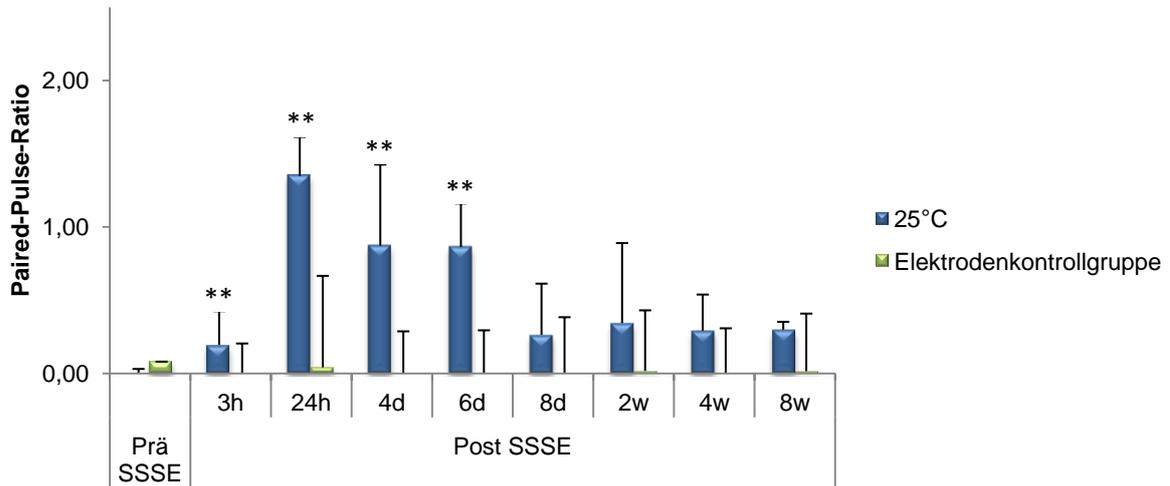


Abbildung 3.15: Vergleich der Paired-Pulse-Ratio von 37°C- und 25°C-Gruppe über alle Messzeitpunkte für das IPI 20ms.

Im Vergleich der 37°C- und 25°C-Gruppe konnte man für das IPI 25ms zum Zeitpunkt 3h nach SSSE einen leichten Trend (kleinere Paired-Pulse-Ratio) erkennen ($p=0,032$), der jedoch nach Korrektur für Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni-Holms-Korrektur ($P<0,006$) nicht signifikant blieb (Abbildung 3.16). Für spätere Messzeitpunkte oder andere IPIs zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der 37°C- und 25°C-Gruppe.

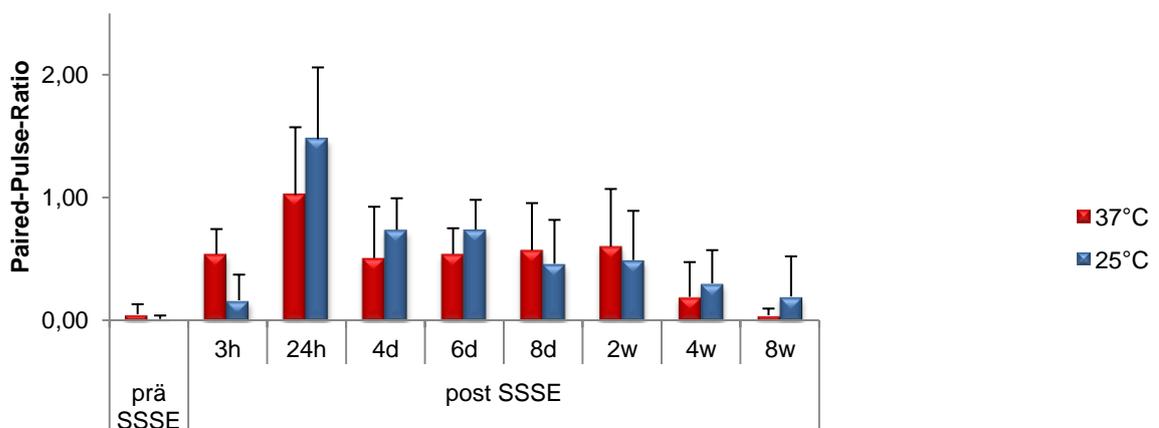


Abbildung 3.16: Vergleich der Paired-Pulse-Ratio von 37°C- und 25°C-Gruppe über alle Messzeitpunkte für das IPI 25ms.

4 Diskussion

In Hinblick auf die bisher nicht erfolgreichen pharmakologischen Therapieansätze in der Prävention der Entwicklung einer Epilepsie nach Hirnverletzungen ist die Suche nach anderen wirksamen Therapien unumgänglich. Die insgesamt zu beobachtende Wirkungslosigkeit gängiger Antiepileptika auf die Epileptogenese lässt vermuten, dass hier andere Mechanismen und molekulare Zielstrukturen eine Rolle spielen könnten als bei der Behandlung der Epilepsien. Zielstrukturen, die zur Unterdrückung von Anfällen (Iktogenese) führen, befinden sich in einem umgebauten Netzwerk, in welchem die Umbauprozesse der Epileptogenese bereits abgeschlossen sind. Ein wichtiges Ziel in der Epilepsieforschung ist die Identifikation der für die Epileptogenese wichtigen Strukturen und Mechanismen und die Entwicklung daran angreifender Therapien (Holtkamp & Meierkord 2007; Kobow et al., 2012). In letzter Konsequenz würde man hiermit versuchen, das Auftreten der Erkrankung Epilepsie nach einem zerebralen Trauma zu verhindern bzw. die Ausprägung der Erkrankung nach Möglichkeit deutlich abzuschwächen (Pitkanen and Lukasiuk, 2011). Die Hypothermie erscheint auf Grund der bereits im Vorfeld vielfach gezeigten neuroprotektiven und antiepileptischen Eigenschaften ein vielversprechender Therapieansatz. Von besonderer Bedeutung für die möglicherweise antiepileptogenen Eigenschaften erscheint hierbei die Beeinflussung von Ionenkanälen und verminderte Freisetzung exzitatorischer Transmitter (siehe Absatz 1.5.2).

In der hier vorgestellten tierexperimentellen Studie wurde untersucht, inwiefern die Entwicklung einer Epilepsie mit spontanen Anfällen nach einem experimentell induzierten SE mittels Hypothermie beeinflusst oder möglicherweise sogar komplett verhindert werden könnte.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie keine antiepileptogene Wirkung der Hypothermie nach experimentell induzierten SE nachgewiesen werden. Das generelle Auftreten von Anfällen und die Häufigkeit der Anfälle unterschieden sich in der Gruppe der gekühlten und nicht-gekühlten Tiere nicht. Elektrophysiologisch zeigte sich 3 Stunden nach SSSE und Kühlung ein Trend zu einer verminderten neuronalen Exzitation. Letztendlich konnte jedoch sowohl bezüglich der elektrophysiologischen als

auch der klinischen Parameter keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die Hinweise für eine weniger stark ausgeprägte Form der Epilepsie aufgezeigt hätten.

4.1 Temperaturverlauf

Ratten haben wie Menschen eine durchschnittliche Körpertemperatur von 37°C. Die normale Körpertemperatur bei Ratten wird in der Literatur zwischen 37,02°C und 37,88°C angegeben (Hainsworth, 1967; Meerlo et al, 1995). Die durchschnittliche Körpertemperatur der Tiere in der 25°C- und 37°-Gruppe betrug zu Beginn der Messung vor Induktion des SSSE 37,66°C. Während der Stimulation und dem SSSE kam es in beiden Gruppen zu einem deutlichen Anstieg der Körpertemperatur der Tiere um 2-3°C (Abbildungen 3.2 a,b und 3.3). Der beobachtete Temperaturanstieg während der Stimulation ist vermutlich vorrangig als Konsequenz der motorischen Entäußerungen im Rahmen der generalisierten Anfälle zu verstehen. Jedoch auch während des sich anschließenden non-convulsiven SSSE blieb die durchschnittliche Körpertemperatur erhöht und schwankte mit leichten Abweichungen um 38°C. Die Erklärung dafür liegt vermutlich in Temperaturregulationsstörungen, die sowohl im Rahmen eines generalisiert-convulsiven als auch eines non-convulsiven SE auftreten können (Holtkamp et al. 2007 Brain Res). Auch bei Menschen scheinen diese Temperaturregulationsstörungen eine Rolle zu spielen, so ist die Entwicklung einer Hyperthermie während eines generalisierten tonisch-klonischen SE als Komplikation vorbeschrieben (Aminoff und Simon, 1980). In anderen Arbeiten sind während eines non-convulsiven SE bei Patienten indirekte Zeichen der Temperaturregulations-störung in Form von Kältezittern und Piloerektion (Stefan et al., 2003), als auch eine erhöhte Gesichtstemperatur beschrieben worden (Sunderam und Osorio, 2003).

Während der Induktion der Hypothermie betrug die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen der Ziel-Temperatur von 25°C ca. 40 Minuten. Demnach wurde die Temperatur um 0,3°C pro Minute gesenkt. Die Letalität nach SSSE und Hypothermie betrug 26,7%, mit drei von insgesamt 15 gekühlten Tieren, die innerhalb der ersten 24 Stunden verstarben. In der klinischen Situation bei Menschen wird inzwischen häufig z.B. nach Reanimation oder bei Säuglingen bei hypoxischem Hirnschaden die Hypothermie therapeutisch angewendet. Die Zieltemperatur beträgt in der Regel 32-34°C und wird für ca. 48 bis 36 Stunden aufrechterhalten. Schwere Nebenwirkungen wie Koagulopathien, venöse Thrombembolien oder ventrikuläre Tachykardien sind bei Menschen ab einer Temperatur von < 30°C beschrieben (Benson et al, 1959; Corry et

al, 2008). Problematisch bzw. hauptsächlich assoziiert mit dem Auftreten von Nebenwirkungen ist jedoch laut Literatur nicht das rasche Herunterkühlen, sondern zu schnelles Wiedererwärmen. Maxwell et al. beschrieben in ihrer tierexperimentellen Studie mit Schweinen, dass schnelleres Wiedererwärmen als 1°C alle 40 Minuten ($=0,03^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$) zu sekundären axonalen Schädigungen führte (Maxwell et al, 2005). Alam et al. verglichen eine ungekühlte Gruppe mit drei gekühlten Gruppen, die unterschiedlich schnell wiedererwärmt wurden (langsam: $0,25^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$; medium: $0,5^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$; schnell: $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$). Hierbei zeigte sich –bezogen auf das Überleben und die neurologische Prognose der Tiere - eine signifikant höhere Überlebensrate in der „langsam“- und „medium“-Gruppe gegenüber ungekühlten Kontrollen. Die Überlebensrate unter den verschiedenen gekühlten Gruppen unterschied sich nur signifikant zwischen der „schnell“- und „medium“-Gruppe. Die Tiere in der „medium“-Gruppe hatten eine signifikant bessere Überlebensrate (Alam et al, 2006). In der hier dargestellten Arbeit betrug die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen von 37°C im Anschluss an die Kühlung in der 25°C -Gruppe ca. 158 Minuten, das entspricht $0,08^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ ($=4,5^{\circ}\text{C}/\text{Stunde}$). Als kontrolliertes und langsames Wiedererwärmen bei Menschen wird eine Temperatursteigerung von $0,2$ - $0,5^{\circ}\text{C}/\text{Stunde}$ empfohlen (Poldermann et al, 2008). Nimmt man nun die Daten von Alam et al., waren bei einem Wiedererwärmen von $0,25^{\circ}\text{C}$ bzw. $0,5^{\circ}\text{C}$ eine deutlich verbesserte Überlebensrate und auch eine verbesserte neurologische Prognose gezeigt worden. Bezogen auf den Parameter Überleben war in der hier dargestellten Arbeit ein Wiedererwärmen von $0,08^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ sogar noch deutlich langsamer. Bezieht man sich jedoch auf die Daten von Maxwell et al., die ein Wiedererwärmen von $0,03^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ empfehlen, war das Wiedererwärmen in der hier dargestellten Studie zu schnell. Allerdings beziehen sich Maxwell et al. in ihrer Empfehlung auf die völlige Vermeidung axonaler Schäden und nicht speziell auf das Überleben. Möglicherweise hätte die Letalität nach Hypothermie, wie sie in dieser Arbeit aufgetreten ist, durch noch langsameres Wiedererwärmen gesenkt werden können.

4.2 Spontane Anfälle im Verlauf nach SSSE

Bezogen auf das generelle Auftreten von Anfällen nach SSSE konnten wir zwar eine leichte Rechtsverschiebung im Auftreten der Anfälle in der Gruppe der gekühlten Tiere zeigen, es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zur nicht-gekühlten Kontrolle

(37°C-Gruppe). Dieser Eindruck erscheint besonders deutlich, wenn man nur die Tiere mit Video und EEG betrachtet (Abbildung 3.6 a und b).

Sowohl in der 37°C- als auch in der 25°C-Gruppe hatten unter Einbeziehung der Daten aus Video und EEG 100% der Tiere nach 8 Wochen wiederholt auftretende unprovokierte epileptische Anfälle. Insgesamt konnte damit weder ein signifikanter Unterschied bezüglich des Einflusses der Hypothermie auf das erstmalige noch auf das generelle Auftreten von epileptischen Anfällen festgestellt werden.

D'Ambrosio et al. untersuchten in einem posttraumatischen Tiermodell die Effekte der Hypothermie auf die Entwicklung epileptischer Anfälle. Sie induzierten hierzu ein Trauma im Rahmen eines fluid-percussion-Modells (siehe Absatz 1.4), indem sie auf freigelegten Kortex von Ratten einen Druckimpuls übertrugen. Anschließend befestigten sie fünf epidurale Elektroden sowie zusätzlich eine Temperaturelektrode, die in einem Sockel, welcher eine passive Kühlung enthielt, auf dem Kopf befestigt wurden. Beginnend drei Tage nach der Induktion des Traumas wurde die Körpertemperatur der Tiere mittels der lokalen passiven Kühlung für 5,5 Wochen kontinuierlich um 0,5-2°C gesenkt. Elektrokorticale Ableitungen zur Messung der Anfallshäufigkeit wurden während dieser Zeit ein- bis zweimal die Woche für jeweils 24 Stunden durchgeführt. Nahezu alle gekühlten Tiere waren anfallsfrei oder hatten eine signifikant geringere Anfallsdauer. Dieser Effekt persistierte bis 10 Wochen nach Ende der Kühlung. (D'Ambrosio et al., 2013). Es lässt sich diskutieren, ob die Ergebnisse von D'Ambrosio et al. unter anderem deswegen so deutlich ausfielen, weil die epileptogenen Umbauprozesse nach dem von diesen Autoren induzierten Trauma möglicherweise weniger drastisch gewesen waren. So entwickelten nach anderen Studien nur 43-50% der Tiere in diesem Modell überhaupt eine Epilepsie (Pitkänen und McIntosh, 2006; Kharatishvili, 2006). Somit ist es durchaus möglich, dass ein Teil der gekühlten Tiere in der Studie von D'Ambrosio et al., unabhängig von der Intervention, keine Anfälle entwickelt hätten. In der hier vorliegenden Arbeit entwickelten nach einem SSSE 100% der Tiere eine Epilepsie. Die Körpertemperatur während der Hypothermie lag 12°C unterhalb der normalen Körpertemperatur anstatt nur 1-2° wie bei D'Ambrosio et al., jedoch war auch der Zeitraum von 3 Stunden gegenüber 5 Wochen in dieser Arbeit deutlich kürzer. Letztendlich scheint einerseits die Dauer der Hypothermie, andererseits das auslösende Trauma von entscheidender Bedeutung für die antiepileptogene Wirkung der Hypothermie. Interessant wäre daher, ob in einem Status epilepticus-

Modell, wie es in dieser Arbeit angewendet wurde, die Ergebnisse von D'Ambrosio et al. reproduzierbar wären.

4.3 Anfallscharakteristika

In dieser Arbeit wurden nicht nur das generelle Auftreten von Anfällen, sondern auch Charakteristika wie Anfallsdauer, Anfallsfrequenz und Anfallsstärke untersucht.

Bezüglich der Anfallsdauer und der Häufigkeit des Auftretens epileptischer Anfälle (Anfallsfrequenz) konnten durch die Hypothermie-Behandlung keine signifikanten Effekte gezeigt werden. Bezogen auf die Anfallsstärke konnte für die Tiere der 25°-Gruppe gegenüber den Tieren der 37°C-Gruppe zum Zeitpunkt Woche 8 ein Trend zu weniger stark ausgeprägten Anfällen gezeigt werden. Da das Ergebnis nach der statistischen Korrektur für Mehrfachvergleiche aber nicht signifikant war, konnte kein modulierender antiepileptogener Effekt der Hypothermie nachgewiesen werden. Es lässt sich spekulieren, ob bei einer insgesamt höheren Anzahl von Tieren der Unterschied in der Schwere der Anfälle signifikant gewesen wäre.

Atkins et al., die ebenso wie D'Ambrosio et al. die antiepileptogenen Eigenschaften der Hypothermie in einem posttraumatischen Tiermodell mittels fluid-percussion untersuchten, konnten in ihrer Studie eine Modulation der Hypothermie zeigen. Beginnend 30 Minuten nach Induktion des Traumas, kühlten sie Ratten für 4 Stunden bis auf 33°C ab und erwärmten sie im Anschluss über 2 Stunden langsam wieder. Zwölf Wochen danach injizierten sie den Tieren eine vorher an naiven Tieren getestete Dosis des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Pentylenetetrazol (PTZ). Mit PTZ wird die GABAerge Hemmung unterdrückt, wodurch es zu einer erhöhten zerebralen Exzitation und damit zu einer höheren Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle kommt. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere für eine Stunde beobachtet und die Anzahl und Intensität der auftretenden Anfälle nach der Racine-Skala dokumentiert. Bei einer weiteren Gruppe wurden, um die Daten insgesamt zu stärken, die Anfälle zusätzlich mittels elektrographischen Ableitungen für eine Stunde nach PTZ-Gabe beobachtet. Letztlich konnten Atkins et al. bei den gekühlten Tieren eine signifikant geringere Anfallsempfindlichkeit nach der Injektion von PTZ feststellen, das heißt, dass die gekühlten Tiere nach Injektion von PTZ signifikant weniger Anfälle bekamen als die nicht-gekühlten Tiere (Atkins et al., 2010). Prinzipiell war der Einsatz der Hypothermie

bei Atkins et al. mit dem in der hier dargestellten Arbeit vergleichbar. Es wurde jeweils wenige Stunden andauernd mehr oder weniger direkt nach dem Trauma gekühlt, wenn sich auch die Temperatur unterschied. Im Unterschied zu der hier vorgestellten Arbeit ist in der Arbeit von Atkins et al. nicht untersucht worden, ob es bei den Tieren innerhalb der 12 Wochen bis zur Injektion des PTZ zu spontanen wiederkehrenden Anfällen kam. Damit konnte zwar eindeutig gezeigt werden, dass nach Hypothermie die Exzitabilität im Gehirn der gekühlten Tiere abgenommen hatte. Inwiefern bei diesen Versuchstieren tatsächlich eine posttraumatische Epilepsie vorlag, ist aus den vorliegenden Daten nicht nachzuvollziehen. Letztendlich scheint die Hypothese, dass eine ausgeprägte Hypothermie von 25°C stärkere antiepileptogene Eigenschaften als eine Hypothermie von 32-34°C hat, widerlegt. Unter Einbeziehung der Daten von D'Ambrosio et al. scheint insgesamt die Tiefe der Hypothermie weniger entscheidend als die Dauer der Einwirkung.

Der Trend zu insgesamt klinisch weniger stark ausgeprägten Anfällen in der 25°C-Gruppe könnte vermutlich zum Teil die subjektive Beobachtung erklären, dass diese Tiere in der Handhabung („handling“) deutlich unkomplizierter waren. Labortiere sind normalerweise – soweit man sie nicht daran gewöhnt – nicht handzahn, aber in der Regel auch nicht aggressiv. Tiere mit epileptischen Anfällen werden in der Literatur in der Handhabung häufiger als aggressiv beschrieben (Holmes et al, 1990). Im Extremfall versuchten sie, zu beißen und aus dem Käfig heraus zu springen, sobald nur der Käfig-Deckel angehoben bzw. mit der Hand in den Plexiglas-Käfig gegriffen wurde. Es wurde jedoch, bezogen auf diese Beobachtung, keine systematische Bewertung durchgeführt.

4.4 Elektrophysiologie

Für die Messung der GABAergen Inhibition im Hippocampus sowohl in naiven als auch epileptischen Tieren wurde bereits vielfach die Paired-Pulse-Messung angewendet (Waldbaum, 2009).

Vor SSSE bzw. Pentobarbital-Injektion zeigte sich in dieser Studie, über die verschiedenen IPIs betrachtet, der bereits in der Literatur beschriebene Verlauf der Paired-Pulse-Messung (Abbildung 3.12). Hierbei war bei kleineren IPIs (20-40ms) eine fast vollständige Unterdrückung der Reizantwort des zweiten Stimulus zu sehen. Bei längerem IPI zeigte sich eine Abnahme der Inhibition mit immer größer werdendem

zweiten Potential und einer Fazilitierung (zweites Potential ist größer als das erste Potential) beim IPI 100ms mit einer danach wieder ansteigenden Inhibition (Holtkamp et al., 2005a). Es wird davon ausgegangen, dass die Unterdrückung der Reizantwort nach dem zweiten Stimulus im Gyrus dentatus ausgelöst wird durch die GABAerge Inhibition sowohl durch die rekurrente Aktivierung von Korbzellen, als auch durch die Vorwärtshemmung anderer inhibierender Interneurone. Die Unterdrückung der Reizantwort nach dem zweiten Stimulus entsteht dadurch, dass die entsprechenden Körnerzellen bei Eintreffen des Stimulus noch refraktär sind. Die mit dem ersten Stimulus verzögert ebenfalls ausgelöste inhibitorische Erregung über die Korbzellen (basket cells) und inhibitorischen Interneurone erreicht die Körnerzelle kurz vor dem zweiten Stimulus, somit können die Körnerzellen durch diesen nicht sofort wieder erregt werden. Je länger der Abstand zwischen den beiden Stimuli ist, desto eher sind die Körnerzellen wieder erregbar (Andersen et al., 1964). Da die GABAerge Inhibition, im Besonderen die über GABA_A-Rezeptoren vermittelte Inhibition, sehr stark ist, wird in der Regel die im Paired-Pulse-Paradigma gemessene Inhibition mit der GABAergen Inhibition gleichgesetzt. Gleichzeitig geht man davon aus, dass die in den Zellen des Gyrus dentatus gemessene Inhibition ein Spiegel der gesamten Inhibition im Hippocampus darstellt (Andersen et al., 1966).

In der 37°C-Gruppe war in den ersten Wochen nach SE ein transienter Verlust der GABA vermittelten funktionellen Inhibition zu beobachten (Abbildung 3.13). Direkt nach dem SE (3 Stunden post bis 6 Tage post) war der Verlust am größten. Zum Zeitpunkt Woche 8 ist es jedoch zu einer vollständigen Wiederherstellung der GABAergen Inhibition gekommen. Eine direkte Kausalität zwischen dem initialen Inhibitionsverlust und dem späteren Auftreten von Anfällen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Jedoch legt die temporäre Unterbrechung der Filterfunktion des Gyrus dentatus eine indirekte Verbindung nahe (Holtkamp et al., 2005a). In der Vergangenheit wurden mehrere Untersuchungen zur Rolle und zum Mechanismus des Inhibitionsverlustes im Rahmen der Epileptogenese durchgeführt. Eine Erklärung stellt die „dormant basket cell hypothesis“ (dbch) dar. Diese war ein Versuch, zwei scheinbar sich widersprechende Beobachtungen zu vereinbaren. Zum einen bleibt die strukturelle Basis des inhibitorischen Systems in epileptischem Gewebe relativ intakt, zum anderen kommt es aber zu dem bereits beschriebenen Inhibitionsverlust. Die „dormant basket cell hypothesis“ geht davon aus, dass es zu einer funktionellen Entkoppelung der

Interneurone von ihren exzitatorischen Afferenzen kommt. Dadurch kommt es zu einer Hyperexzitabilität von Neuronen und einem Verlust von Paired-Pulse-Inhibition. Wenn diese Interneurone wieder aktiviert werden, können sie ihre Funktion allerdings erneut ausführen. Sie sind also durch die Entkoppelung nur in einem „schlafenden Zustand“ gewesen (Sloviter, 1991). Die „dormant basket cell hypothesis“ ist allerdings seit ihrer Beschreibung immer wieder in Frage gestellt worden (Bekenstein und Lothman, 1993). Zum einen kommt es in vielen Modellen der TLE eher zu einer gesteigerten Inhibition als zu einem Verlust an Inhibition. Zum anderen war es mehrfach möglich, direkt von inhibitorischen Interneuronen abzuleiten, was die These der funktionellen Entkoppelung widerlegen würde. Die meisten der Interneurone waren auch hyperexzitabel, also übererregbar (Bernard et al., 1998). Mazarati et al. konnten zeigen, dass einige Aspekte der GABAergen Inhibition nach experimenteller Induktion eines SE mittels elektrischer Stimulation des Tractus perforans tatsächlich „schlafend“ sind. Sie stellten allerdings die Hypothese auf, dass es zu einer Demaskierung einer vorher bestehenden Doppelinnervation kommt. Demnach käme es nicht zu einer Denervierung der Korbzellen, sondern zu einer Unterdrückung der GABAergen Inhibition. Mit Hilfe ihrer Experimente konnten sie dies bestätigen. Sie konnten die Inhibition im Tiermodell durch die Gabe von NMDA-Antagonisten (wie z.B. MK-801) wieder herstellen. Es scheint damit zu einer aktiven NMDA- Rezeptor-vermittelten Unterdrückung der GABAergen Inhibition zu kommen (Mazarati et al., 1997).

Nur zum Zeitpunkt 3 Stunden post für das IPI 50 ms konnte man eine signifikante Verringerung der Inhibition im Vergleich zu den prä-Messungen sehen ($p=0,001$). Da sowohl die Elektroden-Kontrollgruppe als auch die beiden post-SSSE-Gruppen Pentobarbital erhielten, wurde für die reine GABAerge Wirkung des Pentobarbitals korrigiert. Eventuelle elektrophysiologische Unterschiede könnten daher durch die Wirkung der Hypothermie erklärt werden. Allerdings war der initial gesehene Trend zu einem verminderten Inhibitionsverlust 3h post Kühlung in der 25°C-Gruppe nach Korrektur für Mehrfach-Vergleiche nicht mehr signifikant (Abbildung 3.16). Einen möglichen indirekten Hinweis für einen verminderten Inhibitionsverlust 3 Stunden post Kühlung zeigt sich im Vergleich der Elektrodenkontroll-Gruppe mit der 37°C-Gruppe, die eine signifikant höhere PPR ($p = 0.001$) hatte und damit einen deutlichen Inhibitionsverlust, wohingegen in der 25°C-Gruppe im Vergleich zur Elektrodenkontroll-Gruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der PPR bestand ($p=0,083$). Auch

bezüglich der Latenz zeigte sich 3 Stunden post-Kühlung ein indirekter Hinweis auf mögliche Effekte der Kühlung im Sinne einer verlängerten Latenz und damit reduzierten neuronalen Exzitabilität. Im Vergleich der 37°C- und 25°C-Gruppe zeigte sich nach Korrektur für Mehrfachvergleiche kein signifikantes Ergebnis 3 h post-Kühlung. Jedoch war im Vergleich der 25°C-Gruppe mit der Elektrodenkontroll-Gruppe zu diesem Zeitpunkt eine signifikant verlängerte Latenz ($p=0,003$) zu sehen, wobei im Vergleich der 37°C- und Elektrodenkontroll-Gruppe sich kein Unterschied zeigte. Möglicherweise konnten durch die Hypothermie akut in der frühen Phase der Epileptogenese auftretende Schäden, wie die Ruptur der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Schädigung und Zelltod von Nervenzellen durch Exzitotoxizität, gemildert werden. Protektive Eigenschaften der Hypothermie bei 32°C bezüglich einer Störung der BHS konnten experimentell gezeigt werden (Karibe, 1994). Zumindest schien dieser mögliche akute Effekt nicht anzuhalten, da zu den späteren Zeitpunkten in der 25°C-Gruppe ebenfalls ein deutlicher Inhibitionsverlust auftrat. Seiffert et al. beschrieben, dass es bei länger bestehender Ruptur der BHS zu kortikalen Dysfunktionen kam, die charakterisiert waren durch epileptiforme anfallsartige hypersynchrone Aktivität. Es kam zu einer erhöhten Permeabilität der BHS, wodurch Albumin aus dem Serum ins Gehirn gelangte. Dies führte zu einer teilweise reversiblen Aktivierung von Astrozyten (Seiffert, 2004). Durch Aufnahme des Serum-Albumins in die Astrozyten kam es zu einer reduzierten Pufferung des extrazellulären Kaliums. Die Akkumulation von extrazellulärem Kalium führt zu einer neuronalen Hyperexzitabilität über NMDA-Rezeptoren, wodurch es im Verlauf zu einer lang anhaltenden epileptischen Aktivität des Kortex kommen kann (Ivens, 2007).

Die in tierexperimentellen Studien nach SE erfolgte Gabe von antiglutamaterg wirkenden Substanzen wie dem NMDA-Antagonisten MK-801 oder dem AMPA-Antagonisten Topiramat führten zwar nur zu einem geringen antikonvulsiven Effekt, jedoch entwickelten im Verlauf signifikant weniger Tiere eine chronische Epilepsie (Prasad, 2002, Suchomelova, 2006). In einem postischämischen Modell (siehe 1.4.1) konnte bei einer milden Hypothermie von 33-34°C mikrodialytisch eine reduzierte extrazelluläre Konzentration (Winfrey, 1996) bzw. Freisetzung (Van Hemelrijck et al., 2003) von Glutamat nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse wurden weiter gestützt durch ein Modell, in welchem Rezeptoren in hippocampalen exzitatorischen Synapsen aktiviert wurden. Damit konnte eine Temperaturabhängigkeit der Diffusion von Glutamat in den synaptischen Spalt nachgewiesen werden. Bei 25°C war sowohl für NMDA- als

auch Glutamat-Rezeptoren eine deutlich reduzierte Affinität und Sensitivität von Glutamat zu beobachten (Boucher et al., 2010). Die Hinweise scheinen sich zu verstärken, dass, zumindest in temporo-mesialen Strukturen NMDA-Rezeptor-vermittelte Modifikationen von neuronalen Netzwerken zu dem pathophysiologischen Prozess der Epileptogenese beitragen (McNamara et al., 2006). Die Blockade von NMDA-Rezeptoren mit MK-801 führte zu einem verminderten Aussprossen von Moosfasen nach wiederholt induzierten Anfällen (Sutula et al., 1996). Da das Aussprossen von Moosfasern ein regelmäßig beobachteter Mechanismus im Rahmen der Umbauprozesse der hippocampalen Epileptogenese ist, könnte die reduzierte Funktion von NMDA-Rezeptoren unter Hypothermie ein Erklärungsansatz für eine Beeinflussung der Epileptogenese unter Hypothermie sein (Houser et al., 1990). Zusammengefasst ist die genaue Relevanz der Moosfaserausprossung im Prozess der Epileptogenese noch nicht abschließend geklärt (siehe auch Absatz 1.3). Die hier beschriebenen antiglutamatergen Effekte der Hypothermie könnten Erklärungen für eine mögliche Prävention des GABAergen Inhibitionsverlustes nach SSSE sein. Eine Abschwächung des transienten Zusammenbruchs der Inhibition im Gyrus dentatus nach SSSE könnte ein möglicher antiepileptogener Effekt der früh eingesetzten Hypothermie sein. Die in der hier vorgestellten Studie gefundenen indirekten Hinweise auf eine reduzierte Exzitabilität und verminderten Inhibitionsverlust im Gyrus dentatus nach SSSE könnten auf Mechanismen hinweisen, die frühzeitig in die Prozesse der Epileptogenese eingreifen. Allerdings zeigen die hier dargestellten Daten, dass Kühlung allein nicht ausreicht, um die Epileptogenese zu verhindern oder abzuschwächen. Dies könnte die Hypothese unterstützen, dass vermutlich mehrere unabhängige Faktoren eine Rolle in diesem Prozess spielen (Trinka und Brigo, 2014).

4.5 Limitationen

Eine Limitation unserer Studie ist – wie in vielen tierexperimentellen Studien – die geringe Anzahl von Tieren in allen drei Gruppen. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass die anfänglich signifikant geringere Schwere des Anfalls bei gekühlten Tieren nach Korrektur für Mehrfachmessungen nicht mehr signifikant war. Eine erkennbar größere Anzahl an Tieren hätte aber bei diesem komplexen, sich über 2-3 Monate erstreckenden Studiendesign den Rahmen des Möglichen gesprengt.

Das aus technischen Gründen in unserer Studie nur bei der Hälfte der Tiere durchgeführte EEG, welches als Goldstandard für die Detektion von Anfällen gilt, zeigte sich im direkten methodischen Vergleich mit dem reinen Video-Monitoring nur gering überlegen. Nur ein Tier aus der 37°C-Gruppe war mittels Video nicht als epileptisch identifiziert worden (s.o.). Dieses Ergebnis muss vor dem Hintergrund diskutiert werden, dass es auf Grund unseres technischen Aufbaus nur möglich war, im Video generalisierte Anfälle der Stärke 3-5 nach Racine zu erkennen. Prinzipiell war die Auswertung mittels Video in dieser Studie dadurch eingeschränkt, dass die Tiere nur von oben zu sehen waren, wodurch Anfälle der Racine-Stärke 1-2 nicht erkennbar waren (siehe Absatz 2.7). Um dies methodisch sauber abzugrenzen, erfolgte die Auswertung der Video- und EEG- Aufzeichnungen sukzessive. In einem ersten Schritt wurden alle Videos ohne Kenntnis der im EEG aufgezeichneten Anfälle komplett ausgewertet. Erst nach Auswertung der EEGs erfolgte dann die Korrelation zwischen Video und EEG. Von den 70 aufgezeichneten 48-Stunden-Epochen lag bei 54,3 % nur die Video-Aufzeichnung ohne EEG vor. Bei den Epochen mit Video- und EEG-Aufzeichnung konnten 69,4% der im EEG detektierten Anfälle auch im Video gesehen werden. Somit ist die Methode der Video-Überwachung dem Video-EEG zwar unterlegen, da ein knappes Drittel der Anfälle in den Epochen mit Video-Überwachung unentdeckt blieb. Trotzdem stellt sie eine verlässliche Methode zur Anfallsdetektion dar.

Eine histologische Auswertung hätte erlaubt, neuronale Zellschäden nach SE und Hypothermie zu untersuchen. Atkins et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass nach Hypothermie der durch Trauma verursachte neuronale Zelltod nicht geringer war als bei den nicht gekühlten Tieren. Jedoch war das Ausmaß der Aussprossung von Moosfasern, die - wie bereits beschrieben (siehe 1.3) - während der Epileptogenese auftritt und zu einer erhöhten Exzitabilität führt, bei den gekühlten Tieren deutlich vermindert (Atkins et al., 2010).

4.6 Translation

Wie bereits kurz in der Einleitung angedeutet, stellt sich im Anschluss an Tierexperimente natürlich immer die Frage der Übertragbarkeit (Translation) auf die Anwendung beim Menschen. Eine Kühlung beim Menschen auf 25°C ist auf Grund des hohen Nebenwirkungspotentials bei Kühlung bereits unter 32°C nicht denkbar. Bei

Kühlung unter 30°C sind Koagulopathien, venöse Thrombosen und Herzrhythmusstörungen bis zu Kammerflimmern beschrieben (Benson et al., 1959; Corry et al., 2008). Bei milder Hypothermie sind vergleichbare unerwünschte Wirkungen nicht beschrieben. Wie in den Studien von Atkins et al. und D'Ambrosio et al. gezeigt werden konnte, hat die Hypothermie einen antiepileptogenen Effekt. Diese Ergebnisse könnten eine klinische Relevanz bekommen, da vor allem im intensivmedizinischen Bereich nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma oder großer intrazerebraler Blutung die Patienten oft sediert sind und damit eine kurzfristige Kühlung möglich wäre. Eine Kühlung der Körpertemperatur auf 32-35°C nach Reanimation bei Erwachsenen und hypoxischem Hirnschaden bei Säuglingen entwickelt sich aktuell zu einer gängigen Praxis und damit zu einem erprobten Therapieregime (Poldermann und Herold, 2009). Es erscheint inzwischen auch möglich, kleine Kühlelemente zu implantieren, die lokal eine kortikale Hypothermie herbeiführen können (Rothman, 2009; Fujii et al., 2012). Ort der Implantation, Größe des Implantats sowie Beginn und Dauer einer solchen Therapie sind aktuell jedoch noch nicht hinreichend untersucht (Motamedi et al., 2013).

4.7 Fazit

In dem hier dargestellten Tiermodell der Epileptogenese nach elektrisch induziertem SE konnten keine antiepileptogenen Effekte der Hypothermie gezeigt werden. Alle gekühlten Tiere entwickelten in den 8 Wochen nach SSSE spontane epileptische Anfälle. Der Trend zu weniger stark ausgeprägten Anfällen in der 25°C-Gruppe war nach Korrektur für Mehrfachvergleiche nicht mehr signifikant. Direkte Vergleiche von exzitatorischen und inhibitorischen elektrophysiologischen Parametern unter den gekühlten und nicht gekühlten Tieren post SSSE zeigten keine signifikanten Unterschiede. Mit einer größeren Anzahl von Tieren könnten möglicherweise in Zukunft antiepileptogene Effekte nach SSSE und Hypothermie gezeigt werden.

Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten von D'Ambrosio und Atkins et al. scheint die Ausprägung des antiepileptogenen Effekts der Hypothermie einerseits von der Dauer und Ort der Applikation und andererseits in Hinblick auf die hier dargestellten Daten vom auslösenden Schädigungsmechanismus abzuhängen (D'Ambrosio et al. 2013, Atkins et al., 2010). Um diese Daten jedoch auf die Klinik übertragen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Aihara H, Okada Y, Tamaki N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* 2001;893:36–45.
2. Alam HB, Rhee P, Honma K, et al. Does the rate of rewarming from profound hypothermic arrest influence the outcome in a swine model of lethal hemorrhage? *J Trauma* 2006;60:134–46.
3. Aminoff MJ, Simon RP. Status epilepticus. Causes, clinical features and consequences in 98 patients. *Am. J. Med.* 1980;69:657–66.
4. Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol. Scand.* 1971;76:4A-5A.
5. Andersen P, Eccles JC, Loyning Y. Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 1963;198:540–2.
6. Andersen P, Eccles JC, Loyning Y. Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.* 1964;27:592–607.
7. André V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2001;47:99–117.
8. Atkins CM, Truettner JS, Lotocki G, et al. Post-traumatic seizure susceptibility is attenuated by hypothermia therapy. *Eur. J. Neurosci.* 2010;32:1912–20.
9. Bähr M, Frotscher M. *Neurologisch-topische Diagnostik, Anatomie - Funktion – Klinik.* Thieme, 2009. ISBN: 3135358097.
10. Bekenstein JW, Lothman EW. Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 1993;259:97–100.
11. Benson DW, Williams GR, Spencer FC, Yates AJ. The use of hypothermia after cardiac arrest. *Anesth. Analg.*;38:423–8.
12. Bernard C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y. Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. *Epilepsy Res.* 1998;32:93–103.
13. Blume WT, Holloway GM, Wiebe S. Temporal epileptogenesis: localizing value of scalp and subdural interictal and ictal EEG data. *Epilepsia* 2001a;42:508–14.

14. Blume WT, Lüders HO, Mizrahi E, Tassinari C, van Emde Boas W, Engel J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 2001b;42:1212–8.
15. Boucher J, Kröger H, Sík A. Realistic modelling of receptor activation in hippocampal excitatory synapses: analysis of multivesicular release, release location, temperature and synaptic cross-talk. *Brain Struct Funct* 2010;215:49–65.
16. Bramlett HM, Dietrich WD, Green EJ, Busto R. Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia. *Acta Neuropathol.* 1997;93:190–9.
17. Brandt C, Gastens AM, Sun Mz, Hausknecht M, Löscher W. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology* 2006;51:789–804.
18. Brandt C, Potschka H, Löscher W, Ebert U. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2003;118:727–40.
19. Buckmaster PS. Laboratory animal models of temporal lobe epilepsy. *Comp. Med.* 2004;54:473–85.
20. Buckmaster PS, Dudek FE. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. *J. Neurophysiol.* 1999;81:712–21.
21. Buzsáki G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 1984;22:131–53.
22. Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal Salle G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982;53:581–9.
23. Cavazos JE, Zhang P, Qazi R, Sutula TP. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J. Comp. Neurol.* 2003;458:272–92.
24. Corry JJ, Dhar R, Murphy T, Diringner MN. Hypothermia for refractory status epilepticus. *Neurocrit Care* 2008;9:189–97.
25. D'Ambrosio R, Eastman CL, Darvas F, et al. Mild passive focal cooling prevents epileptic seizures after head injury in rats. *Ann. Neurol.* 2013;73:199–209.

26. Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* 2001;63:313–9.
27. Dudek FE, Obenaus A, Schweitzer JS, Wuarin JP. Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells associated with mossy fiber sprouting. *Hippocampus* 1994;4:259–65.
28. Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42:796–803.
29. Eriksson K, Metsäranta P, Huhtala H, Auvinen A, Kuusela A, Koivikko M. Treatment delay and the risk of prolonged status epilepticus. *Neurology* 2005;65:1316–8.
30. Ferriero DM. Protecting neurons. *Epilepsia* 2005;46 Suppl 7:45–51.
31. Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996;6:347–470.
32. Fujii M, Inoue T, Nomura S, et al. Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurologic functions. *Epilepsia* 2012;53:485–93.
33. Garga N, Lowenstein DH. Posttraumatic epilepsy: a major problem in desperate need of major advances. *Epilepsy Curr* 2006;6:1–5.
34. Grady MS, Charleston JS, Maris D, Witgen BM, Lifshitz J. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *J. Neurotrauma* 2003;20:929–41.
35. Guilliams K, Rosen M, Buttram S, et al. Hypothermia for pediatric refractory status epilepticus. *Epilepsia* 2013;54:1586–94.
36. Hainsworth FR. Saliva spreading, activity, and body temperature regulation in the rat. *Am. J. Physiol.* 1967;212:1288–92.
37. Halonen T, Nissinen J, Pitkänen A. Effect of lamotrigine treatment on status epilepticus-induced neuronal damage and memory impairment in rat. *Epilepsy Res.* 2001;46:205–23.
38. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia.* 1991;32:429–45.
39. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia.* 1993;34:453–68.

40. Heinemann U, Beck H, Dreier JP, Ficker E, Stabel J, Zhang CL. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res. Suppl.* 1992;7:273–80.
41. Hellier JL, Patrylo PR, Buckmaster PS, Dudek FE. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998;31:73–84.
42. Helmstaedter C, Kockelmann E. Cognitive outcomes in patients with chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2006;47 Suppl 2:96–8.
43. Herman ST. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* 2002;59:S21-6.
44. Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann. Neurol.* 1998;44:908–12.
45. Heng K, Haney MM, Buckmaster PS. High-dose rapamycin blocks mossy fiber sprouting in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.*2013;54(9): 1535-1541.
46. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 2007;68:326–37.
47. Holmes GL, Thompson JL, Marchi TA, et al. Effects of seizures on learning, memory, and behavior in the genetically epilepsy-prone rat. *Ann. Neurol.* 1990;27:24–32.
48. Holtkamp M, Matzen J, van Landeghem F, Buchheim K, Meierkord H. Transient loss of inhibition precedes spontaneous seizures after experimental status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2005a;19:162–70.
49. Holtkamp M, Meierkord H. Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64:2023–41.
50. Holtkamp M, Othman J, Buchheim K, Meierkord H. Predictors and prognosis of refractory status epilepticus treated in a neurological intensive care unit. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2005b;76:534–9.
51. Holtkamp M, Schmitt FC, Buchheim K, Meierkord H. Temperature regulation is compromised in experimental limbic status epilepticus. *Brain Res.* 2007;1127:76–9.

52. Hort J, Brožek G, Mares P, Langmeier M, Komárek V. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1999;40:1177–83.
53. Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J. Neurosci.* 1990;10:267–82. eng.
54. International League Against Epilepsy, Commission on Epidemiology and Prognosis. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia* 1993;34:592–6.
55. Ivens S, Kaufer D, Flores LP, et al. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007;130:535–47.
56. Jenssen S, Gracely EJ, Sperling MR. How long do most seizures last? A systematic comparison of seizures recorded in the epilepsy monitoring unit. *Epilepsia* 2006;47:1499–503.
57. Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Li Y, Gage FH. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J. Neurosci.* 2007;27:9400–7.
58. Karhunen H, Jolkkonen J, Sivenius J, Pitkänen A. Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* 2005;30:1529–42.
59. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intras ischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14:620–7.
60. Karkar KM, Garcia PA, Bateman LM, Smyth MD, Barbaro NM, Berger M. Focal cooling suppresses spontaneous epileptiform activity without changing the cortical motor threshold. *Epilepsia* 2002;43:932–5.
61. Kharatishvili I, Nissinen JP, McIntosh TK, Pitkänen A. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience* 2006;140:685–97.
62. Klein P, Herr D, Pearl PL, et al. Results of phase 2 safety and feasibility study of treatment with levetiracetam for prevention of posttraumatic epilepsy. *Arch. Neurol.* 2012;69:1290–5.

63. Klitgaard H, Matagne A., Vamneste-Goemaere J, Margineanu DG. Effects of prolonged administration of levetiracetam on pilocarpine-induced epileptogenesis in rats. *Epilepsia* 2001;42 Suppl. 7:114–5.
64. Kobow K, Auvin S, Jensen F, et al. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia* 2012;53:1868–76. (doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03716.x).
65. Kowski AB, Kanaan H, Schmitt FC, Holtkamp M. Deep hypothermia terminates status epilepticus--an experimental study. *Brain Res.* 2012;1446:119–26.
66. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010;51:1069–77.
67. Lamy C, Domigo V, Semah F, et al. Early and late seizures after cryptogenic ischemic stroke in young adults. *Neurology* 2003;60:400–4.
68. Licko T, Seeger N, Zellinger C, Russmann V, Matagne A, Potschka H. Lacosamide treatment following status epilepticus attenuates neuronal cell loss and alterations in hippocampal neurogenesis in a rat electrical status epilepticus model. *Epilepsia* 2013;54:1176–85.
69. Liu Z, Gatt A, Mikati M, Holmes GL. Effect of temperature on kainic acid-induced seizures. *Brain Res.* 1993;631:51–8.
70. Löscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* 2010;62:668–700.
71. Lothman EW. Seizure circuits in the hippocampus and associated structures. *Hippocampus* 1994;4:286–90.
72. Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL. It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* 1999;40:120–2.
73. Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J. Neurosci.* 1992;12:4846–53.
74. Lukoyanov NV, Sá MJ, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Selective loss of hilar neurons and impairment of initial learning in rats after repeated administration of electroconvulsive shock seizures. *Exp Brain Res* 2004;154:192–200.

75. Lundgren J, Smith ML, Blennow G, Siesjö BK. Hyperthermia aggravates and hypothermia ameliorates epileptic brain damage. *Exp Brain Res* 1994;99:43–55.
76. Maeda T, Hashizume K, Tanaka T. Effect of hypothermia on kainic acid-induced limbic seizures: an electroencephalographic and ¹⁴C-deoxyglucose autoradiographic study. *Brain Res.* 1999;818:228–35.
77. Maier CM, Ahern Kv, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 1998;29:2171–80.
78. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 2002;11:28–42.
79. Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* 1989;36:106–12.
80. Manford M, Hart YM, Sander JW, Shorvon SD. National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population. *Neurology* 1992;42:1911–7.
81. Maxwell WL, Watson A, Queen R, et al. Slow, medium, or fast re-warming following post-traumatic hypothermia therapy? An ultrastructural perspective. *J. Neurotrauma* 2005;22:873–84. (doi:10.1089/neu.2005.22.873).
82. Mazarati AM, Wasterlain CG. Blockers of NMDA receptor restore paired-pulse inhibition in the rat dentate gyrus lesioned by perforant path stimulation. *Neurosci. Lett.* 1997;234:135–8.
83. McCormick DA. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 1989;62:1018–27.
84. McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci. STKE* 2006;2006:re12.
85. Meerlo P, Boer SF de, Koolhaas JM, Daan S, van den Hoofdakker RH. Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiol. Behav.*;59:735–9.
86. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog. Neurobiol.* 2004;73:1–60.

87. Motamedi GK, Lesser RP, Vicini S. Therapeutic brain hypothermia, its mechanisms of action, and its prospects as a treatment for epilepsy. *Epilepsia* 2013;54:959–70.
88. Naylor DE, Liu H, Niquet J, Wasterlain CG. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2013;54:225–38.
89. Neligan A, Shorvon SD. Frequency and prognosis of convulsive status epilepticus of different causes: a systematic review. *Arch. Neurol.* 2010;67:931–40.
90. Olafsson E, Ludvigsson P, Gudmundsson G, Hesdorffer D, Kjartansson O, Hauser WA. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *Lancet Neurol* 2005;4:627–34.
91. Orłowski JP, Erenberg G, Lueders H, Cruse RP. Hypothermia and barbiturate coma for refractory status epilepticus. *Crit. Care Med.* 1984;12:367–72.
92. Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J. Neurosci.* 1999;19:4508–19.
93. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 1997;17:3727–38.
94. Paxinos, G; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Elsevier Science & Technology. 1998.
95. Pitkänen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology* 2002;59:S27-33.
96. Pitkänen A, Kharatishvili I, Narkilahti S, Lukasiuk K, Nissinen J. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. *Epilepsy Res.* 2005;63:27–42.
97. Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 2011;10:173–86.
98. Pitkänen A, McIntosh TK. Animal models of post-traumatic epilepsy. *J. Neurotrauma* 2006;23:241–61.

99. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet* 2008;371:1955–69.
100. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit. Care Med.* 2009;37:1101–20.
101. Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 2001;293:1159–63.
102. Prasad A, Williamson JM, Bertram EH. Phenobarbital and MK-801, but not phenytoin, improve the long-term outcome of status epilepticus. *Ann. Neurol.* 2002;51:175–81.
103. Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS, Shetty AK. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 2006;83:1088–105.
104. Rigoulot M, Leroy C, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A. Prolonged low-dose caffeine exposure protects against hippocampal damage but not against the occurrence of epilepsy in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 2003;44:529–35.
105. Roberts E. Gamma-aminobutyric acid and nervous system function--a perspective. *Biochem. Pharmacol.* 1974;23:2637–49.
106. Rothman SM. The therapeutic potential of focal cooling for neocortical epilepsy. *Neurotherapeutics* 2009;6:251–7.
107. Schaller B, Graf R. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology* 2003;10:7–35.
108. Scharfman HE. Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *J. Neurophysiol.* 1995;74:179–94.
109. Scharfman HE, Schwartzkroin PA. Responses of cells of the rat fascia dentata to prolonged stimulation of the perforant path: sensitivity of hilar cells and changes in granule cell excitability. *Neuroscience* 1990;35:491–504.
110. Schiff SJ, Somjen GG. The effects of temperature on synaptic transmission in hippocampal tissue slices. *Brain Res.* 1985;345:279–84.
111. Schmitt FC, Buchheim K, Meierkord H, Holtkamp M. Anticonvulsant properties of hypothermia in experimental status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2006;23:689–96.

112. Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, et al. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2004;24:7829–36.
113. Shapiro LA, Figueroa-Aragon S, Ribak CE. Newly generated granule cells show rapid neuroplastic changes in the adult rat dentate gyrus during the first five days following pilocarpine-induced seizures. *Eur. J. Neurosci.* 2007;26:583–92.
114. Shen KF, Schwartzkroin PA. Effects of temperature alterations on population and cellular activities in hippocampal slices from mature and immature rabbit. *Brain Res.* 1988;475:305–16.
115. Shetty AK, Zaman V, Hattiangady B. Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2005;25:8391–401.
116. Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1991;1:41–66.
117. Sloviter RS. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci. Lett.* 1992;137:91–6.
118. Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Frotscher M. Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyper-inhibition in chronically epileptic rats. *J. Comp. Neurol.* 2006;494:944–60.
119. Spruston N, Johnston D. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 1992;67:508–29.
120. Stefan H, Feichtinger M, Black A. Autonomic phenomena of temperature regulation in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2003;4:65–9.
121. Suchomelova L, Baldwin RA, Kubova H, Thompson KW, Sankar R, Wasterlain CG. Treatment of experimental status epilepticus in immature rats: dissociation between anticonvulsant and antiepileptogenic effects. *Pediatr. Res.* 2006;59:237–43.
122. Sunderam S, Osorio I. Mesial temporal lobe seizures may activate thermoregulatory mechanisms in humans: an infrared study of facial temperature. *Epilepsy Behav* 2003;4:399–406.

123. Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1988;239:1147–50.
124. Sutula T, Koch J, Golarai G, Watanabe Y, McNamara JO. NMDA receptor dependence of kindling and mossy fiber sprouting: evidence that the NMDA receptor regulates patterning of hippocampal circuits in the adult brain. *J. Neurosci.* 1996;16:7398–406.
125. Swartz BE, Houser CR, Tomiyasu U, et al. Hippocampal cell loss in posttraumatic human epilepsy. *Epilepsia* 2006;47:1373–82.
126. Temkin NR. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 2009;50 Suppl 2:10–3.
127. Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Ann. Neurol.* 2010;68:424–34.
128. Thompson SM, Masukawa LM, Prince DA. Temperature dependence of intrinsic membrane properties and synaptic potentials in hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurosci.* 1985;5:817–24. eng.
129. Trepel M. *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, 2003. ISBN: 3437412973.
130. Trinka E, Brigo F. Antiepileptogenesis in humans: disappointing clinical evidence and ways to move forward. *Curr. Opin. Neurol.* 2014;27:227–35.
131. Urrea C, Castellanos DA, Sagen J, Tsoufas P, Bramlett HM, Dietrich WD. Widespread cellular proliferation and focal neurogenesis after traumatic brain injury in the rat. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2007;25:65–76.
132. van Hemelrijck A, Vermijlen D, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Effect of resuscitative mild hypothermia on glutamate and dopamine release, apoptosis and ischaemic brain damage in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischaemia. *J. Neurochem.* 2003;87:66–75.
133. van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007;130:521–34.
134. Volgushev M, Kudryashov I, Chistiakova M, Mukovski M, Niesmann J, Eysel UT. Probability of transmitter release at neocortical synapses at different temperatures. *J. Neurophysiol.* 2004;92:212–20.

135. Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, Eysel UT. Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience* 2000;98:9–22.
136. Waldbaum S, Dudek FE. Single and repetitive paired-pulse suppression: a parametric analysis and assessment of usefulness in epilepsy research. *Epilepsia* 2009;50:904–16.
137. Walker MC, Perry H, Scaravilli F, Patsalos PN, Shorvon SD, Jefferys JG. Halothane as a neuroprotectant during constant stimulation of the perforant path. *Epilepsia* 1999;40:359–64.
138. Wang Y, Liu P, Li L, Zhang H, Li T. Hypothermia reduces brain edema, spontaneous recurrent seizure attack, and learning memory deficits in the kainic acid treated rats. *CNS Neurosci Ther* 2011;17:271–80.
139. Wiebe S. Effectiveness and safety of epilepsy surgery: what is the evidence? *CNS Spectr* 2004;9:120-2, 126-32.
140. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:311–8.
141. Winfree CJ, Baker CJ, Connolly ES, Fiore AJ, Solomon RA. Mild hypothermia reduces penumbral glutamate levels in the rat permanent focal cerebral ischemia model. *Neurosurgery* 1996;38:1216–22.
142. Working Group on Status Epilepticus. Treatment of convulsive status epilepticus. Recommendations of the Epilepsy Foundation of America's Working Group on Status Epilepticus. *JAMA* 1993;270:854–9.
143. Yang X, Ouyang Y, Kennedy BR, Rothman SM. Cooling blocks rat hippocampal neurotransmission by a presynaptic mechanism: observations using 2-photon microscopy. *J. Physiol. (Lond.)* 2005;567:215–24.
144. Zarrelli MM, Beghi E, Rocca WA, Hauser WA. Incidence of epileptic syndromes in Rochester, Minnesota: 1980-1984. *Epilepsia* 1999;40:1708–14.
145. Zhang X, Cui S, Wallace AE, et al. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2002;22:6052–61.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lara Mirja Steinbrenner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Antiepileptogenese nach experimentellem Status epilepticus: Evaluation der Hypothermie selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lara Mirja Steinbrenner hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Steinbrenner, M; Kowski, AB; Schmitt, FS; Holtkamp M. Hypothermia did not prevent epilepsy following experimental status epilepticus, Brain Research, 2014.

Beitrag im Einzelnen: Aufbau des Versuchstandes, Planung der Tierexperimente, Durchführung der Tierexperimente, Datenerhebung und –aufarbeitung, statistische Auswertung, Schreiben der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Steinbrenner, M; Kowski, AB, Schmitt, FS; Holtkamp M, Hypothermia did not prevent epilepsy following experimental status epilepticus, Brain Res, 2014 Jul 14;1572:50-8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich auf dem Weg bis zum Abschluss meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Holtkamp für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Überlassung des Themas und für die immer wieder erwiesene Geduld und Beistand mit Rat und Tat vor Allem auch in frustrierenden Phasen der experimentellen Arbeit.

Herrn Dr. Alexander Kowski danke ich für seine Kreativität bei der Lösung technischer Probleme im Versuchsaufbau. Ohne den regelmäßigen Austausch auch mal über nicht arbeitsrelevante Themen und die ständige Unterstützung bei den alltäglichen Irren und Wirren der Laborarbeit hätte ich diese Arbeit wohl nicht geschafft abzuschließen.

Ich möchte mich aber auch insgesamt bei meiner Arbeitsgruppe für die anhaltende Unterstützung und konstruktive Kritik bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Florian Weissinger.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Hans-Jürgen Gabriel und Herrn Herbert Siegmund aus dem Institut für Neurophysiologie für die Hilfe bei technischen Problemen und Fragestellungen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Geduld und immer wieder aufmunternde Worte.

Im Einzelnen möchte ich mich bei Ernst Jarasch für das mehrfache gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen Anmerkungen und Anregungen bedanken. Meinem Freund Tillman Hielscher danke ich für die Unterstützung beim Erstellen von Abbildungen. Rosa Grützmann und Judith Peth möchte ich für die Beratung zu statistischen Fragen danken.

Im Speziellen möchte ich meinem Mann danken für die tatkräftige Unterstützung bei technischen und mathematischen Fragen und dafür immer da gewesen zu sein und somit sowohl die Höhen als auch Tiefen mit mir geteilt zu haben.