

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Beitrag ATP-abhängiger Transportproteine zur  
Pharmakoresistenz von Patienten mit mesialer  
Temporallappenepilepsie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simon Kim

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016



Meinen Eltern

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. EPILEPSIE .....	1
1.2. HIPPOCAMPUS .....	2
1.3. ANTIKONVULSIVE PHARMAKOTHERAPIE .....	5
1.4. PHARMAKORESISTENZ .....	6
<b>2. FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>11</b>
<b>3. METHODEN</b> .....	<b>13</b>
3.1. KLINISCHE VORBEREITUNG .....	13
3.2. NEUROPATHOLOGISCHE DIAGNOSTIK .....	14
3.3. GEWEBETRANSPORT, -PRÄPARATION UND -ERHALTUNG .....	16
3.4. ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNG UND STIMULATION .....	17
3.5. EXPERIMENTELLE PROTOKOLLE .....	19
3.6. PROTOKOLL-PERIODEN (A-G) .....	19
3.7. DATENANALYSE .....	21
3.8. KLASSIFIZIERUNG DER EPILEPTIFORMEN AKTIVITÄT .....	21
3.9. BESTIMMUNG UND NORMALISIERUNG DER AKTIVITÄTSPARAMETER .....	22
3.10. STATISTIK .....	23

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
4.1.	ÜBERPRÜFUNG DER VITALITÄT DES RESEZIERTEN HIRNGEWEBES .....	24
4.2.	INDUKTION EPILEPTIFORMER AKTIVITÄT IM SUBICULUM UND GYRUS DENTATUS ..	26
4.3.	WELCHEN EINFLUSS HABEN PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DES HIPPOCAMPUS AUF DIE INDUZIERTE AKTIVITÄT? .....	30
4.4.	TRETEN BEI EINEM PATIENTEN MIT MEHREREN UNTERSUCHTEN GEHIRNSCHNITTEN VERSCHIEDENE AKTIVITÄTSARTEN AUF? .....	32
4.5.	SUBICULUM .....	34
4.6.	GYRUS DENTATUS.....	45
4.7.	HETEROGENE EFFEKTE VON AED + MDTI AUF SLE BEI GEHIRNSCHNITTEN VOM SELBEN PATIENTEN.....	54
4.8.	WELCHE FAKTOREN WAREN ASSOZIIERT MIT EINER HETEROGENEN WIRKUNG? ..	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>59</b>
5.1.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	59
5.2.	INDUKTION EPILEPTIFORMER AKTIVITÄT IM SUBICULUM.....	63
5.3.	INDUKTION IM GYRUS DENTATUS IM VERGLEICH ZU DEN VORSTUDIEN .....	64
5.4.	CHARAKTERISIERUNG DER EPILEPTIFORMEN AKTIVITÄT.....	64
5.5.	EINFLUSS DER GEWEBEPATHOLOGIE AUF DIE INDUKTION .....	67
5.6.	EINFLUSS DER ANTIKONVULSIVA VALPROAT, CARBAMAZEPIN UND PHENYTOIN AUF DIE EPILEPTIFORME AKTIVITÄT .....	67
5.7.	EINFLUSS DER MULTIDRUG-TRANSPORTER-INHIBITOREN VERAPAMIL UND PROBENECID AUF DIE EPILEPTIFORME AKTIVITÄT .....	69
5.8.	BEITRAG DER MULTIDRUG-TRANSPORTER ZUR PHARMAKORESISTENZ .....	70
5.9.	UNTERSUCHUNG DER PATIENTENMERKMALE .....	72

5.10. HETEROGENE EFFEKTE BEI GEHIRNSCHNITTEN EINES PATIENTEN .....	72
5.11. LIMITATION DIESER UNTERSUCHUNG .....	73
5.12. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	74
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>85</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE.....</b>	<b>87</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>89</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>91</b>

## Zusammenfassung

Viele Patienten mit fokaler Temporallappenepilepsie zeigen trotz medikamentöser Therapie epileptische Anfälle. Nach epilepsiechirurgischer Resektion des erkrankten Hirngewebes (Fokus) sind die meisten Patienten unter Fortführung der antikonvulsiven Therapie anfallsfrei. Deshalb wird der Mechanismus für die Pharmakoresistenz in dem entfernten Gehirngewebe vermutet. Eine ektope Expression bzw. Überexpression von Transportproteinen an Neuronen und Gliazellen kann neben einer Veränderung von Zielmolekülen der Antikonvulsiva die Ursache sein.

In dieser Studie sollte der Beitrag ATP-abhängiger Transportproteine zur Pharmakoresistenz im resezierten Gewebe von Patienten mit Temporallappenepilepsie bestimmt werden.

Die Messungen wurden im Subiculum und Gyrus dentatus akuter Hirnschnitte des Hippocampus (aus Teilresektaten operierter Patienten mit Temporallappenepilepsie) durchgeführt. Nach Prüfung der Vitalität des Gewebes wurde durch Einwaschen einer Hoch-Kalium-ACSF (Artificial cerebrospinal fluid)-Lösung epileptiforme Aktivität induziert. Im Gyrus dentatus war eine zusätzliche repetitive Moosfaser-Stimulation erforderlich. Danach erfolgte in beiden Regionen eine Testung der Wirkung eines der drei Antikonvulsiva Carbamazepin, Valproat und Phenytoin oder der Transportprotein-Inhibitoren Verapamil und Probenecid (Blocker von P-glycoprotein und Multidrug resistance-associated protein). Bei anhaltender epileptiformer Aktivität erfolgte eine Koapplikation der entsprechenden Antikonvulsiva und Transportprotein-Inhibitoren. Ließ sich die Aktivität nicht unterdrücken, wurden Aktivitätsparameter (Inzidenz, Dauer, Amplituden und Frequenzen der langsamen und schnellen Potentialschwankungen) auf eine modulierende Wirkung der Pharmaka untersucht. Die Effekte wurden mit Patienten- und Expressionsdaten verglichen.

Durch das experimentelle Protokoll konnte pharmakoresistente epileptiforme Aktivität in Subiculum und Gyrus dentatus induziert werden. Bei der kombinierten Gabe eines

Antikonvulsivums mit einem Transportprotein-Inhibitor zeigte sich nur in einem geringen Anteil der Schnitte eine vollständige Suppression der Aktivität. Bei der Untersuchung der Aktivitätsparameter zeigte sich eine signifikante Modulation durch die kombinierte Gabe. Die Untersuchung der Patientendaten und der Expression zeigten keine besonderen Merkmale der Patienten, in deren Gehirnschnitten die Pharmakoresistenz aufgehoben wurde. Bei der Betrachtung der Patienten, von denen mehr als ein Gehirnschnitt untersucht werden konnte, ließ sich eine Gruppe mit homogenen Wirkungen und eine Gruppe mit heterogenen Wirkungen unterscheiden. Von diesen war die letztere zum Zeitpunkt der Operation jünger.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Transportproteine zur Pharmakoresistenz induzierter epileptiformer Aktivität im resezierten Gewebe nur in einzelnen Fällen beitragen. Diese Patienten lassen sich anhand der hier erfassten Patienteninformationen und der Expressionsdaten nicht näher klassifizieren. Bei einzelnen Patienten zeigten die untersuchten Schnitte ein unterschiedliches Ansprechen auf die Medikamente, so dass die Faktoren der Pharmakoresistenz vermutlich unterschiedlich im Gewebe verteilt sind.



## **Abstract**

Many patients with focal temporal lobe epilepsy show epileptic seizures despite of medical treatment. After epilepsy surgical resection of the pathologic brain tissue (focus) most patients are seizure free if the anticonvulsant treatment is continued. Therefore, the mechanism for pharmacoresistance is believed to be located in the resected tissue. Ectopic expression or overexpression of transporter proteins on neurons and glia cells can be the cause in addition to changes of the target molecules of anticonvulsants.

In this study, we wanted to determine the relevance of ATP-dependant transporter proteins in resected tissue of patients with temporal lobe epilepsy.

Measurements were performed in the Subiculum and Dentate gyrus of acute hippocampal slices from resected specimen of operated patients with temporal lobe epilepsy. After testing the vitality of the tissue, epileptiform activity was induced by the application of a high-potassium ACSF (Artificial cerebrospinal fluid)-solution. In the dentate gyrus, repetitive mossy fiber stimulation was additionally required.

We tested then in both regions the effect of one of the three anticonvulsants Carbamazepine, Valproate, Phenytoin or of the transporter protein inhibitors Verapamil and Probenecid (blockers of P-glycoprotein and Multidrug resistance-associated protein). In cases of sustained epileptiform activity, the anticonvulsant and transporter protein inhibitor were coapplied. If the activity could not be suppressed, activity parameters (incidence, duration amplitudes and frequencies of the slow and fast potential shifts) were examined for a modulation effect of the drugs. The effects were compared with patient and expression data.

By using the experimental protocol, pharmacoresistant epileptiform activity could be induced in Subiculum and Dentate gyrus. When the anticonvulsant and transporter protein inhibitor were combined, only few slices showed a full suppression of the activity. In the analysis of the activity parameters, a significant modulation by the

combined application could be seen. The assessment of patient data and protein expression showed no specific features of patients of whom the brain slices showed a reversal of the pharmacoresistance. Regarding the patients of whom more than one slice was examined, we could distinguish a group with homogeneous and another group with heterogeneous effects. The latter of those was younger at the moment of operation.

The results of this study show that transporter proteins contribute to pharmacoresistance only in single cases. Those patients could not be further determined by the patient information and expression data that were included. Some patients showed a diverse response to the drugs which might be due to a varying distribution of the mechanisms of pharmacoresistance in the tissue.

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 humaner Hippocampusschnitt und Positionierung der Elektroden im Hippocampus

Abbildung 2 Vergleich reizevozierter Feldpotentiale zu Beginn und Ende des Experiments

Abbildung 3 Induktion epileptiformer Aktivität im Subiculum.

Abbildung 4 Induktion epileptiformer Aktivität im Gyrus dentatus.

Abbildung 5 Relative und absolute Häufigkeiten der induzierten Aktivitätsarten

Abbildung 6 Wyler-Grad im Hippocampus-Schnitt und induzierte Aktivitätsart im Subiculum

Abbildung 7 Wyler-Grad und induzierte Aktivitätsart im Gyrus dentatus

Abbildung 8 Übersicht über die induzierte Aktivität im Subiculum

Abbildung 9 Übersicht über die induzierte Aktivität im Gyrus dentatus

Abbildung 10 Qualitative Effekte von AED auf epileptiforme Aktivität im Subiculum

Abbildung 11 Wirkungen von AED auf SLE im Subiculum

Abbildung 12 Vergleich der verbleibenden Parameter im Vergleich zur Kontrolle nach Einwaschen der einzelnen AED im Subiculum

Abbildung 13 Wirkungen von AED + MDTI nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI im Subiculum

Abbildung 14 Effekte von AED + MDTI im Subiculum

Abbildung 15 Aktivitätsänderung von SLE durch AED + MDTI im Subiculum

Abbildung 16 Vergleich der verbleibenden Parameter im Bezug zur Kontrolle nach Präinkubation und Koapplikation im Subiculum

Abbildung 17 Qualitative Effekte von AED auf epileptiforme Aktivität im Gyrus dentatus

Abbildung 18 Effekte von AED im Gyrus dentatus

Abbildung 19 Vergleich der verbleibenden Parameter im Vergleich zur Kontrolle nach Einwaschen der einzelnen AED im Gyrus dentatus

Abbildung 20 Wirkungen von AED + MDTI im Gyrus dentatus nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI.

Abbildung 21 Suppression von SLE durch AED + MDTI im Gyrus dentatus

Abbildung 22 Vergleich der verbleibenden Parameter im Bezug zur Kontrolle nach Präinkubation und Koapplikation im Gyrus dentatus

Abbildung 23 Suppression von SLE nach Koapplikation von AED + MDTI im Gyrus dentatus

Abbildung 24 Heterogenität nach Präinkubation von AED oder MDTI

Abbildung 25 Suppression von SLE nach Koapplikation von AED + MDTI

Abbildung 26 Heterogene Wirkungen nach Koapplikation von AED + MDTI in Abhängigkeit von der untersuchten Region

Abbildung 27 Unterschiede zwischen Patienten mit homogener und heterogener Wirkung von AED + MDTI

## Abkürzungsverzeichnis

a peak	maximale Amplitude des epileptiformen Ereignisses
a sfp	langames Feldpotential des epileptiformen Ereignisses
ABC	ATP-binding cassette
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid (Künstliche Hirnflüssigkeit)
AED	Antiepileptic drug (Antikonvulsive Medikation)
AMP	Adenosinmonophosphat
av3	aus drei Aktivitätsparametern normalisierter Wert
av5	aus fünf Aktivitätsparametern normalisierter Wert
CA	Cornu ammonis des Hippocampus (Ammonshorn)
CBZ	Carbamazepin
dur	Dauer eines epileptiformen Ereignisses
GD	Gyrus dentatus
EEG	Elektroenzephalogramm
FK	Fieberkrämpfe
freq	Frequenz der transienten Potentialfluktuationen des epileptiformen Ereignisses
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GBT	Gabapentin
GMP	Guanosinmonophosphat
HS	hippocampale Sklerose
ILAE	International League against Epilepsy
[K <sup>+</sup> ]	Kaliumkonzentration
[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	extrazelluläre Kaliumkonzentration
K-ACSF	hoch-Kalium-ACSF
Kanstieg	Kaliumanstieg während des epileptiformen Ereignisses

Kfuß	Kaliumionen-Konzentration bei Beginn des epileptiformen Ereignisses
Kmax	maximale Kaliumkonzentration während des epileptiformen Ereignisses
LAC	Lacosamid
LEV	Levetiracetam
LTG	Lamotrigin
MDR	Multidrug-resistance-protein
MDT	Multidrug-Transporter
MDTI	Multidrug-Transporter-Inhibitor
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nHipp	an der oberen therapeutischen Serumkonzentration normierte Gewebekonzentration im Resektat
nSK	an der oberen therapeutischen Serumkonzentration normierte Serumkonzentration des AED zum Operations-Zeitpunkt
OAT	organische Anionen-Transporter
OXC	Oxcarbazepin
PBN	Probenecid
PGL	Pregabalin
PGP	P-glycoprotein
PHT	Phenytoin
PI	Präinkubation
SGS	secondarily generalized seizure (sekundär generalisierter Anfall)
SLE	seizure like event (krampfartige Aktivität)
TPM	Topiramate
VPA	Valproat
VPM	Verapamil
ZNS	Zonisamid

# 1. Einleitung

## 1.1. Epilepsie

Zur Definition einer Epilepsie nennt die International League against Epilepsy (ILAE) als Kriterien das Auftreten von mindestens einem epileptischen Anfall, eine fortdauernde Veränderung des Gehirns, die die Wahrscheinlichkeit für weitere Anfälle erhöht, und assoziierte neurobiologische, kognitive, psychologische oder soziale Einschränkungen [1].

Der epileptische Anfall ist definiert als „ein vorübergehendes Auftreten von Zeichen und/oder Symptomen aufgrund abnormer exzessiver oder synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn“ [1, 2]. Treten wiederholt und unprovokiert epileptische Anfälle auf, kann durch die Erhebung von weiteren Informationen, wie z. B. Patientenalter, EEG-Muster und Familienanamnese, das Krankheitsbild anhand des Algorithmus der ILAE einem epileptischen Syndrom zugeordnet werden. Die ILAE unterscheidet fokale Anfälle, deren Ursprung einer bestimmten Hirnregion zugeordnet werden kann, generalisierte Anfälle, die keinen umschriebenen Ursprungsort erkennen lassen, und nicht klassifizierbare Anfälle [3].

Wegen fortlaufender neuer Erkenntnisse in der Epilepsieforschung, die unter anderem die Ausbreitung epileptischer Aktivität, Prognose von epileptischen Syndromen und Identifikation von genetischen Faktoren betreffen, wurde durch die Terminologiekommission der ILAE eine zweckbestimmte Einteilung formuliert [2].

Bisher wurden die Ursachen, die zu einer erhöhten Krampfbereitschaft führen, als idiopathisch, symptomatisch und kryptogen bezeichnet. Die Terminologiekommission empfiehlt, folgende drei Gruppen zu unterscheiden.

1. Genetisch. Die Anfälle sind das Ergebnis von bekannten oder vermuteten genetischen Defekten
2. Strukturell/metabolisch. Von einem völlig anderen Zustand oder einer anderen Krankheit wurde ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Epilepsie nachgewiesen. Darunter zählen erworbene Erkrankungen wie Schlaganfälle,

Traumata und Infektionen oder genetisch bedingte Fehlbildungen, bei denen eine separate Erkrankung zwischen Gendefekt und Epilepsie vorliegt.

### 3. Unbekannte Ursache.

Ungeachtet der Ätiologie gehen die meisten fokalen Anfälle vom mesialen Temporallappen aus. Sie sind im EEG durch lateralisierte rhythmische Theta- oder Alpha-Aktivität charakterisiert. Zwischen den Anfällen lassen sich bei 80 % der Patienten interiktale epileptiforme Entladungsmuster aufzeichnen, die bei Lateralisation einen Hinweis auf die Lokalisation des Herdes liefern [4]. Intraoperative elektrokortikographische Ableitungen bei 39 Patienten haben gezeigt, dass interiktale Aktivität bei 87,9 % der Patienten wahrscheinlich ihren Ursprung im Hippocampus, den Gyri temporales superior et medius oder dem subtemporalen Cortex haben [5].

Die medikamentöse Therapie wird abhängig von vorhandenen Risikofaktoren für einen weiteren epileptischen Anfall als Monotherapie eingeleitet. Bei einem einmaligen, spontan aufgetretenen Anfall ist noch keine Indikation für eine Pharmakotherapie gegeben. Risikofaktoren für einen wiederholten Anfall sind ein anamnestischer Hirnschaden, eine mit bildgebenden Verfahren nachgewiesene strukturelle Veränderung des Gehirnparenchyms oder ein EEG mit pathologischen Entladungsmustern [6].

In einer Metaanalyse wurde eine mediane Inzidenz von 50,4/100.000 Personen/Jahr ermittelt [7]. Die Prävalenz wird populationsabhängig mit 3,4 - 10,8/1000 Einwohner angegeben [8, 9].

## **1.2. Hippocampus**

Die hippocampale Formation besteht aus Gyrus dentatus, dem Hilus, den Cornu ammonis-Regionen (CA) 1-3 und dem Subiculum. Der Informationsfluss folgt einer schleifenförmigen Verschaltung: Die Aktivität gelangt über den Tractus perforans des entorhinalen Cortex zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Von dort ziehen die Axone (Moosfasern) zu den hilären und CA 3-Pyramidenzellen. Deren Axone projizieren als Schaffer-Kollateralen in die CA 1-Region, von wo aus eine Verbindung



zum Subiculum besteht, welches in den Fornix, den entorhinalen Cortex und andere sub- und corticale Areale projiziert [10].

Die Bedeutung des Hippocampus für die Überführung von Informationen im Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis wurde bei Patienten mit bilateraler Entfernung des Hippocampus deutlich [11].

Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie leiden an einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses, die stärker ausgeprägt ist, wenn eine hippocampale Sklerose besteht. Diese findet sich bei fast 50 % der Patienten mit einem epileptogenen Fokus im Hippocampus [12, 13]. Bei ihnen ist die Epilepsie progredient, wobei der Mechanismus nicht geklärt ist. Unter anderem wird eine inflammatorische Hintergrundaktivität vermutet [14].

In Gewebe von Patienten mit Temporallappenepilepsie wurde eine metabolische Dysfunktion festgestellt, die als verminderte Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  messbar ist [15]. Durch die epileptische Aktivität kommt es schließlich zu einem Zelluntergang, der wahrscheinlich durch eine relative Hypoxie und Ischämie verursacht wird, die während des kurzfristig erhöhten Energiebedarfs auftritt [16].

Im humanen Hippocampus sind vor allem im Hilus und in der Region CA 1 vorkommende somatostatin-positive Neurone durch Ischämie oder Hyperexzitation verwundbar [17]. Es wurde gezeigt, dass Calcium während epileptiformer Aktivität nicht nur in das Zytoplasma, sondern auch in Mitochondrien gelangt [18]. Eine intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration schädigt Mitochondrien durch Aktivierung von degradierenden Enzymen wie Phospholipasen oder Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies erzeugen [19]. Ein weiterer Faktor ist die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore, die eine unspezifische Permeabilitätserhöhung der inneren Mitochondrienmembran zur Folge hat und in eine Schwellung und anschließende Ruptur mündet [20]. Lokale Zelluntergänge führen zu Reparaturvorgängen, die die Neigung zu Anfällen verstärken [21] und zu der Entwicklung eines epileptischen Syndroms führen können, da eine Veränderung der makroskopischen und mikroskopischen Gehirnstruktur und der Neuronenfunktion ein erhöhtes Risiko für eine Epilepsie mit sich bringt [22].

## **Subiculum**

Funktionell und strukturell steht das Subiculum zwischen Hippocampus (Archicortex) und Neocortex. Es besteht aus einer Molekularschicht, einer polymorphen Schicht und einer Pyramidenzellschicht. In allen drei Schichten finden sich GABAerge Interneurone [23].

Die Neurone sind im Gegensatz zu den anderen Regionen der hippocampalen Formation nicht lamellär, sondern weitreichend dreidimensional topographisch angelegt [24, 25]. Die Relevanz des Subiculus für die Gedächtnisbildung und räumliche Orientierung werden noch erforscht [26-28]. Neben den Afferenzen aus der CA 1-Region stammen weitere Afferenzen aus der Area entorhinalis, wobei durch die Verbindung mit dem entorhinalen Cortex auch eine Aufrechterhaltung kreisender Aktivität möglich wird [29, 30]. In verschiedenen Epilepsiemodellen der Ratte und im resezierten sklerotischen Hippocampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie findet sich eine axonale Sprossung von CA 1-Neuronen in das Subiculum und eine synaptische Reorganisation [10, 31, 32].

Weiterhin wird im Subiculum von Epilepsiepatienten die Genese von interiktalen Entladungen vermutet [33]. Im Subiculum von sklerotischem und nicht-sklerotischem Hippocampus konnten Zellen mit spontaner rhythmischer Aktivität gefunden werden [34].

Jedoch tritt eine ähnliche Aktivität im Subiculum der gesunden Maus auf, die sich als sharp-waves während des slow-wave Schlafs äußert und mit der Gedächtniskonsolidierung in Verbindung gebracht wird, also physiologisch ist [35].

## **Gyrus dentatus**

Der Gyrus dentatus ist dreischichtig aufgebaut mit einer Molekularschicht, dem Stratum granulare (Körnerzellband) und Hilus. Es besteht ein hauptsächlich glutamaterges, schichtenspezifisches Innervationsmuster mit Körnerzellen, die zur CA 3-Schicht projizieren, und Interneuronen für die Rückwärts- und Vorwärtshemmung [36, 37]. Der Gyrus dentatus und die subgranuläre Zone sind auch besondere Hirnregionen in Hinblick auf die dort stattfindende Neurogenese [38]. Funktionell handelt es sich um ein polysensorisches assoziatives Zentrum mit viszeralen und endokrinen Repräsentationsgebieten.

Dem Gyrus dentatus wird eine Filterfunktion für Aktivität aus dem entorhinalen Cortex zugesprochen [39]. Wenn diese versagt oder eine kollaterale Interaktion zwischen Körnerzellen durch Sprossung von Moosfasern ermöglicht wird, wird die Ausbreitung epileptiformer Aktivität begünstigt [39-41].

### **1.3. Antikonvulsive Pharmakotherapie**

Die antikonvulsive Pharmakotherapie ist nur eine symptomatische Therapie, da die Neigung zu weiteren Anfällen nicht beseitigt wird. Das Ziel ist die vollständige Anfallsfreiheit unter Vermeidung von unerwünschten Wirkungen der Medikamente. Bei einer Monotherapie wird eine Anfallsfreiheit bei 40-68 % der Patienten erreicht [42-45]. Antikonvulsive Medikamente können auf unterschiedliche Weise die elektrische Erregbarkeit von Gehirngewebe reduzieren. Dazu gehören

1. die Modulation von Ionenkanälen,
2. eine Verstärkung der GABAergen Inhibition,
3. eine Abschwächung der glutamatergen Exzitation und
4. Beeinflussung von intrazellulären Signalkaskaden.

Viele Antikonvulsiva wirken gleichzeitig auf mehreren dieser Ebenen an unterschiedlichen Angriffspunkten. Je nach Situation sind verschiedene Wirkmechanismen in unterschiedlichem Maße am therapeutischen Effekt beteiligt

[46]. Die in meiner Arbeit untersuchten Antikonvulsiva Carbamazepin, Phenytoin und Valproat sind für die Therapie der fokalen Epilepsie die Mittel der ersten Wahl [47].

**Phenytoin (PHT)** wirkt auf spannungsabhängige Natrium-Kanäle. Der Wirkmechanismus beruht auf einer verlängerten Dauer der Refraktärität. Die Amplitude und Dauer eines Aktionspotentials werden nicht reduziert, aber hochfrequente Aktionspotentialsalven werden inhibiert [48].

**Carbamazepin (CBZ)** blockiert Natrium-Kanäle wie auch Phenytoin bei einer hohen Aktionspotential-Frequenz und zusätzlich auch durch eine spannungsabhängige Inhibition, die bei hyperpolarisierten Membranpotentialen mäßig und bei depolarisierten Membranpotentialen stärker ausgeprägt ist [49].

**Valproat (VPA)** wirkt zwar auch an spannungsabhängigen Natrium-Kanälen, dieser Wirkmechanismus wird aber nicht mehr als klinisch relevant angesehen [46, 50, 51]. Der Hauptwirkort wird an der GABAergen Synapse vermutet: Es erhöht die GABA-Synthese und reduziert den GABA-Abbau. Durch die Blockade des Energiemetabolismus wird die neuronale Exzitabilität moduliert [46, 52]. Im Rahmen der Erforschung des Wirkmechanismus bei der Therapie der bipolar affektiven Störung wurden intrazelluläre Wirkungen festgestellt, unter anderem die Beeinflussung des Inositol-Metabolismus, die Inhibition der Glycogen-Synthase-Kinase-3 und Änderungen der Gen-Expression im Mäusegehirn [53, 54]. Als Inhibitor der Histon-Deacetylase wird Valproat als ein Kandidat für eine Kombinationstherapie mit einem Methyltransferase-Inhibitor zur Tumorbehandlung angesehen (diskutiert in [55]).

#### **1.4. Pharmakoresistenz**

Bisherige Studien [45, 56] haben gezeigt, dass ein zweites hinzugefügtes Antikonvulsivum nur bei 14-27 % der vorher therapierefraktären Patienten eine Anfallsfreiheit erzielt. Die Erfolgsrate bei einem dritten Antikonvulsivum ist noch geringer. Kumulativ wird das Ziel „Anfallsfreiheit“ bei 45 % der Patienten nicht erreicht, wobei eine starke Abhängigkeit vom Anfallstyp und dem Bestehen einer

hippocampalen Sklerose zu finden ist [56, 57]. Neben einer positiven Familienanamnese, traumatischen Gehirnschäden und psychiatrischen Nebenerkrankungen ist für die Entwicklung einer Pharmakoresistenz die Anfallsfrequenz vor Beginn einer medikamentösen Therapie ein wichtiger Faktor [58]. Eine kurative Therapie besteht in der Epilepsiechirurgie. Über Video- und intrakranielle EEG-Aufnahmen wird der epileptogene Fokus bestimmt, der meist in der Temporalregion liegt. Nach der Resektion sind 33 % - 93 % der Patienten unter Fortführung der medikamentösen Therapie anfallsfrei mit einem von McIntosh in einer Metanalyse ermittelten Median von 70 % [59-61]. Alternative Behandlungsmethoden sind die Vagusnervstimulation und eine ketogene Diät, wobei diese jedoch nur zu einer Reduktion der Anfallsfrequenz und nicht zu einer Anfallsfreiheit führen [62].

### **Mechanismen der Pharmakoresistenz**

Es werden derzeit zwei Hypothesen verstärkt untersucht, die zu einer Pharmakoresistenz beitragen können. Bei der Target-Hypothese werden Veränderungen der Zielstrukturen der Antikonvulsiva als Ursache vermutet, während bei der Transporter-Hypothese eine Überexpression oder verstärkte Aktivität von Transportproteinen an der Bluthirnschranke oder im Hirnparenchym eine therapeutische Akkumulation der Medikamente verhindern.

Neben diesen beiden Mechanismen erforscht man auch den Betrag einer Veränderung der inhibitorischen Funktion GABAerger-Interneurone und von Netzwerkveränderungen durch synaptische Reorganisation unter Ausbildung abnormer neuronaler Verschaltungen [63, 64]. Zu dieser Fragestellung führte die Beobachtung, dass im in-vitro Versuch eine pharmakoresistente epileptiforme Aktivität auftrat, wenn eine GABA-A-abhängige Inhibition verhindert wurde [65]. Im Tierexperiment konnte eine Translokation von GABA-Rezeptor-Untereinheiten nach Status epilepticus festgestellt werden. Die Autoren rechnen mit einer 50 %-Reduktion der aktiven GABA-A Rezeptoren [66, 67]. Dies führte schließlich zu der Theorie, dass

auch bei Patienten mit Pharmakoresistenz eine verminderte Inhibition beteiligt sein könnte [63].

### **Target-Hypothese**

Veränderungen der Zielstrukturen können durch eine abweichende Zusammensetzung der Untereinheiten von Ionenkanälen bedingt sein. Nach einem Status epilepticus ließ sich in menschlichem und Rattengehirn eine verminderte Expression von alpha- und beta-Untereinheiten spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle feststellen, die mit einer Abnahme der frequenzabhängigen Kanalblockierung durch Carbamazepin und Phenytoin zusammenhängen könnten [68-70]. Ebenso war im Rattengehirn nach einem Status epilepticus die Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA-A-Rezeptors zwischen Tieren, die auf Phenobarbital ansprachen, und resistenten Tieren unterschiedlich [71].

Eine Pharmakoresistenz gegenüber Antikonvulsiva, die an mehreren Zielen wirken, oder gegen unterschiedliche Antikonvulsiva, die je ein anderes Ziel haben, lässt sich jedoch dadurch nicht hinreichend erklären.

### **Transporter-Hypothese**

Die Multidrug-Transporter-Proteine, die für die Pharmakoresistenz von Geweben und Zellen erforscht werden, gehören hauptsächlich der ATP-binding cassette (ABC)-Transporter-Superfamilie an, von denen inzwischen etwa 50 Vertreter bekannt sind. Es handelt sich um Transmembranproteine, die typischerweise zwei Nukleosidbindende Domänen aufweisen, und nach phylogenetischer Analyse sieben Subfamilien (ABCA-ABCG) zugeordnet werden [72].

Am bekanntesten sind das P-glycoprotein (PGP, auch MDR1 genannt) und die Klasse der Multidrug resistance-associated Proteine (MRP/ABCC), von denen MRP1 bis MRP6 am gründlichsten erforscht sind [73]. Eine Transporter-Proteingruppe, die neben den genannten an der Pharmakoresistenz beteiligt sein kann, sind vault-

Proteine. Diese sind bei Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie ebenfalls überexprimiert [74].

Weitere Transportproteine, die nicht zu den ABC-Transportern gehören, sind das major vault-Protein oder der Familie der organischen Anionen-Transporter (OAT) zugehörig. Bevorzugte Substrate der MRP-Familie stellen mit Glutathion oder Glucuronsäure konjugierte lipophile Substanzen und zyklisches AMP und GMP dar [75].

MDR1 und MRP1 reduzieren eine kompartmentelle, zytoplasmatische oder organelläre Medikamentenakkumulation durch extrazellulären Medikamententransport oder intrazelluläre vesikuläre Sequestration [72, 76]. Zu der Frage, welche Transportproteine an welchen Zellen im Gehirn exprimiert werden, gibt es widersprüchliche Angaben. Expressionsdaten aus Tierexperimenten lassen sich auch nicht bedenkenlos untereinander und mit humanen Daten vergleichen, da Unterschiede in Abhängigkeit von der Spezies, dem experimentellen Modell und der Nachweismethode gefunden wurden [75].

In nicht alteriertem humanem Gehirngewebe konnte am Endothel von Hirnkapillaren PGP nachgewiesen werden, jedoch nicht an Gliazellen. In Gliagewebe konnte kein MRP nachgewiesen werden. Möglicherweise aber liegt die Expressionsrate unter der Nachweisgrenze.

In epileptogenem Gewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie konnte jedoch eine Überexpression von PGP und MRP an der Bluthirnschranke und an Astrozyten und Neuronen im Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PGP sind MRP1 und MRP2 nicht homogen exprimiert und für das Subiculum sind die bisherigen Ergebnisse widersprüchlich [76, 77].

Es gibt Hinweise, dass Phenytoin, Carbamazepin und Valproat Substrate der Transportproteine sind [78-80], so dass in dieser Arbeit der Beitrag der Transportproteine zur Pharmakoresistenz getestet wird. Dafür muss die Aktivität der Transportproteine im Experiment unterbunden werden.

## **Multidrug-Transporter-Inhibitoren**

Die Transportproteine sind im Rahmen der Krebsforschung schon länger auf ihre Aktivität, Substratspezifität in Bezug auf Zytostatika und Inhibitoren untersucht worden [81]. In der Neurowissenschaft wurden sie erst in den letzten 15 Jahren genauer untersucht. Probenecid und Verapamil sind für andere Indikationen bereits zugelassene Medikamente, die die Transportproteine im zentralen Nervensystem nachweislich inhibieren konnten. In einem Aktivitätstest, der auf der intrazellulären Akkumulation des Transporter-Substrates Calcein beruht, konnte die Geschwindigkeit der intrazellulären Akkumulation durch die Multidrug-Transporter-Inhibitoren Probenecid und Verapamil beeinflusst werden [82].

### **Probenecid (PBN)**

Probenecid wird in der Gichttherapie als Urikosurikum eingesetzt, da es die Harnsäurerückresorption hemmt. Durch die Hemmung von Transportmechanismen sind auch extrarenale Effekte zu erklären wie die Modulation des Nukleotidtransports über die Zellmembran von Gliazellen, die über MRP-Transporter ablaufen soll. Daneben soll es auch an alpha-adrenergen Rezeptoren inhibitorisch wirken [83, 84].

Es wurde in einem Mikrodialyse-Modell an der Maus gezeigt, dass Probenecid die extrazelluläre Phenytoin-Konzentration im zentralen Nervensystem erhöht, was auf einen Probenecid-sensitiven Transportmechanismus hinweist [85].

### **Verapamil (VPM)**

Verapamil ist ein L-Typ Calcium-Kanalblocker und für die Therapie von Herzrhythmusstörungen, der koronaren Herzkrankheit oder Cluster-Kopfschmerzen indiziert. Es wurden antikonvulsive Effekte von Verapamil in humanen Gehirnschnitten und in Tiermodellen beobachtet [86-88], die sich durch eine Blockade des Calcium-Einwärtstroms erklären lassen [89, 90].



Die Wirkung der Calcium-Kanalblocker Nifedipin, Nimodipin und Flunarizin war jedoch unter dem Aspekt einer antikonvulsiven Add-on-Therapie in der Behandlung von Epilepsiepatienten nicht erfolversprechend. Es wurde zwar ein schwacher anfallsreduzierender Effekt von Flunarizin festgestellt, die Kombinationstherapie mit dieser Substanz wird jedoch von den Autoren wegen einer hohen Rate an unerwünschten Wirkungen nicht empfohlen [91].

Im klinischen Gebrauch erfolgt eine Therapieoptimierung in der Behandlung eines Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie, in dem es als Adjuvans zu Carbamazepin zu längeren anfallsfreien Intervallen führte [92-94]. Weiterhin wird über eine erfolgreiche Anfallskontrolle bei zwei Mädchen mit Dravet-Syndrom (Natrium-Kanal-Mutation) und die Durchbrechung eines therapierefraktären Status epilepticus bei einem 11 jährigen Jungen durch medikamentöse Kombinationstherapie mit Verapamil berichtet [89, 95].

## **2. Fragestellung**

Da nach Entfernen des epileptischen Fokus 70 % der Patienten unter Fortführung der medikamentösen Therapie anfallsfrei sind, können Faktoren der Pharmakoresistenz in dem resezierten Gewebe vermutet werden [62]. Für den Gyrus dentatus wurde bereits von der Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine pharmakosensitive epileptiforme Aktivität im Gyrus dentatus von Patienten ausgelöst werden konnte, die nicht wegen einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie operiert wurden. Diese war aber bei Patienten mit pharmakoresistenter mesialer Temporallappenepilepsie auch unter Umgehung der Bluthirnschranke pharmakoresistent [96, 97].

Im Rahmen eines Projekts zur Untersuchung der Wirkungen verschiedener Antikonvulsiva (antiepileptic drugs, AED) auf induzierte epileptiforme Aktivität und der Beteiligung von Multidrug-Transporter zur in-vitro Pharmakoresistenz wurde reseziertes Hippocampusgewebe und Gewebe vom temporalen Cortex von pharmakoresistenten Patienten getestet [98]. Darüber hinaus wurden die Expression

und die Aktivität der Multidrug-Transporter [82, 99] untersucht, um diese mit den elektrophysiologisch erhobenen Daten zu korrelieren.

Von mir wurden Hippocampus-Schnitte im Gyrus dentatus und Subiculum mit elektrophysiologischen Methoden für die Beantwortung folgender Fragen untersucht:

## 1. Induktion

1.1. Lässt sich epileptiforme Aktivität auch im Subiculum induzieren?

1.2. Finden sich Unterschiede in der Induktion im Gyrus dentatus im Vergleich zu den Vorstudien?

1.2.1. Wie lässt sich die epileptiforme Aktivität charakterisieren?

1.2.2. Haben pathologische Veränderungen Einflüsse auf die Induktion?

## 2. Ist die induzierte Aktivität im Gyrus dentatus und Subiculum pharmakoresistent?

2.1. Lassen sich die Beobachtungen im Gyrus dentatus in der Wirkung von Carbamazepin bestätigen?

2.2. Ist die Aktivität im Gyrus dentatus auch resistent gegenüber Valproat und Phenytoin?

## 3. Welchen Beitrag liefern Multidrug-Transporter zur Pharmakoresistenz?

3.1. Beeinflussen die Multidrug-Transporter-Inhibitoren Verapamil und Probenecid die epileptiforme Aktivität in beiden Regionen?

3.2. Lässt sich die Pharmakoresistenz durch Multidrug-Transporter-Inhibitoren aufheben?

3.3. Zeigen Patienten, in deren Gewebeproben die Pharmakoresistenz aufgehoben werden kann, gemeinsame Patientenmerkmale?

### **3. Methoden**

Es wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ beachtet.

#### **3.1. Klinische Vorbereitung**

Die in der Studie untersuchten Hippocampusschnitte (n = 183) stammen von 58 chirurgisch behandelten Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie. Von 30 Patienten erhielten wir Hippocampusgewebe, in welchem wir sowohl im Gyrus dentatus als auch im Subiculum messen konnten. Im Hippocampusgewebe von 6 Patienten haben wir nur im Subiculum und von 22 Patienten nur im Gyrus dentatus gemessen.

Eine Pharmakoresistenz wurde angenommen, wenn durch zwei oder drei AED bei einer maximal tolerierten Dosis innerhalb von zwei Jahren keine Anfallsfreiheit erreicht werden konnte [100]. Die prächirurgische Diagnostik der mesialen Temporallappenepilepsie wurde vom Epilepsiezentrum Berlin-Brandenburg nach den deutschen und europäischen Richtlinien für prächirurgische Evaluation durchgeführt [101]. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité zugelassen (EA1/042/04) und entsprechend der Deklaration von Helsinki ausgeführt. Jeder Patient wurde über die Verwendung des resezierten Gewebes aufgeklärt und gab seine schriftliche Einwilligung.

Es wurden folgende Patienten- und Krankheitsmerkmale erhoben:

Alter bei Auftreten der Erkrankung, Alter bei chirurgischer Therapie, Geschlecht, Seite des epileptischen Fokus, Anfallsfrequenz/Monat, Auren/Monat, sekundär generalisierte Anfälle/Jahr, letzte medikamentöse Therapie, an der maximalen therapeutischen Konzentration normierte Gewebe- und Serumkonzentration der antikonvulsiven Medikamente, hippocampale Pathologie (Wyler-Klassifikation und Vorhandensein einer hippocampalen Sklerose), die Cortexpathologie, Besonderheiten in der Krankengeschichte (z. B. Unfall, Fieberkrämpfe und andere). (Tabelle 1).

Es erfolgte eine Kategorisierung von Alter, Erkrankungsalter und Dauer der Erkrankung entsprechend der Formel  $m \approx \sqrt{n}$  ( $m$  = Klassenanzahl,  $n$  = Anzahl der Merkmalsausprägungen). Bei 58 Patienten ergab sich ein  $m$  von 7,61; dieser Wert wurde auf 7 gerundet, die Kategorienbreite nach  $B = \frac{n_{max}-n_{min}}{m}$  (unter Auslassung von Ausreißern) berechnet und die äußeren Kategoriegrenzen nach unten auf 0 und nach oben auf  $+\infty$  definiert.

### **3.2. Neuropathologische Diagnostik**

Die dem zu untersuchenden Gewebe benachbarten Sektionen wurden vom Institut für Neuropathologie der Charité für diagnostische Zwecke analysiert. Wie bei Gabriel [96] und Kann [15] beschrieben, wurden die resezierten Hippocampi je nach Ausmaß des Zellverlusts mit Hilfe der Wyler-Klassifikation in zwei Gruppen eingeteilt. Gewebe mit Wyler-Grad 1 und 2 wurde als nicht-HS (hippocampale Sklerose, HS), Grad 3 und 4 als HS zusammengefasst. Zusätzlich erfolgte im neurophysiologischen Institut eine immunozytochemische Darstellung von MRP 1, 2 und 5, von PGP und major vault Protein in Gyrus dentatus, CA 1-3 und Subiculum mit Auswertung der Expressionsrate.

PatNr	Regionen	w/m	Alter	Dauer	Wylar	Besonderheiten	Klinische Resistenz	Therapie	nSK	nHipp	Anfälle/ Monat	SGS/ Jahr
1	GD	w	34	2	1		CBZ, LEV, VPA, LTG	OXC	59,75	k.A.	5	k.A.
2	GD	w	39	7	4	Unfall	CBZ,VPA	OXC	40,75	k.A.	5	0,14
3	GD	w	29	28	4	Unfall	CBZ, a	LTG	80	k.A.	1	12
4	GD	w	59	27	3		CBZ, a	OXC + LEV	76,75	k.A.	1	0,1
5	GD + Sub	w	53	38	4		CBZ, a	OXC + TPM	78	k.A.	4	0,1
6	GD + Sub	m	43	12	2	Cortexpath.	CBZ, a	LEV + GBT	21	k.A.	4	k.A.
7	GD	w	39	39	4	Cortexpath.	VPA	LTG + LEV	32,86	k.A.	7	0,1
8	GD	w	45	22	3		GBT, CBZ	TPM	143,2	k.A.	0	30
9	GD	w	60	50	4	Cortexpath., FK	k. A.	LTG + GBT	37,86	k.A.	10	1
10	GD + Sub	w	24	15	2		CBZ	LTG	27,86	k.A.	3	12
11	GD	m	36	6	4	Unfall	OXC	LTG	65	k.A.	4,5	0,1
12	Sub	m	34	17	4		CBZ, OXC, LEV	OXC + LEV	50,75	19,25	5	0,01
13	GD	m	42	38	3		CBZ, LTG, LEV	LTG + LEV	78,57	82,14	30	0,01
14	GD	w	49	22	4		CBZ, LTG	LTG + LEV	97,86	209,29	5	k.A.
15	GD	w	48	44	4		CBZ	LTG + TPM	35,71	52,14	8	k.A.
16	GD	w	58	45	2		CBZ, OXC	LTG + ZNS	63,25	60,53	2	0,1
17	GD	m	23,5	1	1	Tumor	LEV, LTG	LTG + LEV	36,5	k.A.	60	0
18	GD	w	44	42	4		CBZ, PHT, LEV, LTG	LTG + LEV	36,5	10,57	7	0,01
19	GD + Sub	m	40	37	4		CBZ, VPA, LTG, ZNS, PHT	OXC + PHT	51,25	66	4	k.A.
20	GD + Sub	w	60	33	1		CBZ, LTG, LEV	LTG + LEV	49,75	62,14	2	k.A.
21	GD + Sub	w	37	10	1		CBZ, a	LEV + TPM	k.A.	k.A.	1,5	15
22	GD + Sub	w	51	11	1		CBZ, a	LTG + ZNS	23,21	71,58	4,5	12
23	GD + Sub	m	58	23	4		CBZ,VPA	OXC + LEV	61,75	69	4	0,1
24	GD + Sub	w	48	18	3		CBZ, a	CBZ	62,5	65,83	2	12
25	GD	m	15	6	3	FK	CBZ, a	OXC + LTG	42,14	39,75	8	0,1
26	Sub	w	15	14,5	3		CBZ, a	OXC + TPM	50,4	30,25	30	100
27	GD + Sub	m	52	50	4	Entzündung	CBZ, a	OXC + ZNS	53,95	74,47	5	0,1
28	GD	w	44	4	2		LTG, LEV	LTG + LEV	12	k.A.	k.A.	k.A.
29	GD + Sub	w	24	5	2	Cortexpath.	CBZ, a	OXC + LEV	17,25	20,25	10	1
30	GD + Sub	m	38	12	2		CBZ, a	OXC + LTG	74,25	32,14	1	1
31	GD + Sub	m	22	12	2		OXC, a	LTG + LEV	44,25	6,07	4,5	0,1
32	Sub	w	32	30	4		CBZ, a	LTG + LEV	23,25	k.A.	16	0
33	GD	m	39	26	2		OXC, a	LTG	110,71	105	2	0,1
34	Sub	m	61	4	3		CBZ, a	GBT	26,05	k.A.	2	0
35	GD	m	5	1	1		OXC	OXC + VPA	46,75	k.A.	420	0,1
36	GD	m	51	39	4	Entzündung	CBZ, LEV, PHT, TPM	LTG + LEV	40	k.A.	7,5	k.A.
37	GD + Sub	w	47	46	4	Entzündung	CBZ, LEV	LTG	67,86	k.A.	13	36
38	Sub	m	12	4	1	Tumor	CBZ, LTG, LEV	LTG + LEV	62,14	k.A.	60	k.A.
39	GD + Sub	m	40	27	3	Tumor	CBZ, a	LTG + LEV	62,86	k.A.	2,5	25

40	GD	m	23	3	4		k. A.	LEV + LTG	76,75	k.A.	3	6
41	Sub	m	39	27	1/2	Cortexpath.	CBZ, VPA, LEV	CBZ + VPA	100	k.A.	4,5	0
42	Sub	w	21	17	4	FK	CBZ, PHT, VPA	LEV + LTG	49	k.A.	2	k.A.
43	GD	w	41	38	3		k. A.	LEV + LTG	74,29	k.A.	3	0,1
44	GD	w	20	18	3	Cortexpath.	k. A.	LTG	20,71	k.A.	10	0,01
45	GD	w	46	32	4	Entzündung	k. A.	OXC + LAC	68,33	k.A.	7,5	0,01
46	GD + Sub	m	36	31	1	Tumor	LTG	LTG	28,6	k.A.	0,3	1,6
47	GD	m	52	9	3/4		k. A.	OXC + LAC	53	k.A.	k.A.	k.A.
48	GD	w	48	25	3/4	FK	PHT, GBT, LEV, CBZ	LTG + PGL	47,86	k.A.	k.A.	k.A.
49	Sub	w	34	31	3	Cortexpath.	CBZ, LTG	LTG	32,14	83,57	8	k.A.

**Tabelle 1 Patiententabelle**

Darstellung von Patientenummer, der hier untersuchten Regionen (GD: Gyrus dentatus, Sub: Subiculum), Geschlecht (w: weiblich, m: männlich), Alter (in Jahren), Dauer der Erkrankung (in Jahren), Wyler-Grad, Besonderheiten (Entzündung: Meningo-/Enzephalitis, FK: Fieberkrämpfe, Tumore, Unfall, Cortexpath: deutliche Cortexveränderung wie Kontusion, Sklerose oder Dysplasie), klinisch nachgewiesene Resistenz gegenüber AED, Therapie zum Zeitpunkt der Operation (CBZ Carbamazepin, LEV Levetiracetam, VPA Valproat, LTG Lamotrigin, GBT Gabapentin, OXC Oxcarbazepin, TPM Topiramid, PHT Phenytoin, LAC Lacosamid, ZNS Zonisamid, PGL Pregabalin, a nicht näher bezeichnete andere AED), nSK an der oberen therapeutischen Serumkonzentration normierte Serumkonzentration zum Operationszeitpunkt, nHipp an der oberen therapeutischen Serumkonzentration normierte Gewebekonzentration im Resektat (bei zwei AED wurde der höhere Wert angegeben), Anzahl der Anfälle pro Monat und Anzahl der sekundär generalisierten Anfälle (SGS) pro Jahr, k.A.: keine zuverlässigen Angaben.

### 3.3. Gewebetransport, -präparation und -erhaltung

Aus dem Hippocampuskopf und -körper wurden im Operationssaal koronare Gewebescheiben von 4 mm Dicke geschnitten und sofort in eine kalte (0,5-1°C) karbogenierte Transportlösung eingetaucht, die (in mM) 3 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucose, 2 MgSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,6 CaCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 200 Saccharose und 0,1 (±) alpha-Tocopherol enthielt (pH 7,4, Osmolalität 304 mosmol/kg, Ethanol 0,005 v%). Das Gewebe wurde innerhalb von 30 min in einem luftdichten Thermogefäß vom Operationssaal ins Labor transportiert. Bei der Ankunft im Labor wurden Temperaturen von < 4 °C gemessen. Der Sauerstoffpartialdruck betrug > 580 Torr.

Anschließend wurden mittels Vibratom (Campden Instruments Ltd., Leicester, UK) 500 µm dicke Hirnschnitte präpariert. Es konnten so aus einem Block 4-8 Schnitte bereitgestellt werden. Diese wurden sofort in eine mit vorgewärmter (34,5 ± 0,5 °C) und karbogenierter künstlicher cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) perfundierte

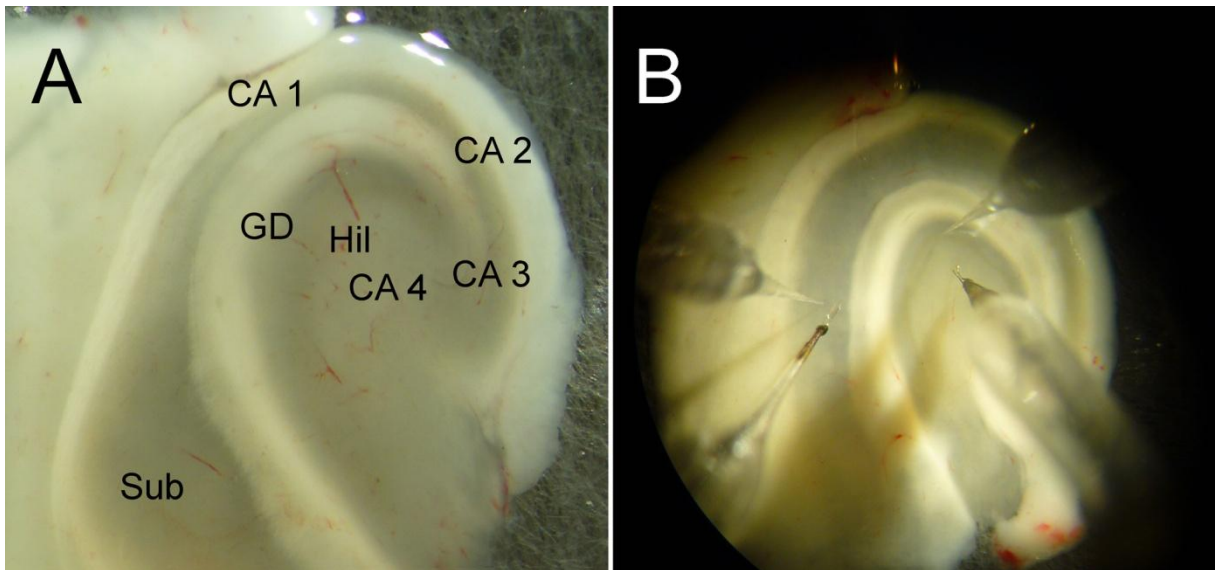
Messkammer gelegt. In der ACSF waren (in mM) 129 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucose, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,6 CaCl<sub>2</sub> und 21 NaHCO<sub>3</sub> und 0,03 alpha-Tocopherol enthalten (pH 7,4 Osmolalität von 303 mosmol/kg, 0,0025 v% Ethanol) enthalten. Die Perfusionsrate betrug 1,7 ml/min. Die Experimente begannen 4-6 Stunden nach der Präparation, um nach der Operation und dem Transport in Natrium-freier Lösung eine optimale Erholung des Gewebes zu gewährleisten.

Bei den Gehirnschnitten waren der Gyrus dentatus und die Regionen CA 1-4 vollständig erhalten, während das Subiculum oft nicht vollständig im Gewebeblock oder in einem separaten Gewebeblock erhalten war. Daraus folgt eine Differenz in der Anzahl der untersuchten Schnitte von beiden Regionen.

### **3.4. Elektrophysiologische Messung und Stimulation**

Als Messfühler dienten 2-Kanal-K<sup>+</sup>-selektive/Referenz-Mikroelektroden nach Lux & Neher [102], die mit Fluka 60031 Ionenaustauscher auf der Kalium-sensitiven Seite und mit 150 mM NaCl auf der Referenzseite gefüllt wurden. Es wurden nur Elektroden verwendet, die auf eine zehnfache K<sup>+</sup>-Konzentrationsänderung mit einer Potentialänderung von 55-60 mV reagierten.

Die Elektroden wurden 120-150 µm tief in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, gegenüber der Region CA 1 und zentral in das (Pro-)Subiculum platziert (Abbildung 1 A+B).



**Abbildung 1 humaner Hippocampuschnitt und Positionierung der Elektroden im Hippocampus**

A GD: Gyrus dentatus, Hil: Hilus, CA 1-4: Region Cornu Ammonis 1-4, Sub: Subiculum, B Gehirnschnitt mit platzierten Mess- und Stimulationselektroden

Die Daten wurden für die Feldpotentiale mit einer Auflösung von 10 kHz (Filter 3 kHz) und für die  $[K^+]$  mit 100 Hz (Filter 1,6 Hz) unter Verwendung des Programms Spike 2 (Version 4.01) mit dem Computer aufgenommen und auf der Festplatte gespeichert.

Bipolare Stimulationselektroden aus Platindraht mit 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser und Polabstand von 80-120  $\mu\text{m}$  wurden an der Hilus-CA 3 Grenze und in das Subiculum zwischen Messelektrode und Gyrus dentatus platziert.

Zur Bestimmung der Vitalität und der vom neuronalen Netzwerk abhängigen Reizantworten wurden am Anfang und am Ende jedes Experiments fünf gepaarte elektrische Reize (0,1 ms Reizdauer, 1-20 V, 50 ms Intervall) im Abstand von 20 s appliziert, die Feldpotentiale an der Schwelle und mit 20, 50, 80, und 100 % der maximalen Feldpotential-Amplitude auslösen. Es wurde anschließend mit 120 % der maximalen Intensität für eine supramaximale Stimulation gereizt. Schnitte, die eine Reduktion der Amplitudenwerte auf 75 % oder weniger der Ausgangsamplitude aufwiesen und in der Auswaschphase eine gemittelte Verminderung der Aktivitätsparameter auf unter 75 % aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.



### **3.5. Experimentelle Protokolle**

Zur Beantwortung der in der Zielstellung genannten Fragen wurden 5 Protokollvarianten ausgeführt:

1. Testung der Pharmakoresistenz gegenüber antikonvulsiv wirkenden Medikamenten (AED)
2. Testung der epileptiformen Aktivität gegenüber Inhibitoren der Transportproteine (MDTI)
3. Testung der Stabilität epileptiformer Aktivität ohne Gabe von Substanzen
4. Testung der Wirkung von MDTI bis zu 60 min Applikationsdauer
5. Testung der Wirkung von AED bis zu 40 min Applikationsdauer

### **3.6. Protokoll-Perioden (A-G)**

Die Perioden A-C und F-G waren Bestandteil jedes Protokolls. Die Dauer jeder Periode betrug mit wenigen Ausnahmen (Verlust der Aktivität, transiente technische Probleme) mindestens 20 min. Diese Periodendauer wurde gewählt, weil sich ein Effekt von CBZ auf die epileptiforme Aktivität schon nach 10 min zeigt [97].

**A** Prüfung der Vitalität des Gewebes anhand evozierter Feldpotentiale zu Beginn des Experiments

**B** Induktion epileptiformer Aktivität

im Subiculum

Epileptiforme Aktivität konnte durch das Einwaschen einer hoch-Kalium-ACSF-Lösung (10-12 mM) ohne elektrische Stimulation im Bereich des Subiculums ausgelöst werden.

im Gyrus dentatus

Wie bei Gabriel et al. [96] beschrieben, wurden für 10-15 min gepaarte elektrische Reize im Hilus; (Pulsabstand 50 ms; Reizstärke, die Feldpotentiale mit 80 % der maximalen Antwortamplitude evoziert; Frequenz 0,067 Hz (alle 15 s)) appliziert. Danach begann bei fortgesetzter Reizung die Perfusion mit einer 10-12 mM Kalium

enthaltenden ACSF (K-ACSF). Bei Auftreten Reiz-unabhängiger epileptiformer Aktivität wurde die Stimulation beendet.

Trat bei Verwendung von 12 mM K-ACSF epileptiforme Aktivität bereits bei geringen extrazellulären Kalium-Konzentrationen ( $[K^+]_e$ ) von 6-8 mM auf oder startete die epileptiforme Aktivität als schnelle Folge von kurzen steilen negativen Feldpotential-Schwankungen, wurde die Kalium-ACSF-Konzentration auf 10 mM reduziert.

### **C Kontrolle der epileptiformen Aktivität**

Beobachtung der Aktivität über weitere 10-15 min, bis zur Stabilisierung von Ereignisrate und Amplitude (Kontrollphase).

### **D Überprüfung der Pharmakoresistenz im Gehirnschnitt gegenüber der Behandlung mit AED oder MDTI**

Zugabe eines der folgenden AED über 20 min zur Perfusionslösung:

CBZ (50  $\mu$ M in der Perfusionslösung)

VPA (1 mM in der Perfusionslösung)

PHT (50  $\mu$ M in der Perfusionslösung)

Zugabe folgender MDTI über 20 min zur Perfusionslösung

Probenecid (400  $\mu$ M in der Perfusionslösung; MRP-Blocker)

Verapamil (40  $\mu$ M in der Perfusionslösung; PGP-Blocker)

oder beide

### **E Testung von Effekten der kombinierten Gabe von AED + MDTI**

Im Falle einer Persistenz epileptiformer Aktivität wurde für weitere 20 min eine Lösung verwendet, die neben der erhöhten Kaliumkonzentration sowohl das AED als auch den bzw. die MDT-Inhibitoren enthielt (AED + MDTI in K-ACSF).

nach Prä-Inkubation mit AED (PI AED)

nach Prä-Inkubation mit MDTI (PI MDTI)

### **F Testung der Erholung der epileptiformen Aktivität**

Die Reversibilität der Effekte wurde durch Auswaschen der Medikamente über 20-60 min überprüft.

Erholung direkt bei kontinuierlicher K-ACSF Applikation

Erholung nach transienter Absenkung der  $[K^+]_e$

**G** Überprüfung der Vitalität des Gewebes am Ende des Experimentes (40 min nach Lösungswechsel zu normaler ACSF).

### 3.7. Datenanalyse

Das Ziel der Analyse war, Änderungen der epileptiformen Aktivität durch AED oder MDTI alleine und durch kombinierte Behandlung mit AED und MDTI zu beschreiben.

### 3.8. Klassifizierung der epileptiformen Aktivität

Nach Bestimmung der Ereignisrate und Ereignisdauer wurde die Art der epileptiformen Aktivität, in Anlehnung an Bezeichnungen in der englischsprachigen Literatur, einer von drei Klassen zugeordnet:

SLE	seizure like event, krampfartiges Ereignis Dauer $\geq 5$ s, Ereignisrate $< 6$ /min
fast spiking	schnelle Folge spike-artiger Ereignisse Dauer $< 5$ s und Ereignisrate $> 40$ /min
slow spiking	langsame Folge spike-artiger Ereignisse Dauer $< 5$ s und Ereignisrate $< 40$ /min

Nicht untersucht wurden: Keine bzw. minimale Aktivität (Feldpotential-Amplituden  $< 0,3$  mV, Ereignisdauer  $< 4$  ms), Spreading like depression.

Änderungen der Aktivitätsart wurden wie folgt unterschieden:

Resistenz	
Übergänge von	SLE in fast spiking, SLE in slow spiking, Slow oder fast spiking in SLE,

## Suppression

Da bei Patienten mit mehreren untersuchten Gehirnschnitten eine Kombination von verschiedenen Aktivitätsänderungen auftreten kann, wurden für diese folgende Klassen unterschieden:

Homogene Veränderungen

Heterogene Veränderungen

### **3.9. Bestimmung und Normalisierung der Aktivitätsparameter**

Für die Quantifizierung von Änderungen bei gleich bleibender Aktivitätsart wurden aus der epileptiformen Aktivität am Ende der Protokollabschnitte (3-5 min) Kontrolle, AED bzw. MDTI, AED + MDTI und Erholungsphase der epileptiformen Aktivität nach Auswaschen der applizierten Substanzen jeweils mindestens drei bis höchstens zehn epileptiforme Ereignisse analysiert.

Um verschiedene Komponenten der Aktivität zu beschreiben, wurden fünf Aktivitätsparameter bestimmt: Die Ereignisrate (n/min), die langsame Komponente der Ereignis-Amplitude (langsames Feldpotential, a sfp (mV)), die maximale Amplitude des Ereignisses (a peak (mV)), die Ereignisdauer (dur (s)) gemessen vom Beginn des Ereignisses bis zum 2/3-Erholungspunkt des langsamen Feldpotentials und die Frequenz der transienten Potentialfluktuationen (Minimalamplitude 0,3 mV, minimales Zeitintervall 3 ms), die dem langsamen Feldpotential überlagert sind (freq (Hz)).

Zur Ermittlung von Behandlungseffekten wurden die Werte jeder Behandlungsphase an den jeweiligen Kontrollwerten normalisiert und in Prozent des Kontrollwertes angegeben. Um auch allgemeine Trends zu erfassen, wurden die normalisierten a sfp, a peak und dur bzw. alle 5 normalisierten Parameter gemittelt (av3, av5). Wenn einzelne Parameter nicht verfügbar waren, wurde der Mittelwert aus den vorhandenen Werten errechnet. Zusätzlich wurden die extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration bei Ereignisbeginn (Kfuß) und die maximale Kaliumkonzentration während des Ereignisses (Kmax) berechnet und durch Subtraktion (Kmax - Kfuß) der

ereignisbedingte Kaliumanstieg ermittelt (Kanstieg). Auch für diese Parameter erfolgte eine Normalisierung auf den Kontrollwert.

Die Analyse wurde mit den verfügbaren Optionen des Programms Spike 2 (Version 4.01) und im Institut entwickelten Skripten durchgeführt. Die Parameter-Werte von 3-10 Ereignissen wurden für jeden Parameter und jeden Protokollabschnitt gemittelt und für jeden Hirnschnitt tabellarisch erfasst.

Die Gewebe- und Serumkonzentration der Antikonvulsiva, die bis zur Operation gegeben wurden, wurden durch Herrn Professor Pragst aus der Abteilung für forensische Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin der Charité, ermittelt.

### **3.10. Statistik**

Die Beschreibung der erhobenen Daten bestimmter Stichproben erfolgt hier anhand von Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes bzw. Median mit Angabe von Minimum und Maximum. Für statistische Vergleiche metrischer Daten abhängiger Stichproben wurden der Wilcoxon-Test (zwei Stichproben) bzw. der Friedman-Test (k Stichproben) verwendet. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen unabhängigen Stichproben dienten der Mann-Whitney U-Test, bzw. der Kruskal-Wallis-Test. Da es sich um kleine Stichprobenumfänge handelt und im Shapiro-Wilk-Test in den wenigsten Fällen eine Normalverteilung anzunehmen war, haben wir auf die Anwendung parametrischer Tests verzichtet.

Entsprechende Gruppen-Vergleiche kategorialer Daten wurden mittels McNemar- bzw. McNemar-Bowker-Test und mittels Fishers exaktem Test durchgeführt.

Ein p-Wert  $\leq 0,050$  wurde als signifikant angesehen. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm PASW Statistics 18 (Version 18.0.0, SPSS, Chicago, IL) durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

Von 58 Patienten war Hippocampus-Gewebe verfügbar, die Induktion epileptiformer Aktivität wurde in 183 Gewebeschnitten getestet. In 70 Schnitten wurden Messelektroden in der Pyramidenzellschicht des (Pro-) Subiculum positioniert, in 113 Schnitten in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.

Nach Induktion epileptiformer Aktivität, Analyse der reizevozierten Feldpotentiale und Analyse der Aktivitätsparameter in der Erholungsphase wurden 112 Gehirnschnitte von 49 Patienten (für das Subiculum 39 Schnitte von 24 Patienten und für den Gyrus dentatus 73 Schnitte von 41 Patienten) in die Analyse der Hauptexperimente eingeschlossen. Jeder Patient erhielt eine eindeutige Patientenummer und wird für alle folgenden Angaben darüber identifiziert.

### **4.1. Überprüfung der Vitalität des resezierten Hirngewebes**

#### **Subiculum**

Von 39 in die Analyse aufgenommenen Hippocampus-Schnitten mit Messungen im Subiculum konnten in 33 Schnitten evozierte Potentiale mit 80 % oder 100 % der Maximalamplitude zu Beginn und am Ende des Experiments gemessen werden (Abbildung 2 A). Von diesen Schnitten zeigten vier am Ende des Experiments eine Abnahme der Antwortamplitude auf  $< 75$  % des Wertes zu Beginn des Experiments. Für die restlichen 29 Schnitte ergab sich im Wilcoxon-Test eine nicht signifikante Reduktion der Antwortamplituden bei Stimulationsstärken, die 80 % ( $n = 29$ ) und 100 % ( $n = 29$ ) der Maximalantwort hervorrufen (Abbildung 2 C).

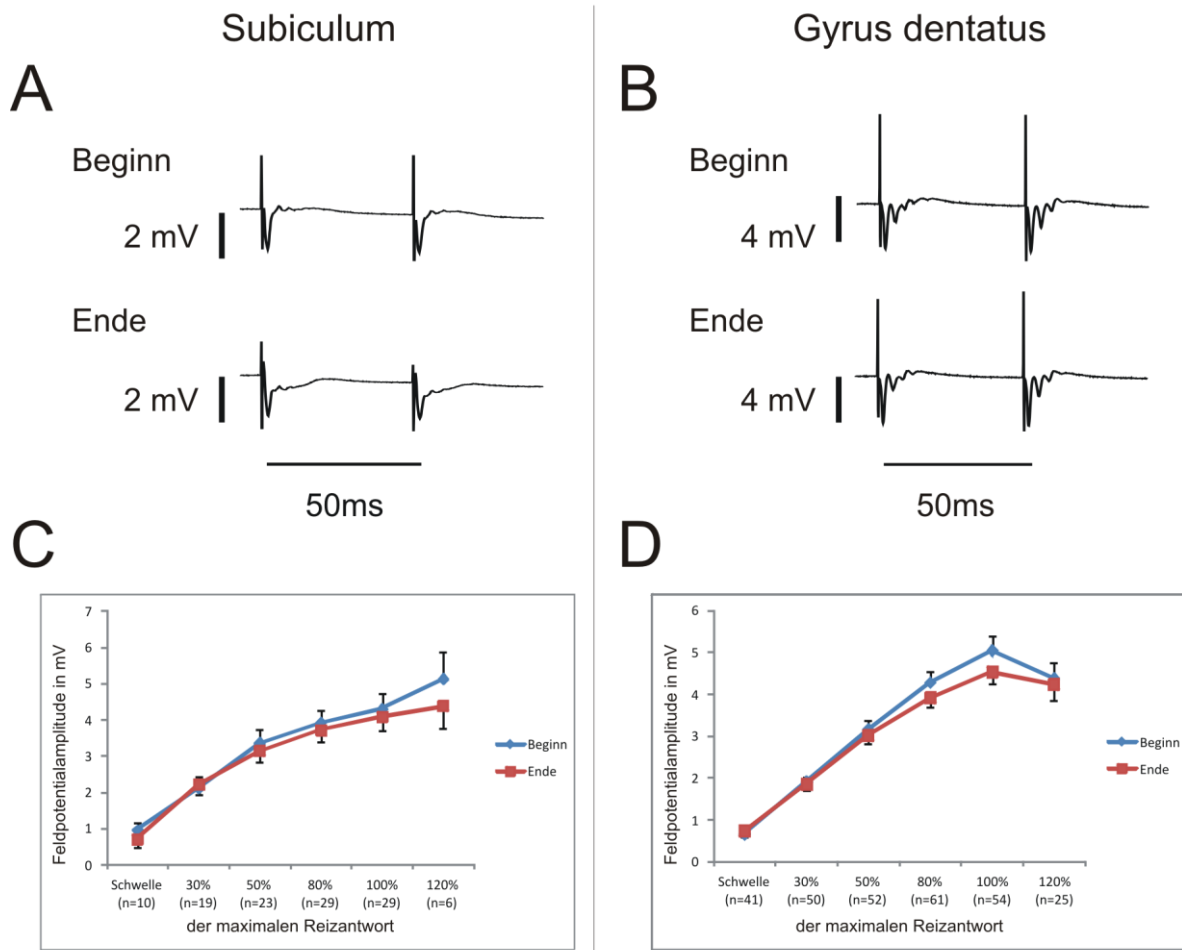
Bei 10 Schnitten, die entweder keine Werte (nicht stimuliert  $n = 6$ ) oder verbleibende Antwortamplituden  $< 75$  % des Wertes zu Beginn des Experiments aufwiesen, war in der Erholungsphase der epileptiformen Aktivität in 8 Fällen die Originalaktivität zu messen. Der gemittelte Aktivitätsparameter ( $av_5$ ) betrug  $> 75$  % des Kontrollwertes, so dass auch in diesen Schnitten eine ausreichend erhaltene Gewebektivität angenommen wurde.

## **Gyrus dentatus**

Von 73 in die Analyse aufgenommenen Hippocampus-Schnitten mit Messungen im Gyrus dentatus konnten in 66 Schnitten evozierte Potentiale mit 80 oder 100 % der Maximalamplitude zu Beginn und am Ende des Experiments gemessen werden (Abbildung 2 B). Von diesen Schnitten zeigten fünf bzw. 12 am Ende des Experiments eine Abnahme der Antwortamplitude auf  $< 75\%$  im Vergleich zur Stimulation am Anfang des Versuchs. Im Wilcoxon-Test ergab sich eine geringe, aber statistisch signifikante Abnahme der Potential-Amplituden bei Reizstärken, die 80 ( $n = 61$ ,  $p < 0,004$ ) und 100 % ( $n = 54$ ,  $p = 0,001$ ) der Maximalantwort hervorrufen (Abbildung 2 D).

Bei sieben Schnitten ohne Stimulationswerte und allen Schnitten mit Antwortamplituden  $< 75\%$  des Anfangswertes verlief die Erholungsphase der epileptiformen Aktivität ähnlich derjenigen im Subiculum ( $av5 > 75\%$  des Kontrollwertes), so dass auch hier die Vitalität des Gewebes als ausreichend beurteilt wurde.

## Evozierte Feldpotentiale



**Abbildung 2 Vergleich reizevozierter Feldpotentiale zu Beginn und Ende des Experiments**

A, B Originalbeispiele für reizevozierte Antworten auf gepaarte elektrische Reize (Puls-Abstand 50 ms, Reizstärke 0,5–20 V ) C, D Summengrafiken für die Amplitudenwerte der Antworten auf den ersten Puls, für die am Ende des Experiments im Subiculum bzw. im Gyrus dentatus  $\geq 75\%$  der Amplituden zu Beginn des Experimentes durch Stimulation mit verschiedenen Reizstärken erhoben wurden.

### 4.2. Induktion epileptiformer Aktivität im Subiculum und Gyrus dentatus

Im Subiculum konnte unter Einwaschen einer Perfusionslösung mit erhöhter Kaliumionen-Konzentration (10 - 12 mM) eine epileptiforme Aktivität ausgelöst werden.

Im Gyrus dentatus wurde bereits gezeigt, dass diese-Perfusionslösung in Kombination mit Moosfaserstimulation verwendet werden muss [96, 97]. In der vorliegenden Studie wurde die Kaliumionen-Konzentration in der Perfusionslösung

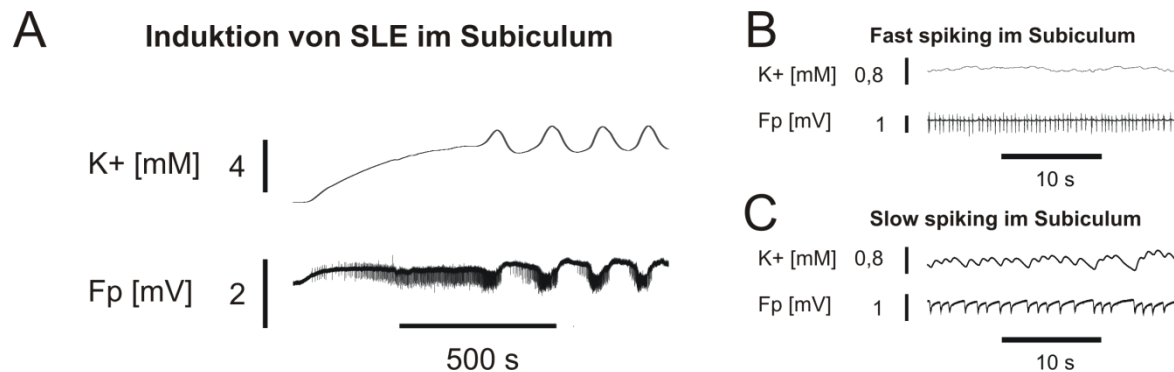


von 12 mM auf 10 mM verdünnt, wenn epileptiforme Ereignisse bereits bei relativ geringen  $[K^+]_e$ -Werten (6 - 8 mM) auftraten.

Daraus ergab sich, dass Induktion und Stabilisierung epileptiformer Aktivität in 63/116 Hippocampus-Schnitten mit 10 mM  $[K^+]$  erfolgten (im Subiculum 21/39 (54 %), im Gyrus dentatus 42/77 (55 %)), in den restlichen Schnitten mit 12 mM.

Im Subiculum und Gyrus dentatus waren wie bei Gabriel et al. [96] im Gyrus dentatus oft schon visuell drei Arten epileptiformer Aktivität zu unterscheiden (Abbildung 3 und Abbildung 4): periodisch wiederkehrende krampfartige Ereignisse längerer Dauer (seizure like event, SLE, Dauer  $\geq 5$  s, Ereignisrate maximal 3,7/min) und spike-artige Ereignisse kurzer Dauer ( $< 5$  s), deren Ereignisraten (minimal 6,7/min; maximal 114/min) als langsame Folgen ( $< 40$ /min, slow spiking) oder als schnelle Folgen ( $\geq 40$ /min, fast spiking) kategorisiert werden konnten.

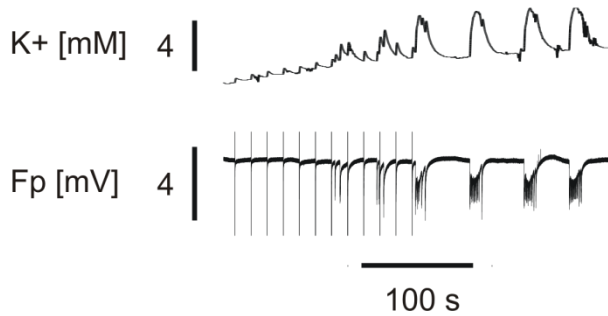
Die Parameter für die einzelnen Aktivitätsarten sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.



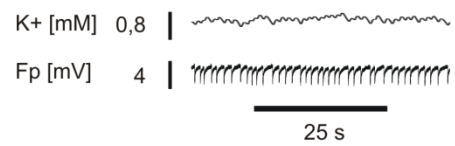
**Abbildung 3 Induktion epileptiformer Aktivität im Subiculum.**

A: Beispiel für die Induktion von SLE durch Einwaschen einer 12 mM Kalium-ACSF-Lösung. B, C: Beispiele für fast spiking und slow spiking. A-C oben: Verlauf der extrazellulär gemessenen Kaliumionen-Konzentration (mM); unten: Verlauf des Feldpotentials (mV).

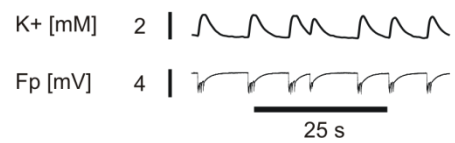
### A Induktion von SLE im Gyrus dentatus



### B Fast spiking im Gyrus dentatus



### C Slow spiking im Gyrus dentatus



#### Abbildung 4 Induktion epileptiformer Aktivität im Gyrus dentatus.

A: Beispiel für die Induktion von SLE durch Stimulation im Hilus und Einwaschen einer 12 mM Kalium-ACSF-Lösung. Die Stimulation folgte im Abstand von 15 s und wurde bei Stimulations-unabhängigem Auftreten von epileptiformer Aktivität beendet. B, C: Beispiele für fast spiking und slow spiking. A-C oben: Verlauf der extrazellulär gemessenen Kaliumionen-Konzentration (mM); unten: Verlauf des Feldpotentials (mV).

Aktivitätsart	Latenzzeit (min)	Kalium-Schwelle (mM)	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
slow spiking	34,2 ± 2,23	8,1	34,7 ± 1,67	0,1 ± 0,06	0,5 ± 0,17	0,3 ± 0,12	70,7 ± 70,67	9,3	9,4	0,1
n	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1
fast spiking	7,3 ± 1,25	6,9 ± 2,54	78 ± 36	0,8	1,6 ± 0,05	0,1 ± 0,03				
n	2	2	2	1	2	2				
SLE	10 ± 1,07	7,1 ± 0,37	0,9 ± 0,11	2,1 ± 0,25	3,5 ± 0,34	40,1 ± 4,72	16,4 ± 3,13	8,3 ± 0,24	11,5 ± 0,43	3,2 ± 0,31
n	30	25	35	34	35	35	34	34	34	34
p	0,054	0,793	<b>0,005</b>	<b>0,044</b>	<b>0,025</b>	<b>0,005</b>	1,000	0,373	0,235	0,092

**Tabelle 2** Tabellarische Darstellung charakteristischer Parameter der drei Aktivitätsarten im Subiculum

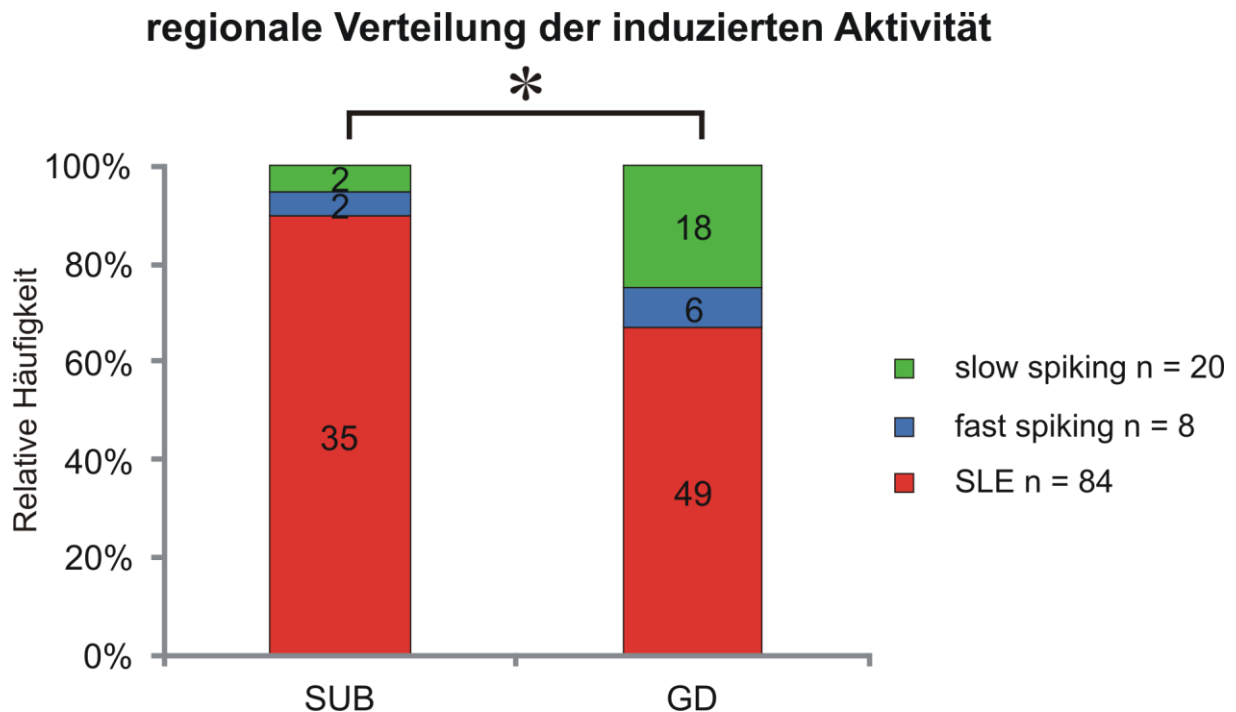
Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Hippocampus-Schnitte und im nicht-parametrischen Test nach Kruskal-Wallis ermittelte zweiseitige Signifikanz. In der fast spiking-Aktivität ließen sich keine transienten Potentialfluktuationen messen. Bei niedriger Ereignisamplitude war auch kein Ereignis-assoziiertes Kaliumanstieg zu sehen.

Aktivitätsart	Latenzzeit (min)	Kalium-Schwelle (mM)	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
slow spiking	9,6 ± 0,92	6,6 ± 0,45	17,9 ± 2,37	1,4 ± 0,28	2 ± 0,34	1 ± 0,27	103,6 ± 16,48	8,7 ± 0,42	9,2 ± 0,44	0,6 ± 0,13
n	18	14	18	16	18	18	14	16	16	16
fast spiking	10,9 ± 2,79	4,8 ± 1,02	60,7 ± 7,67	1 ± 0,35	1,5 ± 0,31	0,1 ± 0,03	22,7 ± 10,26	7,1 ± 2,33	7,2 ± 2,45	0,1 ± 0,13
n	6	5	6	4	6	6	4	3	3	3
SLE	12,8 ± 1,81	7,3 ± 0,32	1,3 ± 0,12	2,3 ± 0,27	3,3 ± 0,31	41 ± 7,7	17,1 ± 4	8,6 ± 0,25	11,7 ± 0,47	3,2 ± 0,37
n	45	42	49	49	49	49	46	49	49	49
p	0,966	<b>0,039</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,122	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,605	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>

**Tabelle 3** Tabellarische Darstellung charakteristischer Parameter der drei Aktivitätsarten im Gyrus dentatus

Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Hippocampus-Schnitte und im nicht-parametrischen Test nach Kruskal-Wallis ermittelte zweiseitige Signifikanz.

In Subiculum und Gyrus dentatus waren die drei Arten epileptiformer Aktivität mit unterschiedlicher Häufigkeit zu beobachten (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Relative und absolute Häufigkeiten der induzierten Aktivitätsarten in Subiculum (SUB) und Gyrus dentatus (GD), n = 112, p = 0,016, Fishers exakter Test

### **4.3. Welchen Einfluss haben pathologische Veränderungen des Hippocampus auf die induzierte Aktivität?**

Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie sind im Hippocampus morphologische Veränderungen in Bezug auf Sklerose und Gliose von Wyler beschrieben und klassifiziert worden [103]. Es wurde untersucht, ob eine Beziehung zwischen Wyler-Klassifikation und der induzierten Aktivitätsart besteht (Abbildung 6, Abbildung 7). Die Wyler-Klassifikation schließt das Subiculum nicht mit ein. Jedoch wurden im Subiculum von humanen sklerotischen Hippocampusschnitten depolarisierende GABAerge Signale gesehen [33].

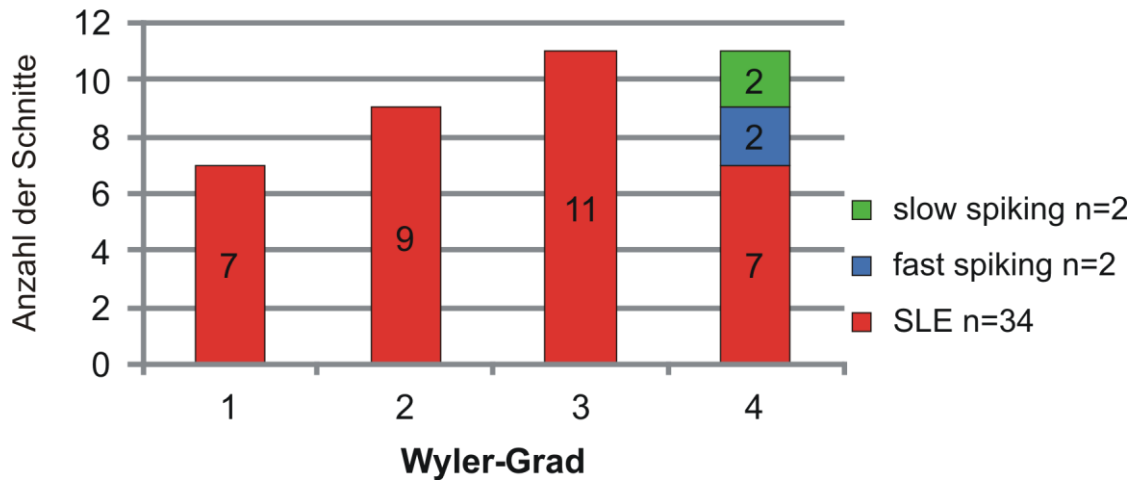
Daher werden von den Autoren reaktive plastische Veränderungen im Subiculum diskutiert [33]. Hier konnte im Subiculum kein Zusammenhang zwischen Sklerose und induzierter Aktivität festgestellt werden. Im Gyrus dentatus trat Spiking-Aktivität signifikant häufiger in sklerotischen Gehirnschnitten auf.

Da bei einer hippocampalen Sklerose eine synaptische Reorganisation charakteristisch ist [96], wurde untersucht, ob dies Einfluss auf die notwendige Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration hat.

Im Subiculum zeigte sich kein Unterschied zwischen sklerotischen und nicht-sklerotischen Gehirnschnitten in Bezug auf die Höhe der eingewaschenen Kaliumkonzentration (10 mM: 9 Schnitte non-HS vs. 12 Schnitte HS, 12 mM: 8 Schnitte non-HS vs. 10 Schnitte HS,  $p = 1,000$ , Fishers exakter Test).

Im Gyrus dentatus wurde bei sklerotischen Gehirnschnitten ( $n = 46$ ) häufiger eine niedrigere Kaliumkonzentration als in nicht-sklerotischen Gehirnschnitten ( $n = 27$ ) zur Induktion verwendet (10 mM: 11 non-HS vs. 31 HS, 12 mM: 16 non-HS vs. 15 HS,  $p = 0,031$ , Fishers exakter Test).

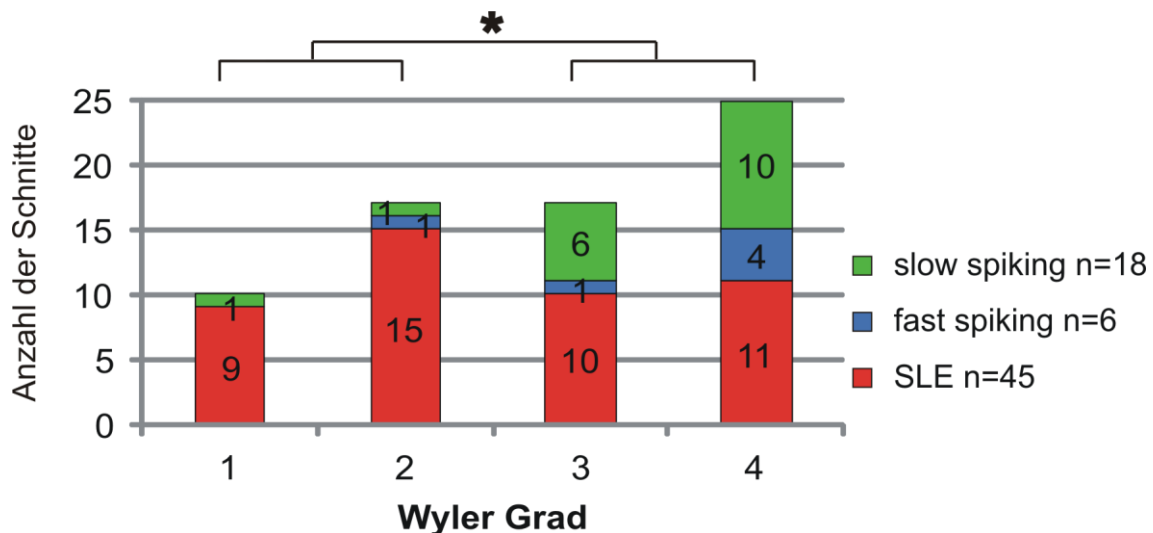
## Wylergrad und Art der induzierten Aktivität im Subiculum



**Abbildung 6 Wyler-Grad im Hippocampus-Schnitt und induzierte Aktivitätsart im Subiculum**

Die Gehirnschnitte sind nach Wyler Grad 1 bis 4 klassifiziert. Von insgesamt 38 Schnitten wiesen sieben einen Wyler-Grad 1 (18,4 %) und neun einen Wyler-Grad 2 auf (23,7 %). Von 38 Schnitten bestand also bei 16 keine Sklerose (42,1 %). Ein Wyler-Grad 3 und 4 wurde jeweils in 11 Gehirnschnitten festgestellt (je 28,9 %; insgesamt 57,8 % Schnitte mit Sklerose) Die je zweimal auftretende fast spiking- und slow spiking-Aktivität fand sich nur bei Schnitten mit Wyler Grad 4 (je 18,2 % in Wyler 4, n = 38, p = 0,066, Fishers exakter Test).

## Wyler-Grad und Art der induzierten Aktivität im Gyrus dentatus



**Abbildung 7 Wyler-Grad und induzierte Aktivitätsart im Gyrus dentatus**

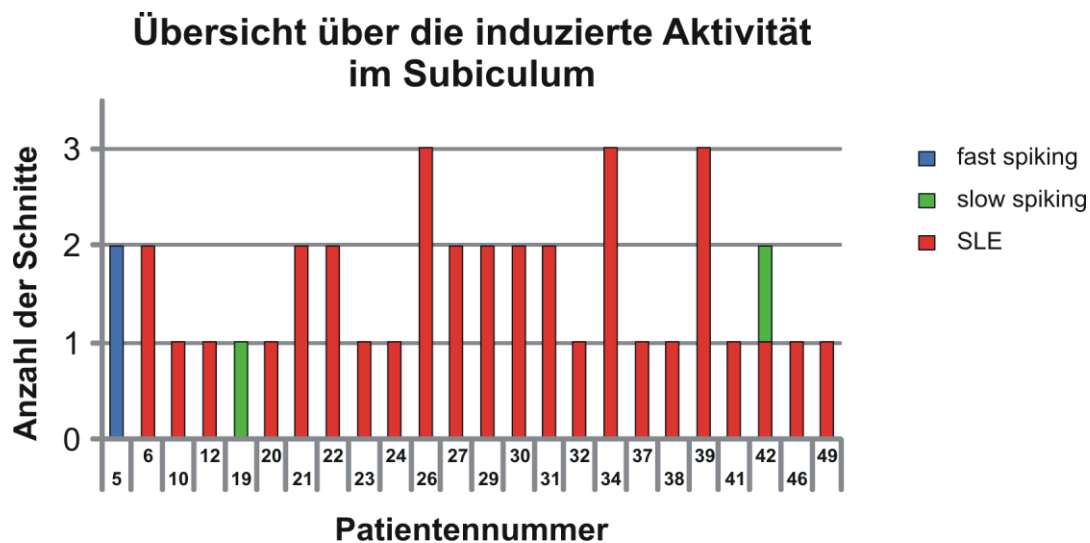
Übersicht über die induzierte Aktivität im Gyrus dentatus. Die Gehirnschnitte sind nach Wyler Grad 1 bis 4 klassifiziert. Bei Schnitten, die keine hippocampale Sklerose aufwiesen (Wyler 1 und 2), wurden in 88,9 % SLE, in 3,7 % fast spiking-Aktivität und in 7,4 % slow spiking-Aktivität induziert. Im Gegensatz dazu wurden in sklerotischen Gehirnschnitten (Wyler 3 und 4) in 50,0 % SLE, in 11,9 % fast und in 38,1 % slow spiking-Aktivität induziert. Der Verteilungsunterschied war mit  $p = 0,034$  in Fishers exaktem Test signifikant.

#### 4.4. Treten bei einem Patienten mit mehreren untersuchten Gehirnschnitten verschiedene Aktivitätsarten auf?

Subiculum: Von zwölf Patienten mit mehr als einem untersuchten Gehirnschnitt, fand sich bei einem Patienten (Nr. 42) ein heterogenes Induktionsmuster (8,3 %). Bei 11 Patienten sind in zwei oder mehr Gehirnschnitten identische Aktivitätsarten induziert worden (Abbildung 8).

Gyrus dentatus: Bei 18 von 41 Patienten konnte mehr als ein Gehirnschnitt untersucht werden. Die induzierte Aktivität war bei 5 Patienten heterogen (27,8 %) (Abbildung 9).

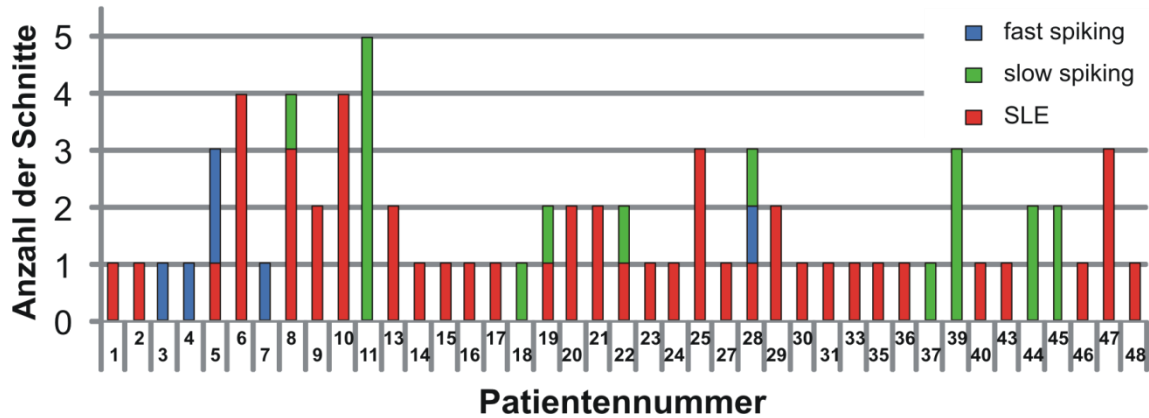
In beiden Gehirnregionen konnten SLE in mehr als einem Gehirnschnitt induziert werden, die jeweils zu einem Patienten gehörten: im Subiculum in 10 von 12 Fällen und im Gyrus dentatus in 10 von 18 Fällen.



**Abbildung 8 Übersicht über die induzierte Aktivität im Subiculum**

24 Patienten, bei denen Experimente im Subiculum durchgeführt wurden, sind mit ihrer Patientennummer dargestellt. Die Balkenhöhe stellt die Anzahl der untersuchten Schnitte dar und die Farbe die Art der induzierten Aktivität.

## Übersicht über die induzierte Aktivität im Gyrus dentatus



**Abbildung 9 Übersicht über die induzierte Aktivität im Gyrus dentatus**

41 Patienten, bei denen Experimente im Gyrus dentatus durchgeführt wurden, sind mit ihrer Patientennummer dargestellt. Die Balkenhöhe stellt die Anzahl der untersuchten Schnitte dar und die Farbe die Art der induzierten Aktivität.

In den folgenden Abschnitten werden zuerst die Ergebnisse der Experimente im Subiculum und anschließend für den Gyrus dentatus dargestellt.

## 4.5. Subiculum

### 4.5.1. Lässt sich die epileptiforme Aktivität in vitro durch das Einwaschen von Antikonvulsiva supprimieren?

Im Subiculum von 39 Hippocampus-Schnitten konnte epileptiforme Aktivität ausgelöst werden. Von diesen wurden 25 auf die Wirkung einer Behandlung mit einem AED untersucht. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen, dass sich bei Gabe der AED vier verschiedene Effekte auf SLE beobachten ließen:

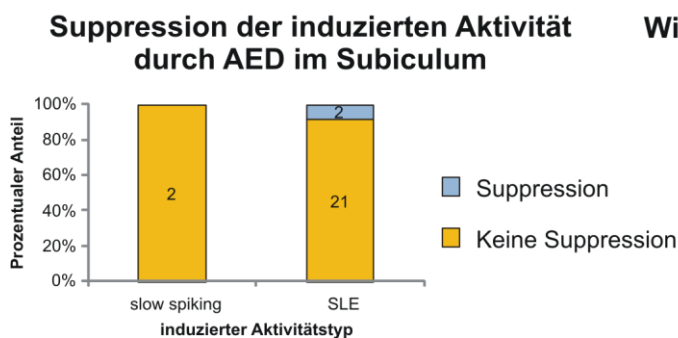
Suppression (8,7 % der SLE, 2 Schnitte),

Resistenz (69,6 % der SLE, 16 Schnitte),

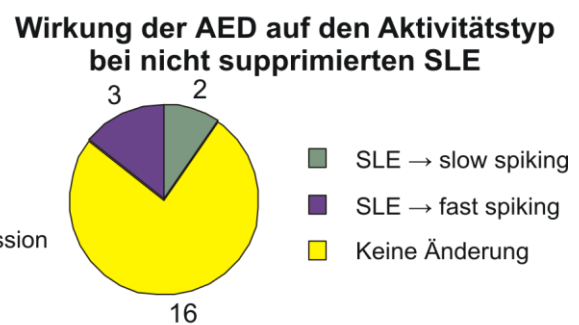
Übergang in fast spiking-Aktivität (13 % der SLE, 3 Schnitte),

Übergang in slow spiking-Aktivität (8,7 % der SLE, 2 Schnitte).

A



B



#### Abbildung 10 Qualitative Effekte von AED auf epileptiforme Aktivität im Subiculum

A Relativer Anteil der Suppressionen an Schnitten mit induzierter slow spiking-Aktivität und SLE. Slow spiking-Aktivität wurde nicht supprimiert (n = 2). SLE konnten in 8 % der Fälle supprimiert werden (n = 23). B Die nicht supprimierten SLE (n = 21) behielten die Aktivitätsart (SLE) in 76,2 % bei, wurden in 9,5 % von slow spiking- und in 14,3 % von fast spiking-Aktivität ersetzt.

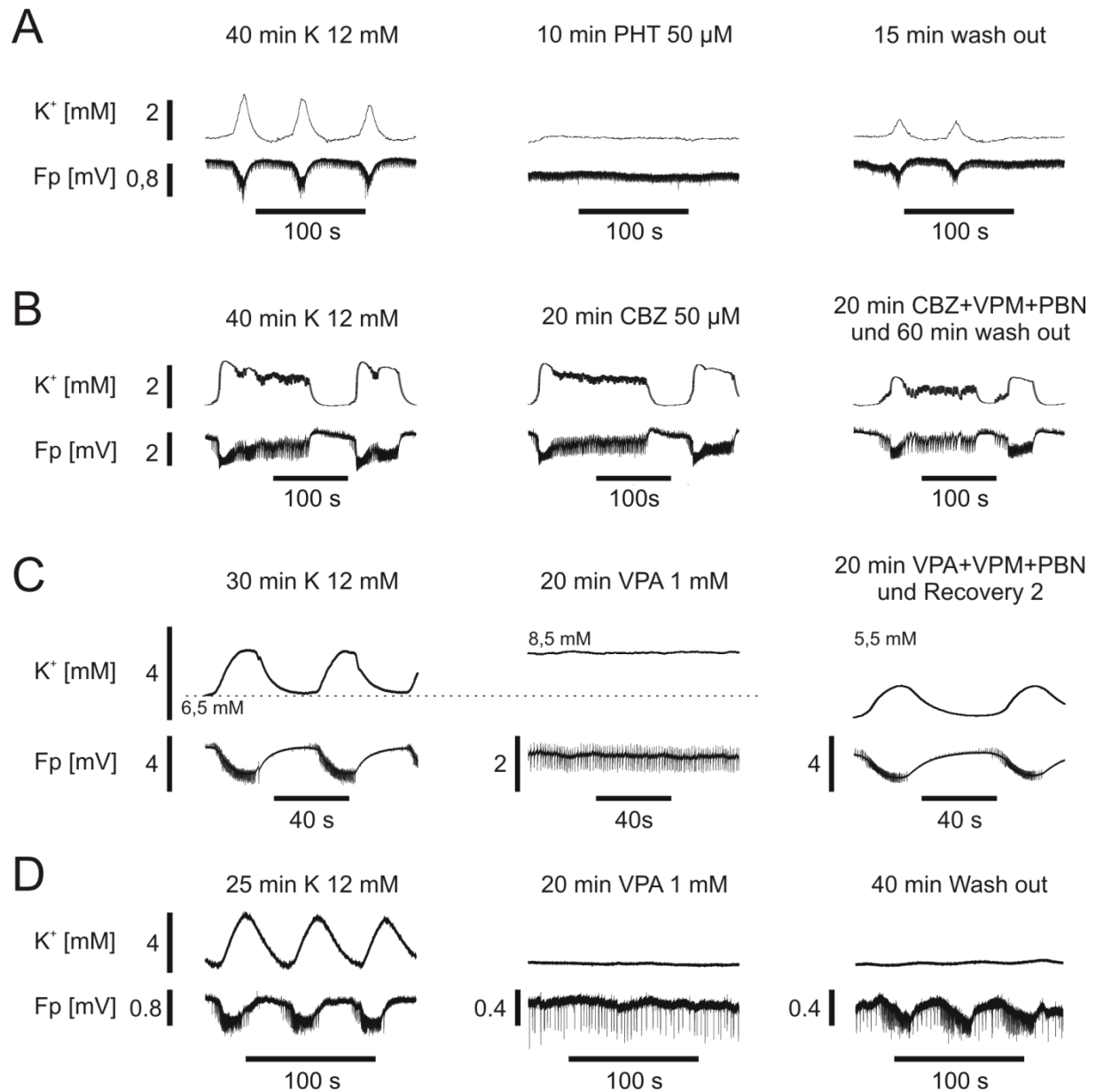
Im Folgenden wird eine Aktivität, die die Aktivitätsart nicht ändert, als pharmakoresistent bezeichnet.

Das Gewebe, in dem die Suppressionen erzielt wurden, stammte von den Patienten 37 und 41. Patient 37 wurde bis zur Operation mit Carbamazepin und Levetiracetam behandelt. Die Suppression wurde nach Einwaschen von Valproat beobachtet. Bei Patient 41 war klinisch eine Therapie mit Carbamazepin, Valproat und Levetiracetam erfolglos. Die Suppression wurde nach Einwaschen von Phenytoin registriert. Zwei



Schnitte mit slow spiking-Aktivität zeigten bei Gabe des Antikonvulsivums (VPA, PHT) einen Wechsel zu SLE (Patient 19 und 42).

## Effekte von AED im Subiculum



**Abbildung 11 Wirkungen von AED auf SLE im Subiculum**

A-D: Originalabbildungen, oben: extrazellulär gemessene Kaliumionen-Konzentration in mM; unten: Feldpotential in mV. A Die epileptiforme Aktivität lässt sich selten supprimieren (n = 2), B Die induzierten seizure like events erweisen sich überwiegend als pharmakoresistent (n = 16). C Die induzierten SLE werden nach Einwaschen des Antikonvulsivums durch fast spiking-Aktivität ersetzt (n = 3). Die gemessene extrazelluläre Kaliumkonzentration ist während der spiking-Aktivität erhöht. D Induzierte SLE werden nach Einwaschen des Antikonvulsivums durch slow spiking-Aktivität ersetzt (n = 2).

Die Aktivitätsparameter der pharmakoresistenten SLE wurden bestimmt und mit den Aktivitätsparametern der Kontrollaktivität verglichen (Tabelle 4).

	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
<b>Kontrolle</b>	0,93 ± 0,19	1,72 ± 0,33	2,89 ± 0,38	44,18 ± 7,27	16,57 ± 4,68	8,62 ± 0,27	12,28 ± 0,41	3,66 ± 0,48
<b>AED</b>	1,09 ± 0,17	1,39 ± 0,39	2,44 ± 0,42	38,39 ± 7,44	14,61 ± 4,44	8,81 ± 0,32	11,46 ± 0,56	2,65 ± 0,57
<b>n</b>	16	16	16	16	15	15	15	15
<b>p</b>	0,269	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,352	0,117	0,132	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>

**Tabelle 4 Aktivitätsparameter von SLE nach Einwaschen von AED im Subiculum**

Darstellung der Parameter der Kontrollaktivität (Kontrolle) und nach AED-Applikation (AED) als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler; (n) Anzahl der analysierten Schnitte; (p) im nicht-parametrischen Test nach Wilcoxon ermittelte 2-seitige Signifikanz.

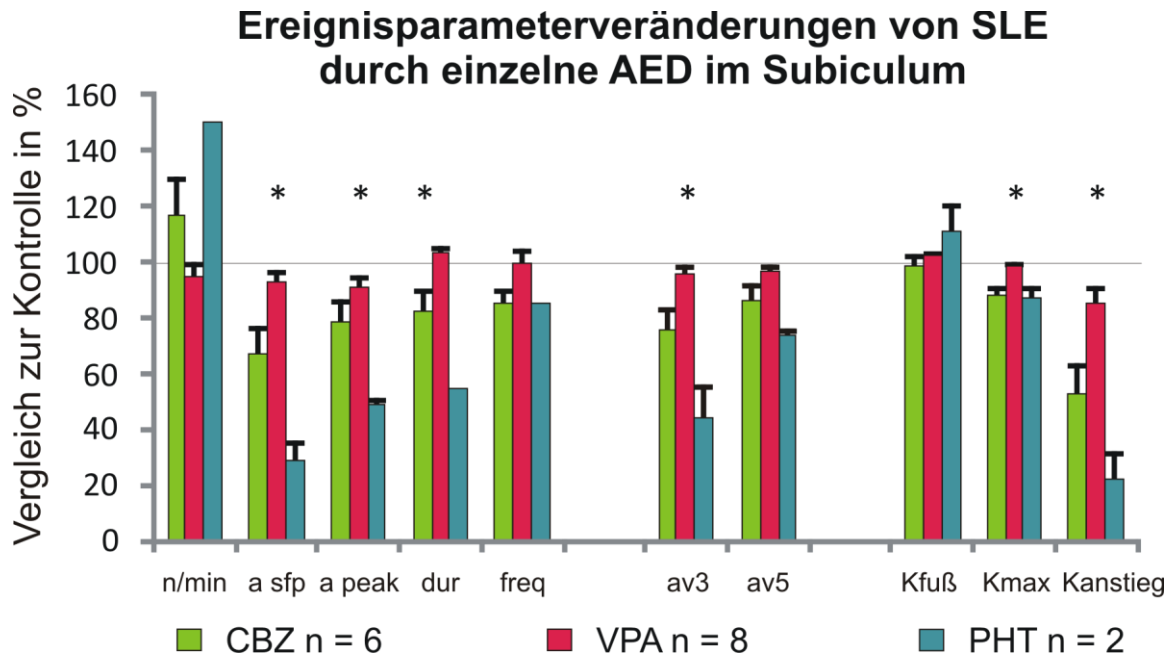
#### **4.5.2. Wie unterscheiden sich Carbamazepin, Valproat und Phenytoin in der Wirkung auf die induzierte epileptiforme Aktivität im Subiculum?**

SLE im Subiculum konnten nicht durch Carbamazepin supprimiert werden (n = 8). Valproat bewirkte bei 8,3 % der SLE eine Suppression (n = 12), Phenytoin bei 33 % (n = 3). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (n = 23, p = 0,369, Fishers exakter Test).

Abbildung 12 zeigt die Modulation der SLE, die sich nach der AED-Behandlung für die einzelnen AED im Vergleich als resistent erwiesen. Bei der paarweisen Überprüfung mit dem Wilcoxon-Test unter Beibehaltung des Signifikanzniveaus von 0,05 bestanden Unterschiede zwischen VPA und PHT; unter Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni ( $\alpha = 0,05/3 \approx 0,017$ ) ließ sich der Unterschied jedoch nicht sichern.

Änderungen der Aktivitätsart von SLE zu spiking-Aktivität traten nach dem Einwaschen von Carbamazepin (n = 8) und Valproat (n = 12) auf: Je ein Wechsel von SLE zu slow spiking-Aktivität bei CBZ (12,5 %) und bei VPA (8,3 %), ein Wechsel zu fast spiking-Aktivität unter CBZ in 12,5 % und in zwei Fällen ein Wechsel zu fast spiking-Aktivität unter VPA (16,7 %). Je ein Schnitt mit slow spiking-Aktivität wurde mit VPA und PHT behandelt, in beiden Fällen wurde die Aktivität durch SLE

ersetzt. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen AED (n = 23, p = 0,862, Fishers exakter Test).



**Abbildung 12 Vergleich der verbleibenden Parameter im Vergleich zur Kontrolle nach Einwaschen der einzelnen AED im Subiculum**

n/min: Ereignisrate/min, a sfp: langsame Komponente der Ereignis-Amplitude, a peak: maximale Amplitude des Ereignisses, dur: Ereignisdauer, freq: Frequenz der Potentialfluktuationen, av3: Mittelwert aus a sfp, a peak und dur, av5: Mittelwert aus allen 5 Ereignis-Parametern, Kfuß: Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn, Kmax: maximale Kaliumkonzentration während des Ereignisses, Kanstieg: Differenz zwischen Kfuß und Kmax. Signifikante Unterschiede ergaben sich für a sfp (p = 0,008), a peak (p = 0,021), dur (p = 0,024), av3 (p = 0,017), Kmax (p = 0,008) und Kanstieg (p = 0,010), Kruskal-Wallis-Test.

### 4.5.3. Kontrollversuche

Es wurden Versuche zur Beobachtung der Stabilität epileptiformer Aktivität ohne Substanzapplikation durchgeführt. Die Aktivität von zwei Schnitten mit SLE, die über 60min ohne Substanzapplikation beobachtet wurden, blieb stabil und zeigte keine signifikante Parameterveränderung.

Da die verwendeten MDTI Verapamil und Probenecid selbst Effekte auf epileptiforme Aktivität haben können, wurde die Wirkung dieser Pharmaka auf die induzierte Aktivität untersucht.

Bei 11 Schnitten, von denen 9 SLE und 2 slow spiking-Aktivität aufwiesen, wurde die Wirkung der MDTI nach einer Einwaschzeit von 20 min registriert. VPM, PBN oder VPM + PBN wurden bei je drei Schnitten, die SLE zeigten, eingewaschen und veränderten die Aktivitätsart nicht. Statistisch ließen sich keine Unterschiede in der Wirkung von Verapamil alleine, Probenecid alleine und Verapamil und Probenecid in Kombination feststellen.

Die neun Schnitte mit SLE wurden für die Analyse der Parameterveränderungen zunächst zusammengefasst. Hier zeigten sich signifikante Parameterveränderungen (Tabelle 5).

	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
<b>Kontrolle</b>	0,92 ± 0,18	3,17 ± 0,42	5,39 ± 0,61	27,84 ± 5,74	29,26 ± 8,07	7,45 ± 0,37	10,12 ± 0,53	2,67 ± 0,39
<b>MDTI</b>	1,35 ± 0,26	2,63 ± 0,39	4,64 ± 0,62	21,29 ± 3,08	24,58 ± 7,26	7,78 ± 0,31	9,64 ± 0,47	1,86 ± 0,25
<b>n</b>	9	9	9	9	8	9	9	9
<b>p</b>	<b>0,012</b>	0,074	<b>0,027</b>	0,203	<b>0,016</b>	0,074	<b>0,039</b>	<b>0,027</b>

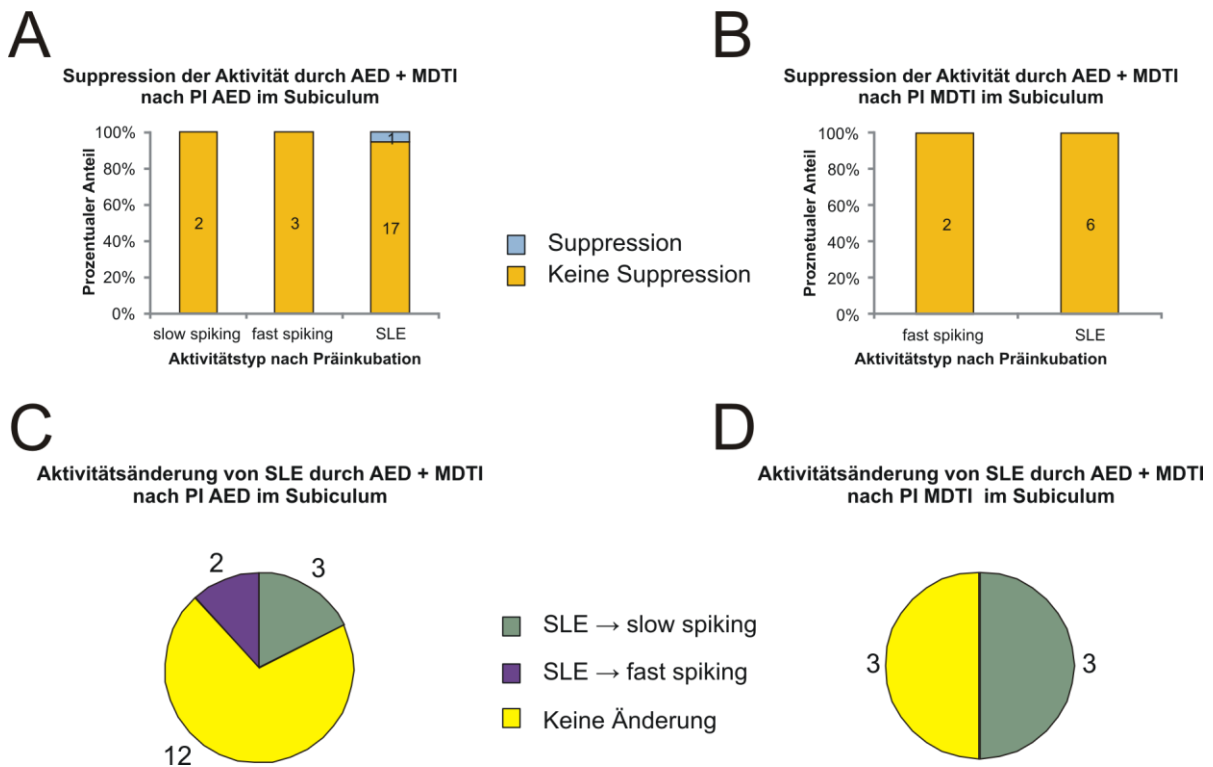
**Tabelle 5 Parameter der SLE während der Kontrollaktivität und nach MDTI-Applikation**

Parameter der seizure like events während der Kontrolle und nach Einwaschen eines oder zweier MDTI als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der analysierten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon.

In zwei Schnitten mit slow spiking-Aktivität hatte Verapamil keinen Effekt auf die Aktivitätsart.

#### 4.5.4. Wirkung der Koapplikation von AED und MDTI auf epileptiforme Aktivität nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI im Subiculum

Das Einwaschen von AED oder MDTI ergab im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung auf die induzierte Aktivität ( $n = 36$ ,  $p = 0,350$  Fishers exakter Test). Es wurde nun untersucht, ob eine längere Einwaschzeit von AED oder MDTI vor der Koapplikation von AED + MDTI einen Effekt hatte.



**Abbildung 13 Wirkungen von AED + MDTI nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI im Subiculum**

A, B: Durch AED + MDTI erzielte Suppressionsrate der Aktivität, die nach Präinkubation mit AED (A) und MDTI (B) zu beobachten war. C, D: Aktivitätswechsel bei SLE, die nach der Präinkubation mit AED (C) und MDTI (D) registriert wurden.

Abbildung 13 zeigt die qualitative Wirkung von AED + MDTI nach Präinkubation mit AED und Präinkubation mit MDTI: Es wurde eine Suppression von SLE bei einem Schnitt (5,6 %) von Patient 46 in der Gruppe mit AED-Präinkubation beobachtet. Bei Schnitten mit AED-Präinkubation zeigten die resistenten SLE im Gegensatz zur Gruppe mit MDTI-Präinkubation signifikante Parameteränderungen (Tabelle 6).

A	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
PI AED	0,99 ± 0,22	1,53 ± 0,51	2,51 ± 0,55	46,72 ± 10,92	18,2 ± 5,21	8,59 ± 0,35	11,57 ± 0,72	2,99 ± 0,72
AED + MDTI	0,87 ± 0,15	1,32 ± 0,46	2,29 ± 0,48	47,74 ± 11,96	13,76 ± 4,73	8,69 ± 0,37	10,98 ± 0,73	2,29 ± 0,64
n	12	12	12	12	12	10	10	10
p	0,945	<b>0,049</b>	0,092	0,910	<b>0,002</b>	0,492	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>

B	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
PI MDTI	1,32 ± 0,13	3,14 ± 0,51	4,68 ± 0,79	28,05 ± 2,33	14,93 ± 1,34	8,18 ± 0,29	10,13 ± 0,61	1,95 ± 0,49
AED + MDTI	1,49 ± 0,28	1,64 ± 0,55	2,76 ± 0,82	28,41 ± 2,19	8,39 ± 0,48	8,33 ± 0,53	9,45 ± 0,29	1,11 ± 0,41
n	3	3	3	3	2	3	3	3
p	1,000	0,250	0,250	1,000	0,500	0,750	0,500	0,250

**Tabelle 6 Parameter der SLE nach Präinkubation mit einem AED bzw. MDTI und nach Einwaschen von AED + MDTI**

A: Präinkubation (PI) AED, B: PI MDTI, als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der analysierten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon.

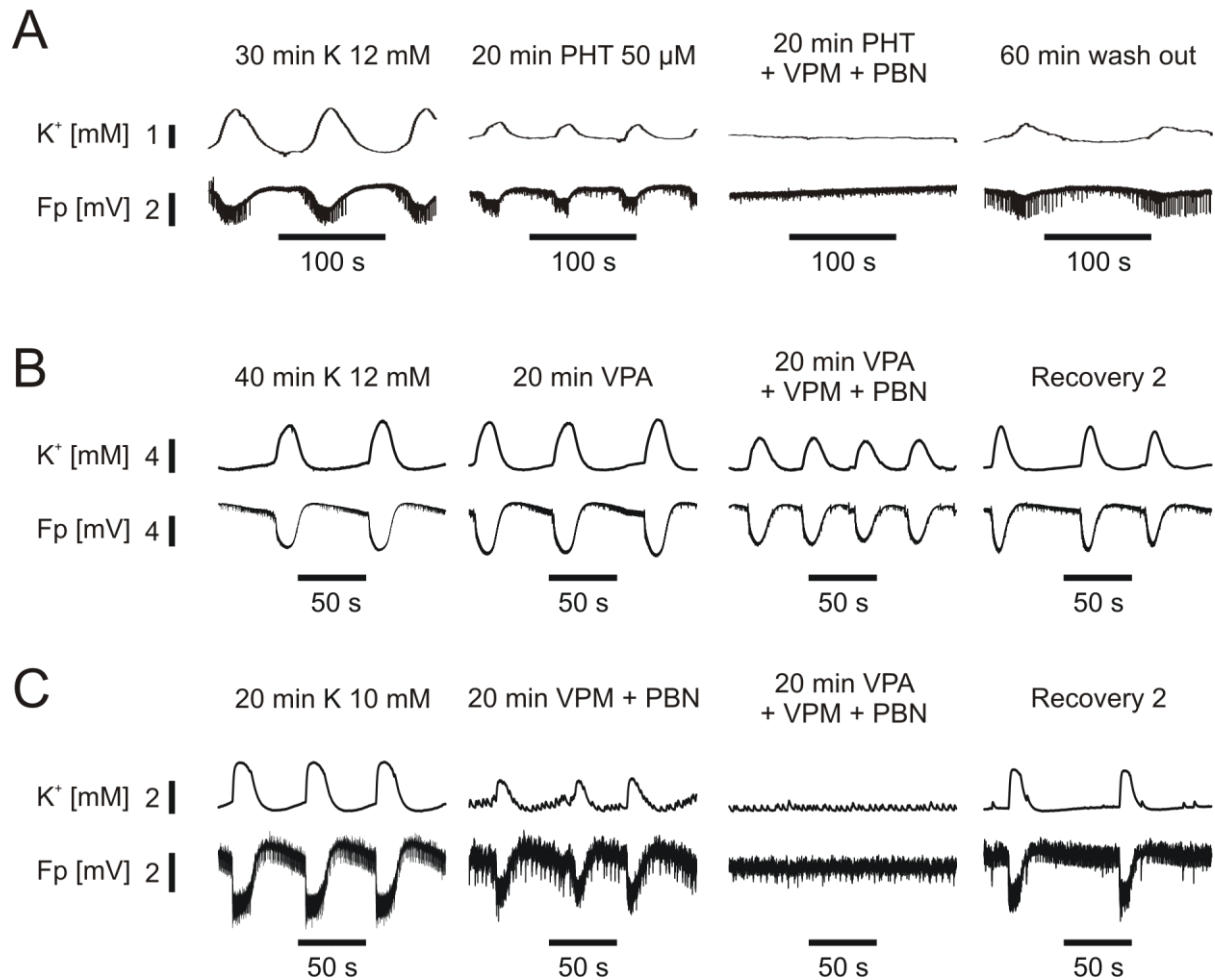
#### 4.5.5. Wirkung von AED + MDTI unabhängig von der Präinkubation

Da es sich bei der Pharmakotherapie der Epilepsie um eine Dauertherapie handelt und damit die "Einwaschzeit" keine Rolle spielt, wurden die Untersuchungsgruppen der Gehirnschnitte mit SLE für PI AED und PI MDTI zusammengefasst, um einen Gesamteffekt der Koapplikation sichern zu können.

Es wurden 31 Schnitte, die mit AED bzw. MDTI vorbehandelt wurden und sich als pharmakoresistent erwiesen, auf den Effekt einer Koapplikation von AED und MDT untersucht. Davon zeigten 24 Schnitte SLE.

Bei einem Gehirnschnitt, der nach der Induktion SLE mit Resistenz gegenüber Phenytoin zeigte, wurde die Aktivität nach Koapplikation mit VPM + PBN supprimiert (4,2 %). Daneben konnte ein Wechsel von SLE zu spiking-Aktivität in 8 Fällen gesehen werden (slow spiking = 6, fast spiking = 2). 15 Schnitte zeigten keine Veränderung der Aktivitätsart (65,2 % der pharmakoresistenten SLE, bzw. 62,5 % aller SLE) (Abbildung 14).

## Effekte von AED + MDTI im Subiculum



**Abbildung 14 Effekte von AED + MDTI im Subiculum**

A-C: Originalabbildungen, oben: extrazellulär gemessene Kaliumionen-Konzentration in mM; unten: Feldpotential in mV. Recovery 2: nach Auswaschen aller Substanzen inklusive Kalium und erneuter Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration. A Die epileptiforme Aktivität ließ sich in einem Fall supprimieren, B Die induzierten seizure like events waren überwiegend pharmakoresistent (n = 15). C Die induzierten SLE wurden nach Einwaschen des Antikonvulsivums durch spiking-Aktivität ersetzt (hier fast spiking).

Neben den in Abbildung 15 gezeigten Veränderungen der Aktivitätsart bei SLE, die nach der Präinkubation erhalten waren, wurde in 20 % fast spiking-Aktivität durch slow spiking-Aktivität ersetzt (n = 5). Ob VPM, PBN oder VPM und PBN eingewaschen wurde, hatte keinen Einfluss auf die Suppressionsrate oder Art der Aktivitätsänderung (jeweils VPM n = 4, PBN n = 5, VPM + PBN n = 13, p = 1,000, Fishers exakter Test).

### Aktivitätsänderung von SLE durch AED + MDTI im Subiculum



Abbildung 15 Aktivitätsänderung von SLE durch AED + MDTI im Subiculum

Bei der Untersuchung der Aktivitätsparameter der persistierenden SLE ergaben sich signifikant niedrigere Werte nach Koapplikation von AED + MDTI im Vergleich zur Präinkubation (Tabelle 7).

Subiculum	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
Präinkubation	1,05 ± 0,18	1,85 ± 0,44	2,94 ± 0,51	42,98 ± 8,89	17,73 ± 4,45	8,49 ± 0,27	11,24 ± 0,59	2,74 ± 0,57
AED + MDTI	1,00 ± 0,15	1,38 ± 0,38	2,39 ± 0,41	43,87 ± 9,72	12,99 ± 4,06	8,60 ± 0,30	10,62 ± 0,59	2,02 ± 0,52
n	15	15	15	15	14	13	13	13
p	0,784	<b>0,006</b>	<b>0,015</b>	0,847	<b>0,001</b>	0,414	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>

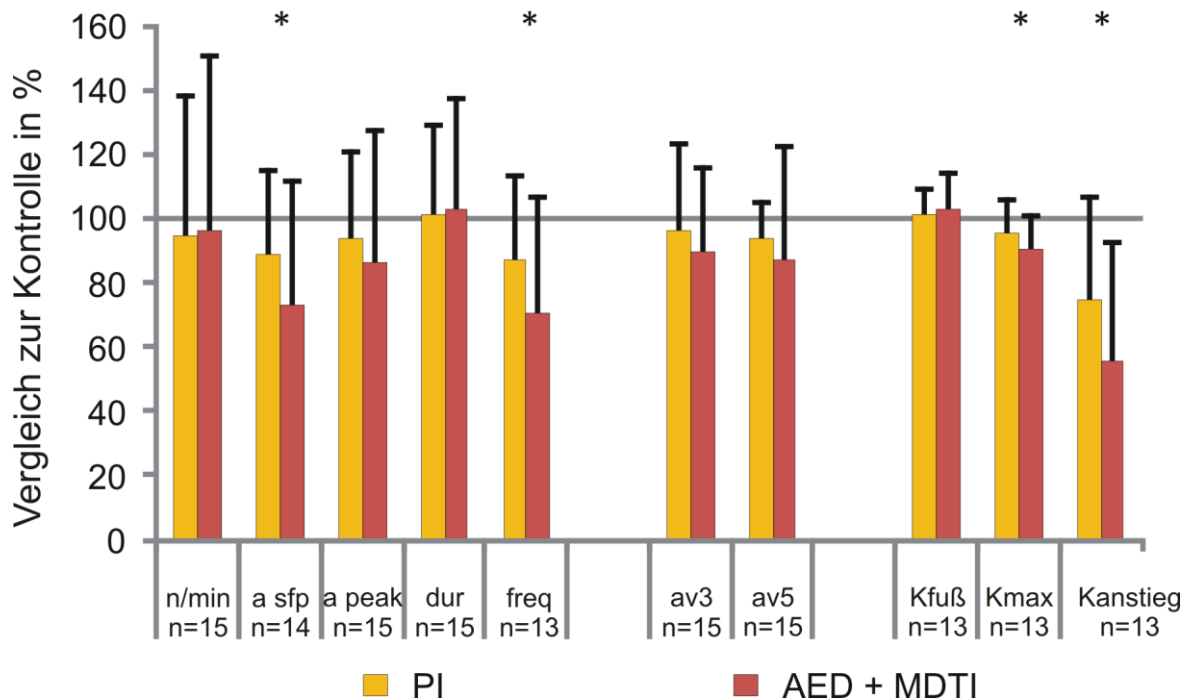
Tabelle 7 Parametermodulation nach Einwaschen von AED + MDTI bei pharmakoresistenten SLE im Subiculum

Parameter der SLE nach Präinkubation mit AED oder MDTI und nach Einwaschen von AED + MDTI als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der analysierten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon. Signifikante Reduktionen zeigten sich bei a sfp, a peak, freq, Kmax und K-Anstieg.

Vergleicht man die Wirkung der Präinkubation mit der Koapplikation in Bezug auf Kontrollaktivität zeigt sich eine signifikant größere Reduktion einzelner Parameter (Abbildung 16).



## Parametermodulation von SLE durch AED + MDTI im Subiculum



**Abbildung 16 Vergleich der verbleibenden Parameter im Bezug zur Kontrolle nach Präinkubation und Koapplikation im Subiculum**

Ordinate: Mittelwerte und Standardabweichung; Abszisse: Merkmalskategorien. n/min: Ereignisrate/min, a sfp: langsame Komponente der Ereignis-Amplitude, a peak: maximale Amplitude des Ereignisses, dur: Ereignisdauer, freq: Frequenz der Potentialfluktuationen, av3: Mittelwert aus a sfp, a peak und dur, av5: Mittelwert aus allen 5 Ereignis-Parametern, Kfuß: Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn, Kmax: maximale Kaliumkonzentration während des Ereignisses, Kanstieg: Differenz zwischen Kfuß und Kmax. Signifikante Unterschiede ergaben sich für a sfp ( $p = 0,013$ ), freq ( $p = 0,023$ ), Kmax ( $p = 0,005$ ) und Kanstieg ( $p = 0,002$ ), Wilcoxon-Test.

Bei der Betrachtung der Patientendaten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Patienten, von dem der supprimierte Gehirnschnitt stammte, und den anderen Patienten festgestellt werden (Tabelle 8). Da von diesem Patienten keine Expressionsdaten bestimmt wurden, war ein entsprechender Vergleich der astrozytären und neuronalen Expression von MRP1, MRP2, MRP5, major vault-Protein und PGP in Subiculum, CA 1-3 und Gyrus dentatus nicht möglich.

Subiculum	Alter		Dauer		Auren/Monat		Anfälle/Monat		SGS/Jahr	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<b>Suppression/Resistenz</b>	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<b>Median</b>	36	39	31	15,75	k. A.	4	0,3	4	1,6	1
<b>Minimum - Maximum</b>	36	15 - 45	31	5 - 45	k. A.	0 - 30	0,3	1 - 30	1,6	0 - 100
<b>n</b>	1	15	1	15	1	14	1	16	1	11
<b>p</b>	0,683		0,258		-		0,100		0,884	

**Tabelle 8 Untersuchung der Patientendaten gruppiert nach Suppression (S) oder Resistenz (R) unter AED + MDTI im Subiculum**

Alter (in Jahren), Dauer der Erkrankung (in Jahren), Anzahl der Anfälle pro Monat und Anzahl der sekundär generalisierten Anfälle pro Jahr, k. A.: keine zuverlässigen Angaben. p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests.

#### 4.5.6. Testung der Erholung der epileptiformen Aktivität

Nach einer 40 - 60-minütigen Auswaschphase wurde überprüft, ob Suppressionen oder Änderungen der Aktivitätsart reversibel waren und ob sich die Aktivitätsparameter von SLE verändert hatten.

Die induzierte Aktivität war nach der Auswaschphase in den Gehirnschnitten, deren Aktivität supprimiert wurde, in 100 % (n = 3) und nach Änderungen der Aktivitätsart in 64,7 % (n = 17) zu sehen.

Die Parameter der SLE, die in der Induktionsphase und der Auswaschphase auftraten, wurden miteinander verglichen. Es zeigten sich bei den Gehirnschnitten mit Substanzapplikation signifikant niedrigere Ereignisamplitudenwerte und eine niedrigere Frequenz der ereignisassoziierten Potentialfluktuationen am Ende des Experiments (a sfp: n = 26, p < 0,001; a peak, n = 26, p < 0,001; freq: n = 27, p < 0,001; Wilcoxon-Test). Der Betrag der ereignisabhängigen maximalen Kaliumkonzentration und der Erhöhung der Kaliumkonzentrationen waren ebenfalls signifikant niedriger (Kmax: n = 25, p < 0,001; Kanstieg: n = 25, p < 0,001; Wilcoxon-Test).

## 4.6. Gyrus dentatus

### 4.6.1. Lässt sich die epileptiforme Aktivität in vitro durch das Einwaschen von Antikonvulsiva supprimieren?

In 73 Hippocampus-Schnitten wurde im Gyrus dentatus epileptiforme Aktivität ausgelöst. Von diesen wurden 48 auf die Wirkung einer Behandlung mit einem AED untersucht, darunter 15 Schnitte mit slow spiking-Aktivität, ein Schnitt mit fast spiking-Aktivität und 32 Schnitte mit SLE. Abbildung 17 zeigt, dass sich wie im Subiculum bei Gabe der AED vier verschiedene Effekte auf SLE beobachten ließen.

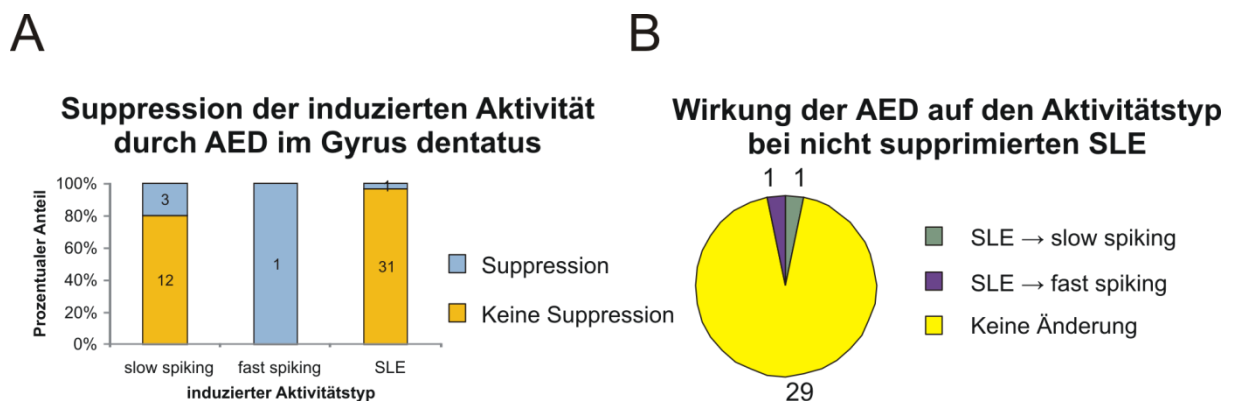
Suppression (3,1 % der SLE, 1 Schnitt),

Resistenz (90,6 % der SLE, 29 Schnitte),

Übergang in fast spiking-Aktivität (3,1 % der SLE, 1 Schnitt),

Übergang in slow spiking-Aktivität (3,1 % der SLE, 1 Schnitt).

Da sich die Morphologie der epileptiformen Aktivität in Subiculum und Gyrus dentatus ähnelt, werden für den Gyrus dentatus ausgewählte Beispiele gezeigt. Zwei Effekte von AED auf SLE sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 17 Qualitative Effekte von AED auf epileptiforme Aktivität im Gyrus dentatus**

A Relativer Anteil der Suppressionen an Schnitten mit induzierter slow spiking-, fast spiking-Aktivität und SLE. B Die nicht supprimierten SLE (n = 31) behielten Aktivitätsart in 93,5 % bei und wurden in 3,1 % von slow spiking- und in 3,1 % von fast spiking-Aktivität ersetzt.

Wie im Subiculum wird eine Aktivität als pharmakoresistent bezeichnet, die die Aktivitätsart nicht ändert.

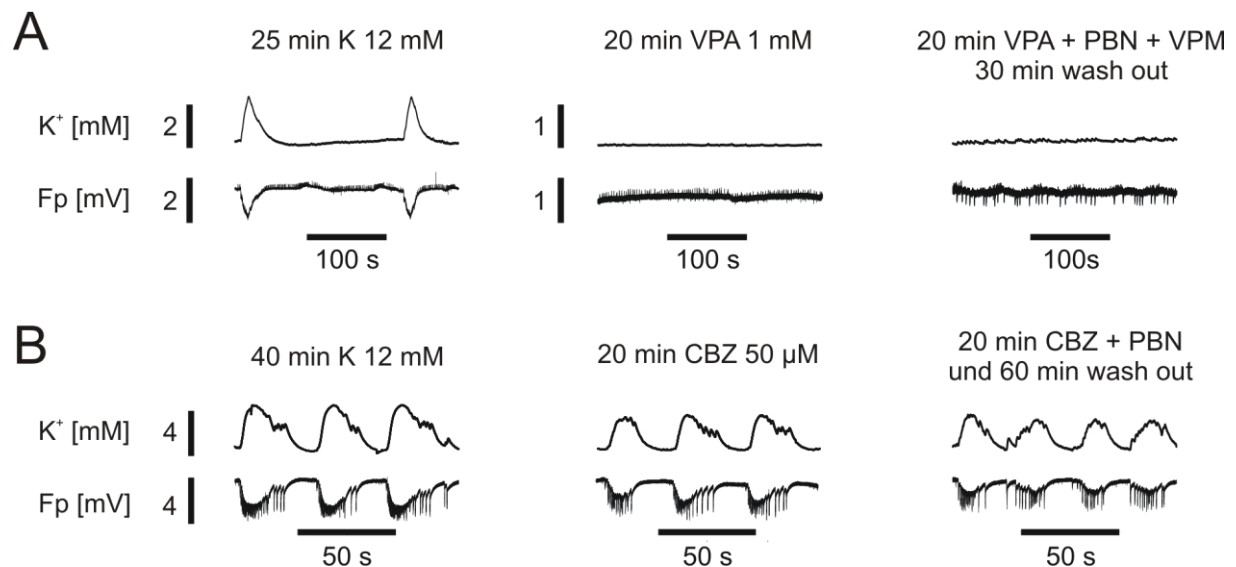
Bei den resistenten SLE waren nach AED-Applikation signifikante Veränderungen der Aktivitätsparameter zu sehen (Tabelle 9).

Gyrus dentatus	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
Kontrolle	1,22 ± 0,17	1,94 ± 0,29	2,7 ± 0,32	44,21 ± 11,31	13,86 ± 4,94	8,5 ± 0,31	11,18 ± 0,47	2,67 ± 0,39
AED	1,4 ± 0,23	1,74 ± 0,28	2,34 ± 0,28	39,22 ± 7,18	13,74 ± 4,96	8,84 ± 0,32	10,97 ± 0,42	2,13 ± 0,29
n	29	29	29	29	28	29	29	29
p	0,243	<b>0,010</b>	<b>0,000</b>	0,761	0,209	<b>0,001</b>	<b>0,048</b>	<b>0,000</b>

**Tabelle 9 Parameter der SLE nach Induktion (Kontrolle) und nach AED-Applikation (AED) im Gyrus dentatus**

als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler n: Anzahl der untersuchten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon.

## Effekte von AED im Gyrus dentatus



**Abbildung 18 Effekte von AED im Gyrus dentatus**

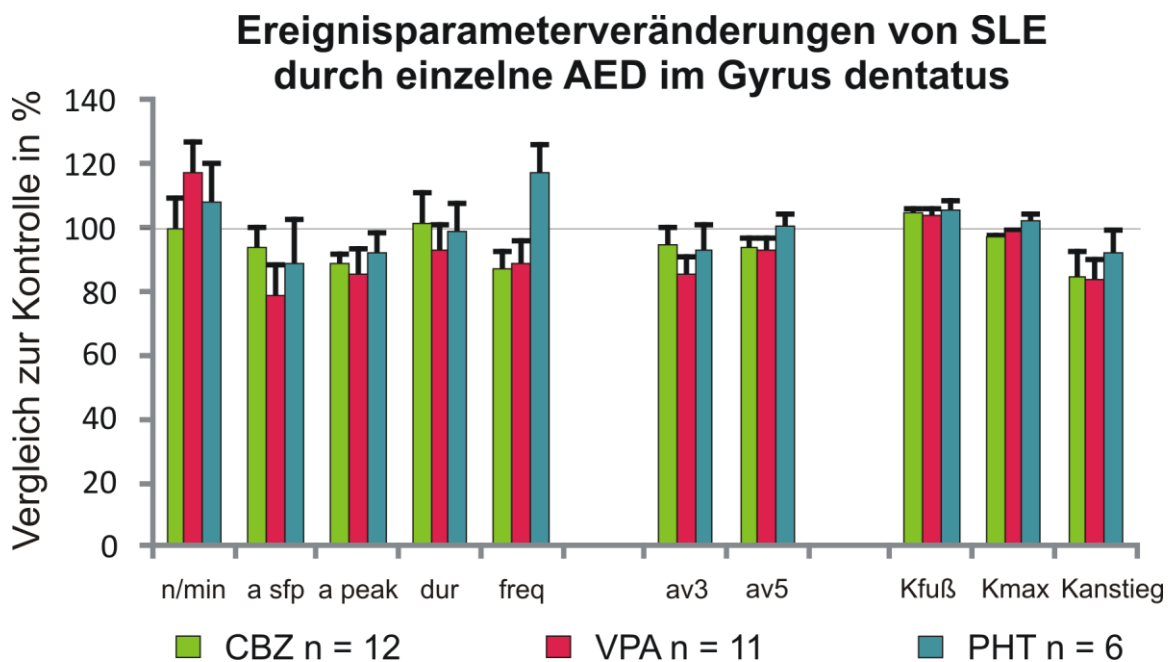
A + B: Originalabbildungen, oben: extrazellulär gemessene Kaliumionen-Konzentration in mM; unten: Feldpotential in mV. A Seizure like events ließen sich nur in einem Gehirnschnitt supprimieren. Nach Auswaschen der Medikamente wurde spiking-Aktivität registriert, B Die induzierte Aktivität erwies sich überwiegend als pharmakoresistent (n = 29).

#### 4.6.2. Unterscheiden sich Carbamazepin, Valproat und Phenytoin in der Wirkung auf die induzierte epileptiforme Aktivität im Gyrus dentatus?

Nur unter VPA wurden SLE bei einem Schnitt unterdrückt.

Nach Fishers exaktem Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Antikonvulsiva in Bezug auf die Aktivitätsänderung.

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Parametermodulation von seizure like events zwischen den drei AED erhoben werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19 Vergleich der verbleibenden Parameter im Vergleich zur Kontrolle nach Einwaschen der einzelnen AED im Gyrus dentatus**

n/min: Ereignisrate/min, a sfp: langsame Komponente der Ereignis-Amplitude, a peak: maximale Amplitude des Ereignisses, dur: Ereignisdauer, freq: Frequenz der Potentialfluktuationen, av3: Mittelwert aus a sfp, a peak und dur, av5 Mittelwert aus allen 5 Ereignis-Parametern, Kfuß: Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn, Kmax: maximale Kaliumkonzentration während des Ereignisses, Kanstieg: Differenz zwischen Kfuß und Kmax. Keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test.

### 4.6.3. Kontrollversuche

Drei Gyrus dentatus-Schnitte, die in zwei Fällen SLE und einmal slow spiking-Aktivität zeigten, waren ohne Substanzzugabe über 60 min stabil in ihrer Aktivitätsart.

Bei 25 Schnitten wurde die MDTI-Wirkung auf die induzierte epileptiforme Aktivität nach 20 min untersucht. Es wurde keine Suppression der epileptiformen Aktivität durch das Einwaschen von einem oder beiden MDTI erzielt. Es ergaben sich aber Änderungen der Aktivitätsart:

Probenecid alleine hatte keine Wirkung auf die Aktivitätsart (fast spiking n = 4, SLE n = 5). Verapamil bewirkte in 33 % der SLE einen Wechsel zu fast spiking-Aktivität (n = 3), hatte aber keinen Einfluss auf induzierte fast spiking-Aktivität (n = 3, p = 1,000, Fishers exakter Test). Bei der Kombination Probenecid + Verapamil wurde in dem einzigen Schnitt mit fast spiking-Aktivität ein Wechsel zu slow spiking-Aktivität beobachtet (n = 1), während slow spiking-Aktivität (n = 2) und SLE (n = 7) unbeeinflusst waren (p = 0,100, Fishers exakter Test). Nach Applikation von MDTI wurden signifikante Parameterveränderungen gemessen (Tabelle 10).

3 Schnitte (2 SLE, 1 fast spiking) wurden über 60 min ohne Substanzapplikation beobachtet und waren über die Beobachtungsdauer stabil in ihrer Aktivitätsart.

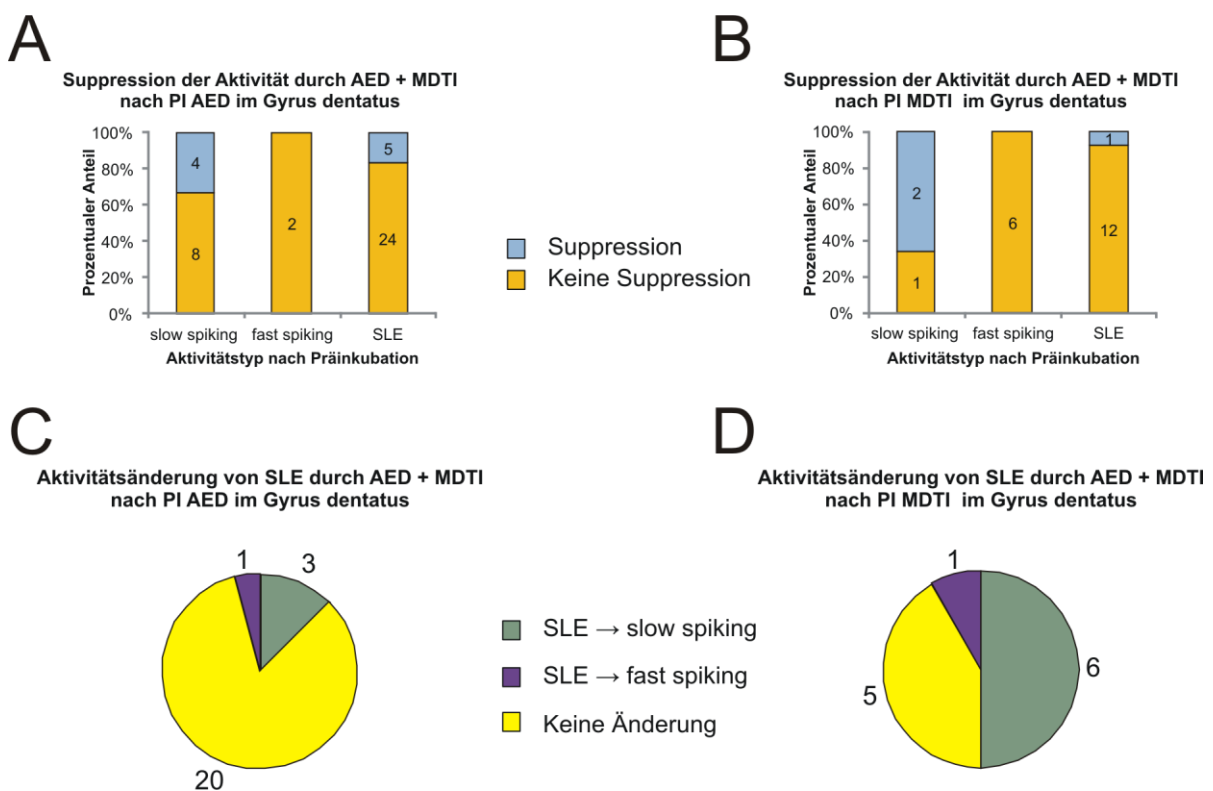
	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
<b>Kontrolle</b>	1,47 ± 0,22	3,54 ± 0,62	4,71 ± 0,68	29,27 ± 9,3	29,67 ± 9,29	8,73 ± 0,48	13,38 ± 1,18	4,65 ± 0,86
<b>MDTI</b>	1,78 ± 0,23	2,96 ± 0,44	4,11 ± 0,56	26,81 ± 11,91	39,75 ± 15,01	9,24 ± 0,48	12,61 ± 0,83	3,37 ± 0,62
<b>n</b>	14	14	14	14	12	14	14	14
<b>p</b>	0,091	<b>0,030</b>	0,127	0,119	0,910	<b>0,027</b>	0,119	<b>0,000</b>

**Tabelle 10 Parameter der seizure like events während der Kontrolle und nach Einwaschen eines oder zweier MDTI**

als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon. Die langsame Komponente der Ereignisamplitude zeigt signifikant niedrigere Werte nach Einwaschen von MDTI im Vergleich zur Kontrolle, ebenso der ereignisbedingte Kaliumanstieg. Die Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn ist nach MDTI-Gabe signifikant höher.

#### 4.6.4. Wirkung von AED + MDTI auf epileptiforme Aktivität nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI im Gyrus dentatus

Slow spiking-Aktivität und SLE konnten durch die Kombination AED + MDTI in 33,3 % und 17,2 % nach Präinkubation mit AED, bzw. in 66,7 % und 7,6 % nach Präinkubation mit MDTI supprimiert werden (Abbildung 20 A + B). Fast spiking-Aktivität war unabhängig von der Präinkubation durch die Kombination aus AED + MDTI unbeeinflusst. Nach Präinkubation mit MDTI wurden öfter Aktivitätswechsel von SLE zu spiking-Aktivität (58,3 %) beobachtet als nach Präinkubation mit AED (16,7 %) ( $p = 0,030$ , Fishers exakter Test) (Abbildung 20 C + D).



**Abbildung 20** Wirkungen von AED + MDTI im Gyrus dentatus nach Präinkubation mit AED bzw. MDTI.

A, B: Durch AED + MDTI erzielte Suppressionsrate der Aktivität, die nach Präinkubation mit AED (A) und MDTI (B) zu beobachten war. C, D: Aktivitätswechsel bei SLE, die nach der Präinkubation mit AED (C) und MDTI (D) registriert wurden.

In der Behandlungsgruppe, in der ein AED länger eingewaschen wurde, fanden sich signifikante Veränderungen der Aktivitätsparameter nach Einwaschen von AED + MDTI (Tabelle 11 A). In der Behandlungsgruppe, in der MDTI präinkubiert wurden, waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant (Tabelle 11 B).

Im Vergleich der Parameter für die beiden Präinkubationsgruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test war kein signifikanter Unterschied zu finden.

A	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
PI AED	1,28 ± 0,23	1,87 ± 0,38	2,38 ± 0,37	43,15 ± 9,52	16,12 ± 6,52	8,79 ± 0,44	10,64 ± 0,53	1,85 ± 0,3
AED + MDTI	1,19 ± 0,22	1,64 ± 0,326	2,11 ± 0,34	42,20 ± 7,85	12,86 ± 5,34	8,93 ± 0,43	10,59 ± 0,60	1,66 ± 0,38
N	20	20	20	20	20	20	20	20
P	0,870	<b>0,006</b>	<b>0,001</b>	0,729	<b>0,030</b>	0,066	0,293	<b>0,023</b>

B	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
PI MDTI	1,23 ± 0,41	2,71 ± 0,37	3,53 ± 0,64	48,42 ± 32,85	22,50 ± 9,80	8,84 ± 0,77	12,11 ± 1,08	3,27 ± 0,47
AED + MDTI	1,13 ± 0,38	2,24 ± 0,32	3,01 ± 0,55	47,97 ± 33,91	19,76 ± 9,13	8,98 ± 0,74	10,59 ± 0,88	2,62 ± 0,56
n	5	5	5	5	4	5	5	5
p	0,250	0,063	0,063	0,625	0,625	0,313	0,188	0,125

**Tabelle 11 Parameter der SLE nach Präinkubation mit einem AED bzw. MDTI und nach Einwaschen von AED + MDTI**

A: Präinkubation (PI) AED, B: PI MDTI, als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der analysierten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon.

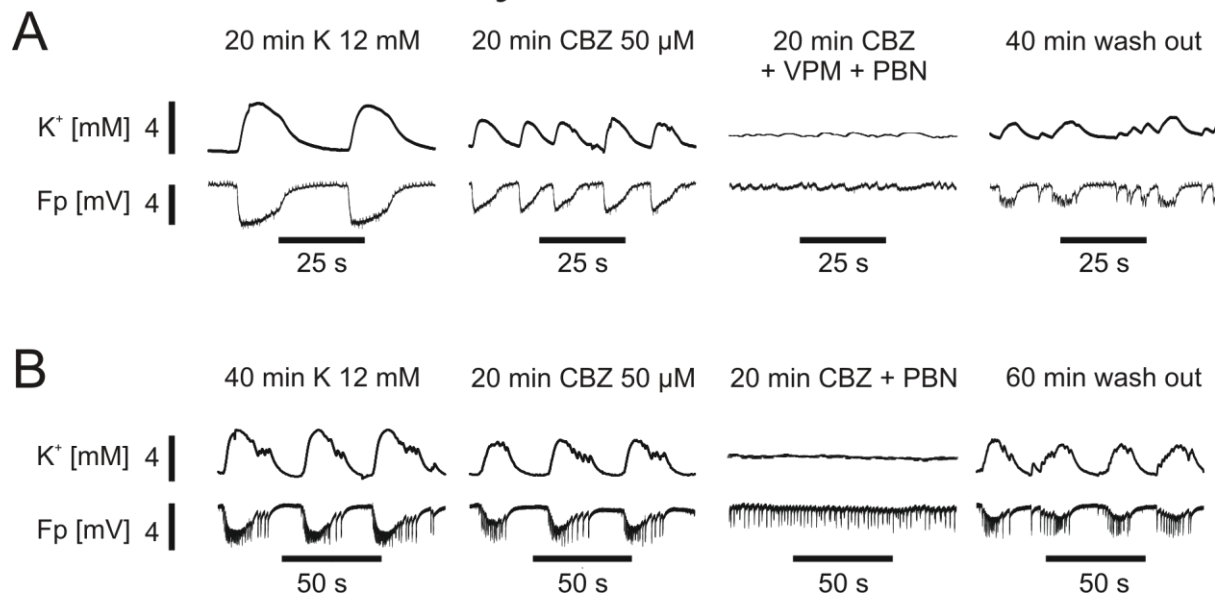
#### 4.6.5. Wirkung von AED + MDTI unabhängig von der Präinkubation

Wie für die Untersuchung des Subiculus werden hier die Präinkubationsgruppen zusammengefasst.

Es zeigte sich eine Suppression von 16,7 % der SLE (n = 42) unabhängig von Aktivitätsveränderungen nach der Präinkubation (Abbildung 21 A). Ob VPM, PBN oder VPM und PBN eingewaschen wurde, hatte keinen Einfluss auf die Suppressionsrate oder Art der Aktivitätsänderung (jeweils VPM n = 4, PBN n = 5, VPM + PBN n = 13, p = 1,000, Fishers exakter Test). Die Untersuchung auf eine Beziehung zwischen Suppression von SLE und Hippocampuspathologie zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (nonHS: n = 21, Suppression 19 % vs. HS n = 21, Suppression = 9,5 %, p = 0,663, Fishers exakter Test).



# Suppression von SLE durch AED + MDTI im Gyrus dentatus



**Abbildung 21 Suppression von SLE durch AED + MDTI im Gyrus dentatus**

A, B: Originalabbildungen, oben: extrazellulär gemessene Kaliumionen-Konzentration in mM; unten: Feldpotential in mV. A Reversible Suppression der SLE durch Koapplikation von AED + MDTI, B Reversibler Wechsel zu spiking-Aktivität.

Nach Einwaschen von AED + MDTI in Schnitte mit nicht supprimierten SLE (n = 36) im Gyrus dentatus zeigten 5,5 % einen Wechsel zu fast spiking-Aktivität (Abbildung 21 B), 25,0 % einen Wechsel zu slow spiking-Aktivität und 69,4 % (59,5 % der gesamten SLE) keine Änderung der Aktivitätsart.

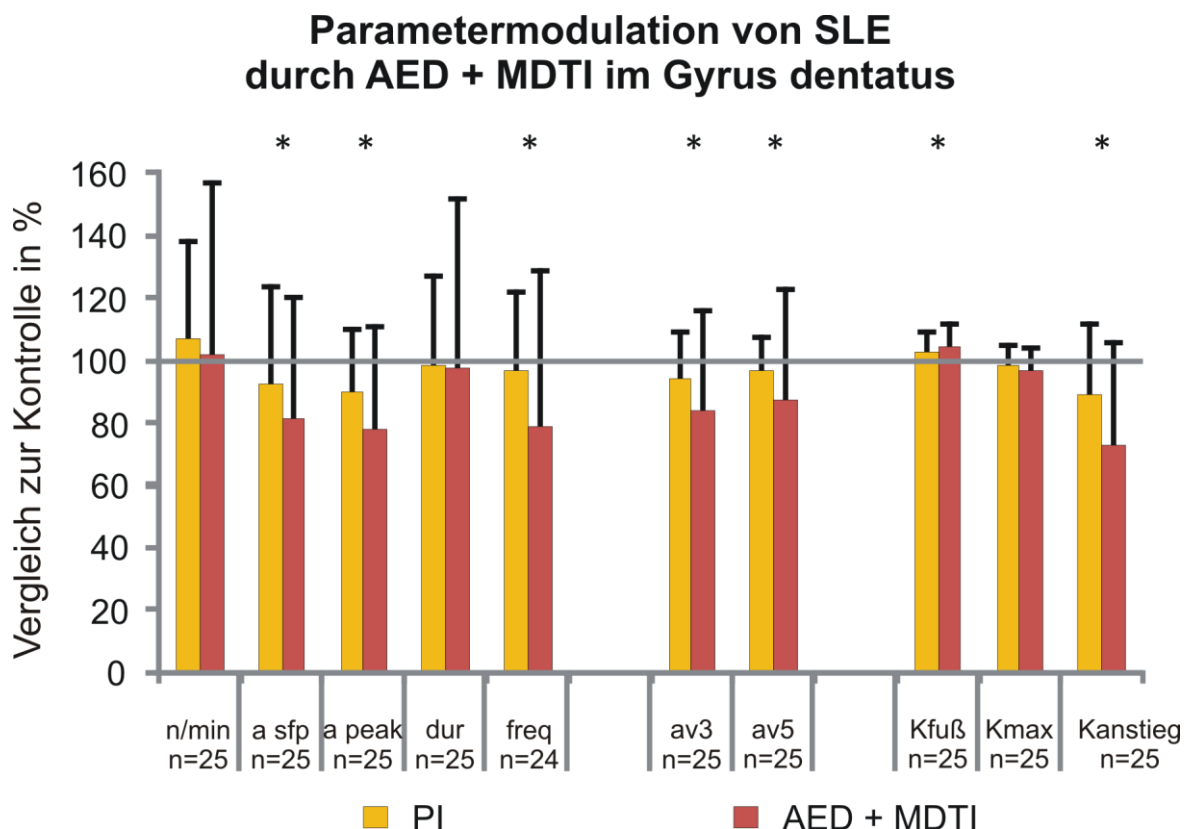
Gyrus dentatus	Ereignisrate (n/min)	a sfp (mV)	a peak (mV)	dur (s)	freq (Hz)	Kfuß (mM)	Kmax (mM)	Kanstieg (mM)
Präinkubation	1,27 ± 0,20	2,04 ± 0,32	2,61 ± 0,33	44,2 ± 9,67	17,19 ± 5,62	8,8 ± 0,37	10,93 ± 0,48	2,14 ± 0,3
AED + MDTI	1,18 ± 0,19	1,76 ± 0,27	2,29 ± 0,3	43,35 ± 8,81	14,01 ± 4,66	8,94 ± 0,37	10,8 ± 0,51	1,85 ± 0,33
n	25	25	25	25	24	25	25	25
p	0,852	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,653	<b>0,018</b>	<b>0,024</b>	0,107	<b>0,004</b>

**Tabelle 12 Parametermodulation nach Einwaschen von AED + MDTI bei pharmakoresistenten SLE im Gyrus dentatus**

Parameter der SLE nach Präinkubation mit AED oder MDTI und nach Einwaschen von AED + MDTI als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl der analysierten Schnitte, p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen verbundenen Tests nach Wilcoxon.

Durch die Kombination von AED + MDTI wurden im Vergleich zur Präinkubation mit AED oder MDTI eine signifikante Reduktion der langsamen Komponente der Ereignisamplitude ( $n = 25$ ,  $p < 0,001$ , Wilcoxon), der maximalen Amplitude des Ereignisses ( $n = 25$ ,  $p < 0,001$ , Wilcoxon) und der Frequenz der transienten Potentialfluktuationen ( $n = 24$ ,  $p = 0,018$ , Wilcoxon) beobachtet. Die Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn war signifikant erhöht ( $n = 25$ ,  $p = 0,024$ , Wilcoxon) und der ereignisbedingte Kaliumanstieg erniedrigt ( $n = 25$ ,  $p = 0,004$ , Wilcoxon) (Tabelle 12).

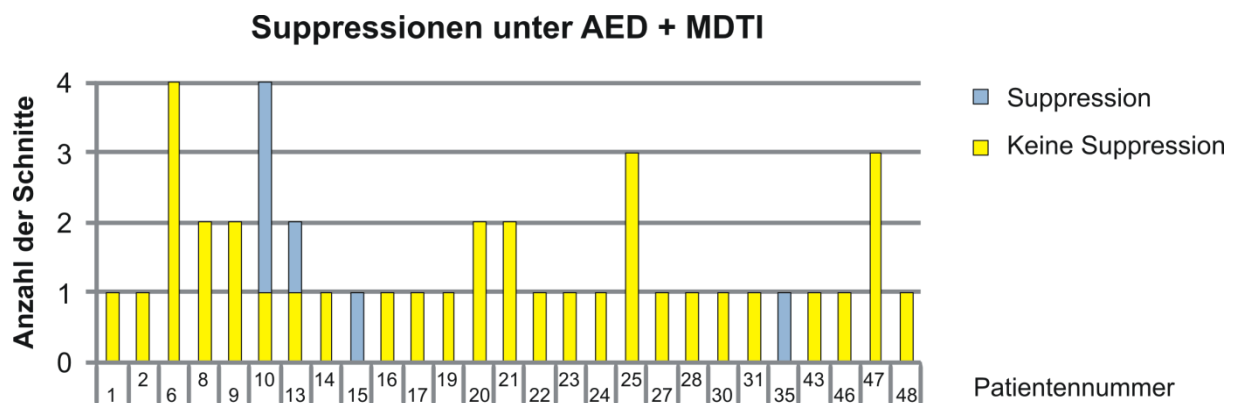
Die Parametermodulation wurde jeweils mit der Kontrollaktivität verglichen. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Reduktion von Aktivitätsparametern (Abbildung 22).



**Abbildung 22 Vergleich der verbleibenden Parameter im Bezug zur Kontrolle nach Präinkubation und Koapplikation im Gyrus dentatus**

Ordinate: Mittelwerte und Standardabweichung; Abszisse: Merkmalskategorien. n/min: Ereignisrate/min, a sfp: langsame Komponente der Ereignis-Amplitude, a peak: maximale Amplitude des Ereignisses, dur: Ereignisdauer, freq: Frequenz der Potentialfluktuationen, av3: Mittelwert aus a sfp, a peak und dur, av5: Mittelwert aus allen 5 Ereignis-Parametern, Kfuß: Kaliumkonzentration bei Ereignisbeginn, Kmax: maximale Kaliumkonzentration während des Ereignisses, Kanstieg: Differenz zwischen Kfuß und Kmax. Signifikante Unterschiede ergaben sich für a sfp ( $p < 0,001$ ), a peak ( $p < 0,001$ ), freq ( $p = 0,028$ ), av3 ( $p = 0,005$ ), av5 ( $p < 0,001$ ), Kfuß ( $p = 0,026$ ) und Kanstieg ( $p = 0,007$ ), Wilcoxon-Test.

Bei der Betrachtung der Patienten zeigt sich, dass bei zwei Patienten in einem Teil der untersuchten Schnitte eine Suppression durch AED + MDTI bewirkt wurde (Abbildung 23). Diese Patienten wurden für die Untersuchung der Patientendaten zur Suppressionsgruppe gezählt, da eine Wirkung der AED + MDTI nachgewiesen wurde. Die Patientendaten der Suppressionsgruppe und Resistenzgruppe sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es zeigte sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der astrozytären und neuronalen Expression von MRP1, MRP2, MRP5, major vault-Protein und PGP in Subiculum, CA 1-3 und Gyrus dentatus ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney-U).



**Abbildung 23 Suppression von SLE nach Koapplikation von AED + MDTI im Gyrus dentatus**  
 Auf der Ordinate ist die Anzahl der Schnitte mit SLE nach Induktion angegeben, unter der Abszisse die Patientennummer. Farblich ist für jeden Schnitt dargestellt, ob die Aktivität supprimiert wurde oder in einer beliebigen Art weiterbestand.

Gyrus dentatus	Alter		Dauer		Auren/Monat		Anfälle/Monat		SGS/Jahr	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<b>Median</b>	33	44	26,5	18	4	4	19	4	0,1	0,140
<b>Minimum - Maximum</b>	5-48	15-60	1-44	1-50	0-6	0-60	3-420	1-60	0-12	0-300
<b>n</b>	4	23	4	23	4	23	4	20	3	15
<b>p</b>	0,194		0,733		0,819		0,062		0,501	

**Tabelle 13 Untersuchung der Patientendaten gruppiert nach Suppression (S) oder Resistenz (R) unter AED + MDTI im Gyrus dentatus**

Alter (in Jahren), Dauer der Erkrankung (in Jahren), Anzahl der Auren und Anfälle pro Monat und Anzahl der sekundär generalisierten Anfälle pro Jahr. p: zweiseitige Signifikanz des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests.

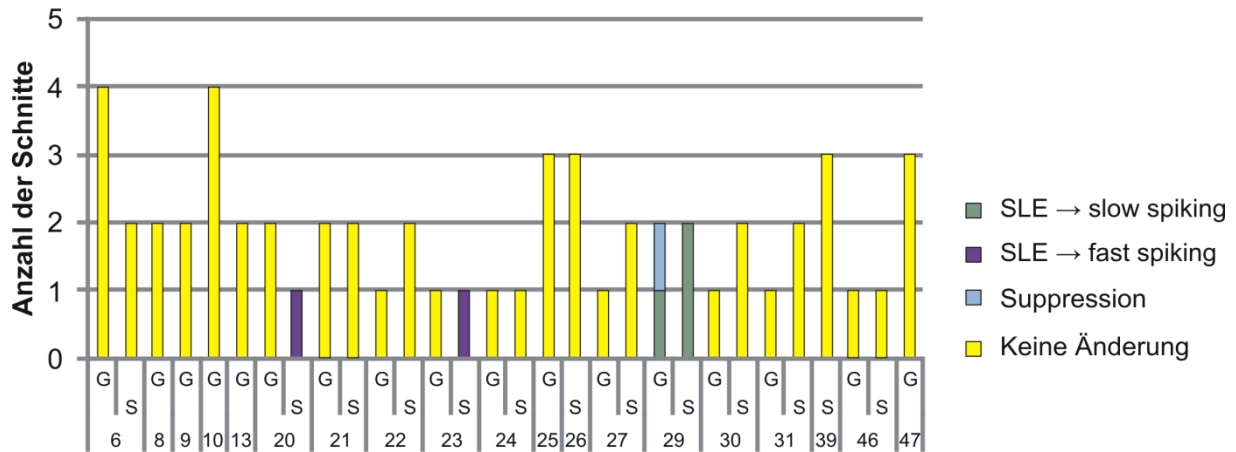
#### **4.6.6. Testung der Erholung der epileptiformen Aktivität**

Im Gyrus dentatus konnte nach einer Suppression in 91,6 % (n = 12) durch Auswaschen der Pharmaka die Ursprungsaktivität wiederhergestellt werden, in 8,4 % zeigte sich eine andere als die induzierte Aktivität. Bei erhaltenen SLE (n = 36) waren die Parameter a sfp, a peak, Kanstieg (reduziert) und Kfuß (erhöht) signifikant von der Kontrollaktivität verschieden.

#### **4.7. Heterogene Effekte von AED + MDTI auf SLE bei Gehirnschnitten vom selben Patienten**

Bei 19 Patienten wurden in mehr als einem Gehirnschnitt SLE induziert, die mit AED + MDTI behandelt wurden. Nach Induktion, Präinkubation von AED und Applikation von AED + MDTI waren heterogene Effekte zu sehen (Abbildung 8, 9, 22, 23, und 24). Bei einigen Patienten waren Schnitte vom Subiculum, bei anderen vom Gyrus dentatus und bei einer dritten Gruppe von beiden Gehirnregionen verfügbar. Es wurde getestet, ob sich diese drei Gruppen unterscheiden. Suppressionen waren in den drei Gruppen nach Applikation von AED + MDTI nicht signifikant unterschiedlich (n = 72, p = 0,835, Fishers exakter Test), so dass diese für die folgenden Untersuchungen zusammengefasst wurden.

## Aktivitätsveränderungen von SLE nach Präinkubation

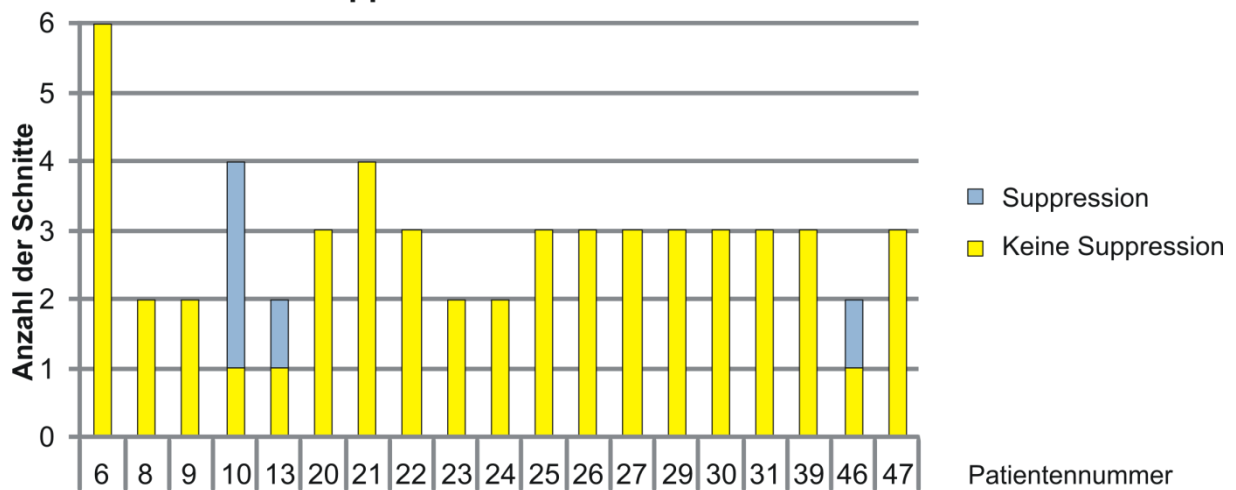


**Abbildung 24 Heterogenität nach Präinkubation von AED oder MDTI**

G: Gyrus dentatus, S: Subiculum, Auf der Ordinate ist die Anzahl der Schnitte mit SLE nach Induktion angegeben, unter der Abszisse die Patientennummer. Bei den Patienten 20, 23 und 29 zeigten sich heterogene Aktivitätsveränderungen nach Einwaschen von AED. Nur bei den Patienten 6, 10, 26, 27 und 31 wurde bei insgesamt 16 Schnitten eine Präinkubation mit MDTI durchgeführt, die keine Aktivitätsänderung zur Folge hatte.

Bei drei von 19 Patienten konnte in einem bis drei Schnitten eine Suppression unter AED + MDTI beobachtet werden, wobei jeder Patient einen Gehirnschnitt mit epileptiformer Aktivität aufwies, die nicht supprimiert wurde (Abbildung 25).

## Suppression von SLE unter AED + MDTI



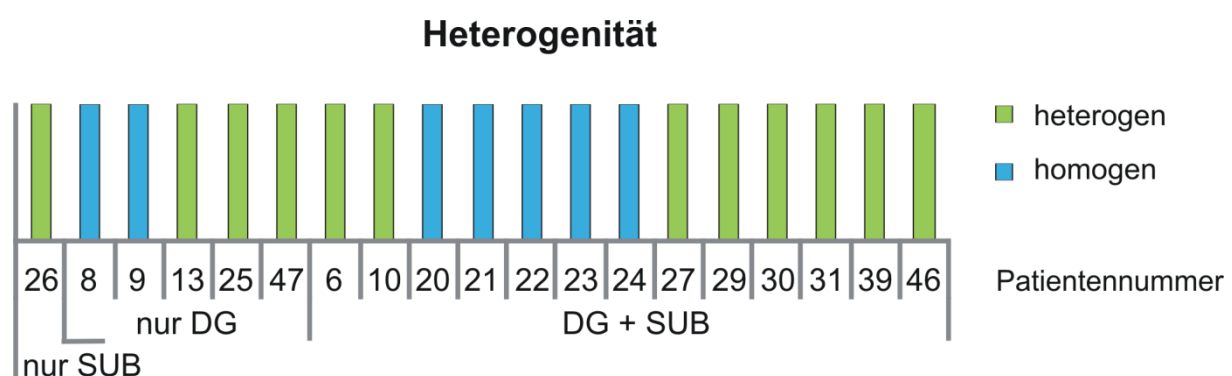
**Abbildung 25 Suppression von SLE nach Koapplikation von AED + MDTI**

Auf der Ordinate ist die Anzahl der Schnitte mit SLE nach Induktion angegeben, unter der Abszisse die Patientennummer. Farblich ist für jeden Schnitt dargestellt, ob die Aktivität supprimiert wurde oder in einer beliebigen Art weiterbestand.

Worin unterschieden sich diese drei von den übrigen 16 Patienten? Ein signifikanter Unterschied wurde bei dem Alter bei Erstdiagnose zwischen den Gruppen gesehen

( $p = 0,047$ , Mann-Whitney-U). Folgende Faktoren waren nicht signifikant unterschiedlich: das Vorliegen einer hippocampalen Sklerose ( $p = 0,582$ , Fishers exakter Test), das Alter des Patienten ( $p = 0,303$ , Mann-Whitney-U), die Erkrankungsdauer ( $p = 0,211$ , Mann-Whitney-U), die Anzahl der Anfälle pro Monat ( $p = 0,912$ , Mann-Whitney-U), die Anzahl der sekundär generalisierten Anfälle pro Jahr ( $p = 0,611$ , Mann-Whitney-U), die Serum- und Gewebekonzentration des Antikonvulsivums zum Zeitpunkt der Operation ( $p = 0,821$  und  $p = 0,909$ , Mann-Whitney-U), das Geschlecht ( $p = 1,000$ , Fishers exakter Test), die operierte Seite ( $p = 1,000$ , Fishers exakter Test), das Vorliegen einer begleitenden Cortexpathologie ( $1,000$ , Fishers exakter Test). Die Expressionsrate von PGP, MRP1, MRP2, MRP5 und MVP an Neuronen und Astrozyten in Subiculum und Gyrus dentatus war nicht signifikant unterschiedlich.

Unter AED + MDTI konnten jedoch auch Veränderungen der Aktivitätsart von SLE zu fast oder slow spiking-Aktivität beobachtet werden. Werden diese Änderungen miteinbezogen, können die untersuchten Gehirnschnitte von je einem der oben genannten Patienten eine gleichartige (homogene) oder verschiedene (heterogene) Wirkung zeigen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, bei denen nur im Subiculum, nur im Gyrus dentatus oder in beiden Gehirnregionen gemessen wurde (Abbildung 26).



**Abbildung 26 Heterogene Wirkungen nach Koapplikation von AED + MDTI in Abhängigkeit von der untersuchten Region**

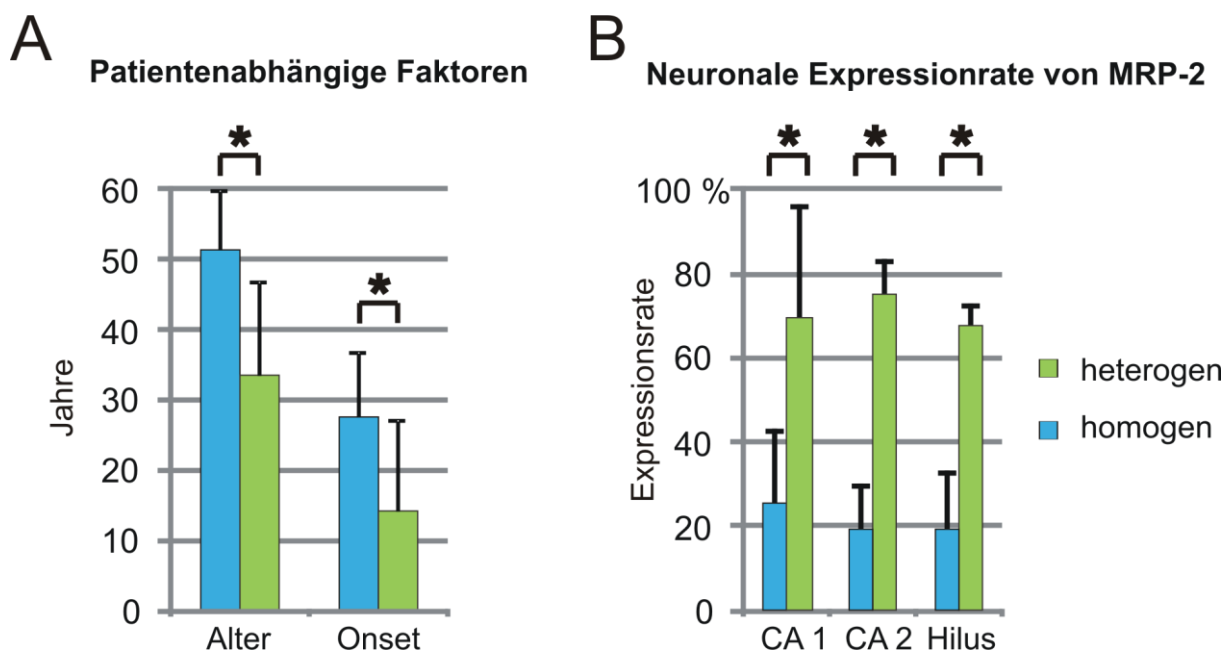
Patienten, bei denen in mehr als einem Gehirnschnitt SLE induziert werden konnten, sind mit der Patientennummer und der Wirkung von AED + MDTI markiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung homogener und heterogener Antworten zwischen den gemessenen Regionen ( $n = 19$ ,  $p = 1,000$ , Fishers exakter Test).

Sieben Patienten, bei denen ein homogener Effekt von AED + MDTI beobachtet wurde (36,8 %), wurden mit 12 Patienten verglichen, bei denen ein heterogener Effekt zu sehen war.

#### **4.8. Welche Faktoren waren assoziiert mit einer heterogenen Wirkung?**

In den Experimenten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der zur Induktion eingewaschenen extrazellulären Kaliumkonzentration (10 oder 12 mM Kalium) ( $p = 1,000$ , Fishers exakter Test), hinsichtlich der verwendeten Antikonvulsiva ( $p = 0,905$ , Fishers exakter Test), der eingewaschenen MDTI ( $p = 0,887$ , Fishers exakter Test) oder der Einwaschdauer von AED oder MDTI (PI AED oder PI MDTI) ( $p = 0,245$ , Fishers exakter Test). Die Heterogenität und Homogenität trat sowohl bei Verwendung gleicher AED als auch unterschiedlicher AED auf.

Bei den patientenabhängigen Parametern zeigte sich, dass Gehirnschnitte von männlichen Patienten mit 90 % signifikant häufiger eine heterogene Antwort als die von Frauen mit 33,3 % zeigten ( $\text{♀} = 9$ ,  $\text{♂} = 10$ ,  $p = 0,020$ , Fishers exakter Test). Ebenso waren Patienten mit heterogener Antwort signifikant jünger zum Zeitpunkt der Operation und jünger bei Diagnosestellung (Abbildung 27 A). Die Anzahl der Anfälle pro Monat und der sekundär generalisierten Anfälle pro Jahr war nicht unterschiedlich ( $p = 0,204$  und  $p = 0,296$ , Mann-Whitney-U).



**Abbildung 27 Unterschiede zwischen Patienten mit homogener und heterogener Wirkung von AED + MDTI**

A: Das Alter der Patienten mit heterogenen Effekten von AED + MDTI auf SLE war beim Zeitpunkt der Operation (Alter) und bei Diagnosestellung (Onset) signifikant niedriger als das der Patienten, die homogene Effekte zeigten (n = 7 homogen, 12 heterogen, p = 0,011 und p = 19, p = 0,031, Mann-Whitney-U). B: In der Region CA 1, CA 2 und im Hilus zeigte sich eine signifikant niedrigere neuronale Expression von MRP2 (CA 1: n = 3 heterogen, 5 homogen, p = 0,025; CA 2: n = 3 heterogen, 6 homogen, p = 0,020; Hilus: n = 3 heterogen, 6 homogen, p = 0,020, Mann-Whitney-U).

Ohne Signifikanz blieben der Vergleich in Bezug auf die Seite der Operation (p = 0,377), das Vorliegen einer hippocampalen Sklerose (p = 1,000), das Vorliegen einer corticalen Pathologie (p = 0,603) und die Art der antikonvulsiven Therapie (Monotherapie oder Polytherapie) (p = 0,523).

Die Höhe der im Serum und im Gewebe gemessenen Wirkspiegel war nicht signifikant unterschiedlich (p = 0,574 und 0,186, Mann-Whitney-U). Bei der Betrachtung der Expressionsdaten zeigte sich eine signifikant niedrigere neuronale Expression von MRP2 in den Regionen CA 1, CA 2 und im Hilus von Patienten mit heterogenem Effekt (Abbildung 27 B), jedoch nicht im Gyrus dentatus, in der Region CA 3 oder im Subiculum. Die neuronale Expressionsrate von MRP1, MRP5, PGP und major vault-Protein und die astrozytäre Expressionsrate der fünf genannten Transportproteine waren in allen Regionen nicht signifikant unterschiedlich.



## **5. Diskussion**

### **5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **5.1.1. Induktion**

Im Hippocampus von 49 Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie konnte in 39 Hirnschnitten im Subiculum durch eine hoch-Kalium-ACSF-Lösung und in 73 Hirnschnitten im Gyrus dentatus durch eine hoch-Kalium-ACSF-Lösung in Kombination mit einer Moosfaserstimulation epileptiforme Aktivität induziert werden.

Es zeigten sich in beiden Regionen drei verschiedene Arten von epileptiformer Aktivität. Krampfartige Ereignisse mit einer Dauer von  $\geq 5$  s waren im Subiculum (89,8 %) und Gyrus dentatus (64,9 %) am häufigsten. Es konnten zwei Arten von spike-artigen Ereignissen (Dauer  $< 5$  s) festgestellt werden: fast spiking mit einer Ereignisrate  $> 40/\text{min}$  (Sub: 5,4 %, GD: 11,7 %) und slow spiking (Sub: 5,4 %, GD: 23,4 %). Im Gyrus dentatus war spiking-Aktivität signifikant häufiger in sklerotischen als in nicht-sklerotischen Gewebeschnitten zu beobachten. In sklerotischen Gyrus dentatus-Schnitten trat epileptiforme Aktivität häufiger als in nicht-sklerotischen Schnitten bei einer niedrigeren Kalium-Einwaschkonzentration auf.

Ohne Substanzapplikation blieb die induzierte Aktivität in 5 von 6 Hirnschnitten mindestens 60 min stabil (im Subiculum in 2 von 3, im Gyrus dentatus in 3 von 3 Schnitten). In einem Schnitt zeigte sich ein spontaner Wechsel von SLE zu fast spiking nach 40 min.

#### **5.1.2. Subiculum**

Seizure like events im Subiculum waren in 69,6 % der untersuchten Gehirnschnitte gegenüber CBZ, VPA oder PHT resistent und behielten ihre Aktivitätsart.

In Hirnschnitten mit pharmakoresistenten SLE wurden nach AED-Applikation niedrigere Ereignisamplituden gemessen. Der Vergleich der drei Antikonvulsiva

untereinander zeigte eine unterschiedliche Wirksamkeit. Jedoch konnte der Unterschied statistisch keinem AED zugeordnet werden.

MDTI hatten bei SLE keinen Effekt auf die Aktivitätsart, aber erhöhten die Ereignisrate und verringerten die maximale Ereignisamplitude und Frequenz der Potentialfluktuationen. Zwischen den Applikationsarten VPM einzeln, PBN einzeln und VPM + PBN ließen sich bei den geringen Stichprobenumfängen (jeweils  $n = 3$ ) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Parametermodulation nachweisen.

Nach Einwaschen von AED + MDTI wurde in 3,7 % eine Suppression der pharmakoresistenten SLE gesehen. Der Patient, in dem die Suppression beobachtet wurde, unterschied sich in Hinsicht auf epidemiologische und Expressionsdaten nicht von den anderen untersuchten Patienten.

Die nicht supprimierten SLE zeigten einen Wechsel der Aktivitätsart zu slow spiking-Aktivität in 26,1 % und zu fast spiking-Aktivität in 8,7 % der Fälle (zusammen 34,8 %).

Die pharmakoresistenten SLE zeigten bei Koapplikation von AED und MDTI eine signifikante Reduktion der Ereignisamplituden, der Frequenz der Potentialfluktuationen, des Anstiegs der extrazellulären Kaliumkonzentration und der maximalen Kaliumkonzentration während der epileptiformen Aktivität.

Die Suppression der epileptiformen Aktivität war nach Auswaschen der Substanzen reversibel.

### **5.1.3. Gyrus dentatus**

Im Gyrus dentatus zeigten 90,6 % der Schnitte mit seizure like events nach Einwaschen von CBZ, VPA oder PHT keine Aktivitätsänderung; eine Suppression der SLE wurde in 3,1 % der Fälle beobachtet. Eine Veränderung zu fast oder slow spiking-Aktivität war je in 3,1 % zu sehen.

MDTI bewirkten Aktivitätsänderungen von SLE zu fast spiking-Aktivität in 6,7 % und von fast spiking-Aktivität zu slow spiking-Aktivität in 100 % ( $n = 1$ ). Slow spiking-

Aktivität blieb unbeeinflusst. Bei resistenten SLE wurde unter MDTI eine signifikante Reduktion der Maximalamplitude und des Kaliumanstiegs gesehen.

Nach Koapplikation von AED + MDTI war bei 17,2 % der pharmakoresistenten SLE eine Suppression zu beobachten. Von den nicht supprimierten SLE zeigten 25,0 % einen Wechsel der Aktivitätsart zu slow spiking-Aktivität, weitere 5,5 % zu fast spiking-Aktivität und 69,4 % keine Änderung.

Die Patienten, bei denen unter AED + MDTI eine Suppression gesehen wurde, unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den anderen Patienten in Bezug auf die erhobenen epidemiologischen Daten und die Expressionsrate der untersuchten MDTI.

Nach Koapplikation von AED und MDTI ließen sich bei längerer Einwaschzeit von MDTI öfter Aktivitätswechsel von SLE zu spiking-Aktivität beobachten. Bei längerem Einwaschen von AED wurden signifikante Veränderungen der Aktivitätsparameter der SLE gesehen.

Die pharmakoresistenten SLE zeigten bei Koapplikation von AED und MDTI eine signifikante Reduktion der langsamen Komponente der Potentialamplitude, der maximalen Ereignisamplitude, der Frequenz der Potentialfluktuationen und des Ereignis-assoziierten Kaliumanstiegs, sowie eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu Beginn des Ereignisses.

Die Aktivität nach Suppression durch AED + MDTI war in 91,6 % der Fälle nach Auswaschen der Substanzen wieder in der ursprünglichen Form zu sehen, in 8,4 % war bei ursprünglich vorhandenen SLE ein Wechsel zu slow spiking-Aktivität zu beobachten.

#### **5.1.4. Heterogenität**

Bei 8,3 % der Patienten, von denen mehr als ein Subiculum-Schnitt untersucht wurde, zeigten sich unterschiedliche Aktivitätsarten nach Induktion. Bei Schnitten aus dem Gyrus dentatus handelte es sich um 27,8 % der Patienten.

Von 19 Patienten, bei denen mehr als ein Schnitt (Subiculum, Gyrus dentatus oder beide) untersucht wurden, zeigten drei in einem Teil der untersuchten Schnitte eine Suppression. Diese drei Patienten unterschieden sich von den anderen durch ihr jüngeres Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Bei der Betrachtung der Veränderung der Aktivitätsart der Schnitte jeweils eines Patienten konnten in 36,8 % homogene und in 63,2 % heterogene Effekte beobachtet werden. Patienten, bei denen heterogene Aktivitätsänderungen gesehen wurden, waren häufiger männlich, jünger bei Erstdiagnose und jünger zum Zeitpunkt der Operation. Im Gewebe dieser Patienten war eine höhere Expressionsrate von MRP2 in den nicht untersuchten Regionen CA 1, CA 2 und Hilus nachzuweisen.

## 5.2. Induktion epileptiformer Aktivität im Subiculum

Im Subiculum von Hippocampusgewebe, das von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie zur Therapie reseziert wurde, konnte durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 10-12 mM periodische epileptiforme Aktivität induziert werden. Ein zusätzlicher pro-epileptogener Faktor wie z.B. wiederholte elektrische Stimulation war nicht erforderlich.

Huberfeld et al. (2011) berichten, dass sie mit einer 4-8 mM extrazellulären Kaliumkonzentration im Subiculum keine Aktivität auslösen konnten, so dass ein zweiter pro-convulsiver Stimulus erfolgen musste [104]. Im Vergleich mit den erhobenen Befunden befanden sich Huberfeld et al. unterhalb der Kalium-Schwellenkonzentration, die hier epileptiforme Aktivität auslöste. Diese trat bei 7-8 mM im Subiculum auf und wurde mit einer Konzentration von 10 oder 12 mM aufrechterhalten.

In anderen Regionen des Hippocampus ließ sich tierexperimentell ebenfalls durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration eine epileptiforme Aktivität auslösen: Bei einer Kaliumkonzentration von 6,5-10 mM, konnte in der CA 3-Region der Ratte von einer Forschergruppe interiktale Aktivität beobachtet werden [105]. In der Region CA 3 wurden bei einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 auf 8,5 mM in 6 von 14 Schnitten SLE gesehen. Bei vorheriger Induktion von sharp-wave-ripple-Komplexen wurde eine Transition von sharp-wave-ripple-Komplexen zu SLE nur in einem von 12 Schnitten beobachtet [106].

Eine Untersuchung von Ogata et al. (1976) zeigte eine exponentielle Verlängerung der Dauer von stimulusinduzierten Oszillationen in der CA 3-Region ab einer Konzentration von 7 mM [107]. Als Optimum für die Erhaltung der langsamen oszillatorischen Aktivität wurde dort eine Konzentration von 10 mM festgestellt, während Konzentrationen über 12 mM zu einer Abnahme der stimulierten Antwort führten.

### **5.3. Induktion im Gyrus dentatus im Vergleich zu den Vorstudien**

Im Gyrus dentatus hat sich das bei Gabriel et al. (2004) und Jandova et al. (2006) verwendete Protokoll mit Moosfaserstimulation und Einwaschen einer hoch-Kalium-Lösung zur Induktion pharmakoresistenter epileptiformer Aktivität in Gehirnschnitten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie bewährt [96, 97].

### **5.4. Charakterisierung der epileptiformen Aktivität**

Wie im humanen Gyrus dentatus waren drei verschiedene Arten epileptiformer Aktivität im Subiculum erkennbar. So ließen sich eine krampfartige epileptiforme Aktivität und zwei spiking-Aktivitäten mit unterschiedlicher Ereignisrate messen.

Ob die bei Patienten mittels Tiefenelektroden gemessene Aktivität der in vitro induzierten Aktivität entspricht, kann nicht gesagt werden, so dass bewusst eine andere Terminologie verwendet wurde. Dabei ist fast spiking-Aktivität mit periodic ictal spiking und slow spiking-Aktivität mit interictal-like events gleichzusetzen, da die gleichen Bewertungsmaßstäbe wie bei Gabriel et al. (2004) angewandt wurden.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Untersuchung der krampfartigen Aktivität. Im EEG beginnt sie deutlich von einer Hintergrundaktivität unterscheidbar mit Entladungen niedriger Amplitude und hoher Frequenz und entwickelt sich zu einer Aktivität mit hoher Amplitude und niedriger Frequenz, bevor sie mit einem erkennbaren Ende in die Hintergrundaktivität übergeht [4].

Fast spiking-Aktivität wurde von der slow spiking-Aktivität unterschieden, da sie sich durch die hohe Ereignisrate von der interiktalen Aktivität unterscheidet.

Möglicherweise handelt es sich bei der fast spiking- um ictale Aktivität mit niedriger Amplitude, wie sie im EEG von Patienten in der epileptogenen Zone einer krampfartigen Aktivität vorausgeht [108].

In experimentellen Modellen an Gehirnpräparaten des Meerschweins, in denen der Kalium-Kanalblocker 4-Aminopyridin eingewaschen wurde, ließ sich diese Art der

epileptiformen Aktivität durch den GABA-A-Rezeptor-Inhibitor Bicucullin unterdrücken [109]. Ebenso konnte nach arterieller Perfusion von isolierten Meerschweingehirnen mit Bicucullin bei Beginn der ictalen Aktivität eine erhöhte Interneuronen-Aktivität bei gleichzeitiger initialer Suppression von Prinzipalneuronen gemessen werden [110]. Es wird von Gnatkovsky et al diskutiert, dass die Aktivierung inhibitorischer Interneurone die Aktivität von Prinzipalzellen synchronisiert. Bei zeitgleich messbarer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration wird eine Abschwächung der inhibitorischen postsynaptischen Signale durch Verschiebung des GABA-Umkehrpotentials angenommen [111].

Das Subiculum von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie und hippocampaler Sklerose wurde als Ursprungsort von spontaner synchroner Neuronenaktivität in vitro identifiziert, die einer interiktalen Aktivität, wie sie im EEG präoperativ auftritt, in Form, Frequenz und Kinetik entspricht [33, 112]. Diese Aktivität war im humanen Gehirnschnitt ohne proepileptogene Faktoren gemessen worden. Hier konnte eine spontane epileptiforme Aktivität nicht beobachtet werden, was auf eine unterschiedliche Gewebevitalität und Zusammensetzung der ACSF-Lösung zurückgeführt werden könnte.

Die bei Cohen et al. (2002) gemessene spontane Aktivität im Subiculum ließ sich in vitro durch Glutamat- und GABA-Rezeptor-Antagonisten unterdrücken. Bei der Untersuchung von einzelnen Pyramidenzellen wurde eine Gruppe von Neuronen gefunden, bei denen eine GABAerge Transmission die Zellen depolarisierte. Deshalb wird von ihm vermutet, dass interiktale Ereignisse von Interneuronen initiiert werden, die inhibitorisch und exzitatorisch auf die jeweiligen Pyramidenzellen wirken [33]. Ähnliche spontane Aktivität wurde jedoch auch im humanen Neocortex [113] und murinen Hippocampus in Form von sharp-waves gesehen [114]. Im Hippocampus der Maus wird eine Beteiligung des GABA-A-Rezeptors an der Initiierung der sharp-waves diskutiert, da die Blockierung des Rezeptors das Auftreten dieser Aktivität verhindert, jedoch die Synchronisation bei dendritischer Stimulation durch lokale Applikation von Kalium nicht beeinflusst wird [115].

Die Bedeutung interiktaler Aktivität ist jedoch noch nicht geklärt. Es wird einerseits vermutet, dass interiktale Aktivität einen Schutzmechanismus gegen iktale Aktivität darstellt, indem sie durch einen noch unbekanntem Mechanismus von der CA 3-Region Einfluss auf die Exzitabilität des entorhinalen Cortex nimmt [116]. Zwar wird durch die Aufzeichnung von interiktalen Entladungen auf die Lokalisation eines Herdes zurückgeschlossen [4], experimentell wurde jedoch festgestellt, dass interiktale und iktale Entladungen von unterschiedlichen Neuronenpopulationen ausgehen. Im EEG von Patienten mit fokaler Epilepsie war die Region, in der interiktale Aktivität gemessen wurde, vom Fokus verschieden. Auch konnte bei Patienten durch eine therapeutische Dosierung von Carbamazepin und Phenytoin kein Effekt auf die Ereignisrate der interiktalen Aktivität beobachtet werden [117]. Die interiktale Aktivität trat jedoch nach AED-Entzug in niedrigerer Frequenz auf [118]. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist bisher nicht geklärt.

Da die fast und slow spiking-Aktivität nicht eindeutig als für den Patienten nützlich oder schädlich klassifiziert werden kann, wird hier nur auf die krampfartige Aktivität Bezug genommen. Dabei wird nur die krampfartige Aktivität, die die Aktivitätsart nicht ändert, als pharmakoresistent bezeichnet. Bei der Betrachtung der Suppressionsrate werden Schnitte, die ihre Aktivitätsart ändern, als nicht supprimiert betrachtet.



## **5.5. Einfluss der Gewebepathologie auf die Induktion**

In der vorausgegangenen Arbeit von Gabriel et al. 2004 zeigte sich, dass epileptiforme Aktivität im Gyrus dentatus von sklerotischen Hirnschnitten hauptsächlich bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 10 mM und von nicht-sklerotischen Schnitten bei 12 mM ausgelöst wurde [96]. Diese Beobachtung konnte hier bestätigt werden. Eine synaptische Reorganisation, wie sie bei der hippocampalen Sklerose auftritt, scheint also die Schwelle für eine synchrone Neuronenaktivität zu erniedrigen.

Im Gegensatz zum Gyrus dentatus hatte im Subiculum das Vorliegen einer hippocampalen Sklerose keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Art der induzierten Aktivität. Im Vergleich zum Gyrus dentatus und zum Cornu ammonis findet sich im Subiculum eine geringer ausgeprägte Sklerose und reaktive Gliose [10, 119]. Bei hippocampaler Sklerose tritt zwar auch im Subiculum eine reaktive synaptische Reorganisation auf, allerdings wird vermutet, dass eine Sklerose keine Voraussetzung für die Entwicklung eines pathologischen subiculären Netzwerkes ist [32]. Auch ein moderater Neuronenverlust in der CA 1-Region und die daraus folgende Deafferenzierung subiculärer Neurone kann zu Netzwerkveränderungen führen [34]. Es lässt sich also vom Grad der hippocampalen Sklerose keine Aussage zum Ausmaß der Netzwerkveränderung im Subiculum ableiten.

## **5.6. Einfluss der Antikonvulsiva Valproat, Carbamazepin und Phenytoin auf die epileptiforme Aktivität**

Konform mit den Ergebnissen von Jandova et al. (2006) wurde auch hier im Gyrus dentatus krampfartige epileptiforme Aktivität induziert, die resistent gegenüber Carbamazepin war [97]. Während sie gegenüber Phenytoin auch resistent war, konnte zu 3,1 % eine Suppression durch Valproat beobachtet werden. In 90,6 % der Fälle war durch das eingewaschene Antikonvulsivum keine Veränderung der Aktivitätsart zu sehen, so dass die Aktivität als resistent gegenüber CBZ und VPA

und PHT gesehen werden kann. Jedoch ließen sich signifikante Reduktionen der Aktivitätsparameter bei resistenter Aktivität messen.

Krampfartige epileptiforme Aktivität war im Subiculum in 91,3 % der Fälle durch ein Antikonvulsivum nicht supprimierbar, wobei in 70 % die Aktivitätsart nicht verändert wurde. Hier wurden wie im Gyrus dentatus Reduktionen der Aktivitätsparameter gemessen. Das jeweilige Antikonvulsivum, das eine Suppression hervorrief, war vorher nicht am Patienten verwendet worden, so dass eine klinische Wirksamkeit nicht ausgeschlossen werden kann. Hier konnte gezeigt werden, dass mit einer extrazellulären Erhöhung der Kaliumkonzentration eine gegenüber Carbamazepin, Valproat und Phenytoin pharmakoresistente epileptiforme Aktivität auch im Subiculum induziert werden kann. In dieser Studie standen jedoch keine Gewebeproben von Patienten zur Verfügung, die nicht aufgrund einer pharmakoresistenten Epilepsie operiert wurden. Es bleibt zu klären, ob das Epilepsiemodell per se pharmakoresistente epileptiforme Aktivität induziert und welche Eigenschaften die epileptiforme Aktivität bei Patienten ohne pharmakoresistente Temporallappenepilepsie aufweist.

Da in diesem experimentellen Modell eine Bluthirnschranke nicht vorhanden war, ist von einem Resistenzmechanismus auf Netzwerk- oder neuronaler bzw. glialer Ebene auszugehen.

In diesem Projekt wurde die Wirkung von Antikonvulsiva bis zu einer Dauer von 40 min untersucht. Für Carbamazepin wurde bereits gezeigt, dass eine Suppression bereits nach 10 min gesehen werden kann [97]. Hier wurden nach 20 und 40 min Einwaschzeit signifikante Amplitudenreduktionen der SLE in Subiculum und Gyrus dentatus gemessen. In der von Scism et al. (2002) zitierten Arbeit von Altrup et al. (1992) zeigten Experimente an der Weinbergschnecke Früheffekte innerhalb der ersten Stunde nach Substanzapplikation und Späteffekte, wobei erstere auf einen extrazellulären Wirkmechanismus zurückgeführt wurden [120]. Die Späteffekte zeigten ähnliche Auswirkungen wie eine intrazelluläre Substanzapplikation. Da für VPA und PHT auch intrazelluläre Wirkmechanismen gezeigt wurden, müsste zur Untersuchung dieser Effekte eine längere Inkubationsdauer gewählt werden.

## **5.7. Einfluss der Multidrug-Transporter-Inhibitoren Verapamil und Probenecid auf die epileptiforme Aktivität**

Die epileptiforme Aktivität im Subiculum bei Verwendung des hoch-Kalium-Modells war über 40 min resistent gegenüber einer antikonvulsiven Wirkung von Verapamil.

Im Gyrus dentatus war eine Aktivitätsänderung von SLE zu slow spiking-Aktivität unter VPM zu sehen, jedoch kam es unter PBN + VPM zu keiner Aktivitätsänderung von SLE, aber zu einem Wechsel von fast zu slow spiking-Aktivität.

Multidrug-Transporter-Inhibitoren hatten keine supprimierende Wirkung auf die epileptiforme Aktivität. Ob die Aktivitätsveränderung von SLE auf eine Blockade von Transportproteinen oder Calcium-Kanälen zurückzuführen ist, lässt sich hier nicht sagen. Ein zeitabhängiger Aktivitätswechsel unter der erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration konnte hier in Kontrollversuchen über 60 min in beiden Gehirnregionen nicht gesehen werden.

In neocorticalen Schnitten wurde von Straub et al. (1996) eine inhibitorische Wirkung von Verapamil 40  $\mu\text{M}$  auf epileptiforme Feldpotentiale nachgewiesen [86]. Neben einer anderen Gehirnregion untersuchten sie jedoch epileptiforme Aktivität, die durch eine Bicucullin-ASCF-Lösung oder 0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ -ACSF induziert wurden. Verapamil kann also unter bestimmten Bedingungen eine antikonvulsive Wirkung aufweisen.

In meinen Experimenten konnte kein Effekt von Probenecid auf die epileptiforme Aktivität beobachtet werden. Bei SLE, die in neocorticalen Gehirnschnitten von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie durch Einwaschen von Bicucullin und hoch-Kalium induziert wurden, bewirkten Verapamil und Probenecid jedoch in 31 % der Schnitte eine Aktivitätsänderung zu spiking-Aktivität und nach 40 min Einwaschen eine Suppression in 10 % der Schnitte [98].

## 5.8. Beitrag der Multidrug-Transporter zur Pharmakoresistenz

Betrachtet man die krampfartige Aktivität, die der Kombination aus Antikonvulsivum und Multidrug-Transporter-Inhibitor ausgesetzt ist, zeigt sich, dass im Subiculum nur in 4,2 % eine Suppression erzielt werden konnte. Die resistenten 62,5 % der Schnitte zeigten zwar keine Veränderung der Aktivitätsart, jedoch eine signifikante Reduktion der Aktivitätsparameter. Die Pharmakoresistenz konnte durch die additive Gabe von Multidrug-Transporter-Inhibitoren nur in einem Gehirnschnitt aufgehoben werden. Eine durch die vorherige Gabe eines Antikonvulsivums bewirkte Reduktion der Ereignisamplituden ließ sich verstärken. Multidrug-Transporter scheinen im resezierten Subiculum kein relevanter Faktor der Pharmakoresistenz zu sein.

Im Gyrus dentatus zeigte sich eine Suppressionsrate von 16,7 % der pharmakoresistenten SLE. Die pharmakoresistenten SLE, die 59,5 % der induzierten SLE darstellen, zeigten eine im Vergleich zur Präinkubation mit AED oder MDTI signifikant größere Parametermodulation. Multidrug-Transporter sind im resezierten Gyrus dentatus in Einzelfällen an der Pharmakoresistenz beteiligt.

Es scheint gesichert zu sein, dass Phenytoin ein Substrat für MRP2 und andere MRP-Typen ist. Bei MRP2 Knockout-Mäusen wurde eine höhere Phenytoin-Konzentration im Gehirn gemessen, was für einen Auswärtstransport durch MRP2 spricht [121]. Für P-glycoprotein ist die Datenlage noch widersprüchlich. MDR1 in in-vitro-Zelllinien transportierte Phenytoin [122], während in MDR1a Knockout-Mäusen die Phenytoinkonzentration von der Kontrolle nicht verschieden war [123].

Auch bei Carbamazepin ist die Datenlage nicht eindeutig, ob es ein Substrat für Multidrug-Transporter ist. Im humanen Gewebe konnten Hinweise für einen Transport gefunden werden [78]. Bei Patienten mit CBZ-resistenter Epilepsie wurde jedoch in vitro bei einer Dosis von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  kein frequenzabhängiger Block von  $\text{Na}^+$ -Kanälen gesehen [69]. Dies könnte aufgrund einer neuronalen Expression von Transportproteinen oder entsprechend der Target-Hypothese für eine Wirkungslosigkeit am Zielort sprechen, wobei epilepsiebedingte Veränderungen von Natrium-Kanälen sich abhängig vom untersuchten Zelltyp und dem untersuchten Epilepsiemodell unterscheiden [70, 124]. Jedoch wurde gesehen, dass an der

Bluthirnschranke Carbamazepin zu einem prokonvulsiven Metaboliten umgewandelt wird [125].

Der bidirektionale Transport von Valproat über die Bluthirnschranke soll über passive Diffusion und Carrier-assoziiertem Transport laufen, wobei der Efflux-Transport effizienter als der Influx-Transport sein soll. Valproat ist wie Carbamazepin nicht sicher ein Substrat für P-glycoprotein und MRP1 und MRP2 [123]. Das Konzentrationsverhältnis von Valproat in Plasma und Hirngewebe ließ sich durch Probenecid verbessern. Welcher MRP-Typ dabei involviert ist, ist nicht geklärt. Auch wird ein Beitrag des organischen Anionen-Transporters vermutet [126]. Neben einer Blockade kann Probenecid aber auch den Transport über MRP2 verstärken, was durch zwei Bindungsstellen für Liganden erklärt wird [127].

Bei bovinen Zellen zeigte Probenecid eine konzentrationsabhängige Wirkumkehr. Bei einer Konzentration von 0,5 mM verstärkte Probenecid den Transport von VPA, bei einer Konzentration von 2 mM wurde der Transport inhibiert [128]. Damit waren die hier durchgeführten Versuche bei einer verwendeten Konzentration von 400 µM im Bereich der niedrigeren Konzentration. Da Multidrug-Transporter eine unterschiedliche Substratspezifität zwischen verschiedenen Spezies haben, sind tierexperimentelle Aussagen zur Transporteraktivität jedoch nicht immer auf den Menschen zu übertragen [123].

Da Valproat effektiv in der Behandlung von Patienten mit pharmakoresistentem Status epilepticus war und so ein Ereignis mit einer erhöhten Expression von MRP und PGP an der Bluthirnschranke einhergeht, wurde vermutet, dass Valproat kein Substrat dieser Transportproteine ist [123]. Es wurde jedoch gezeigt, dass bei epileptischen Anfällen die Bluthirnschranke durchbrochen werden kann, so dass Wirkstoffe an der Bluthirnschranke vorbei zu Neuronen und Glia gelangen können [76]. Scism et al. (2000) konnten zeigen, dass an der Bluthirnschranke und im Hirnparenchym unterschiedliche Transportproteine exprimiert sind, die Valproat transportieren können [120]. Ebenso wurde für OAT-2 ein Transport von VPA gezeigt. Die Funktion von OAT-2 im Gehirn ist jedoch noch nicht hinreichend erforscht [126].

In den vorliegenden Experimenten konnten die Pharmaka unter Umgehung der Bluthirnschranke direkt auf die Gehirnschnitte wirken. Es müssen hier also parenchymale Mechanismen für die gezeigte Pharmakoresistenz verantwortlich sein. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der MDT-Proteine.

### **5.9. Untersuchung der Patientenmerkmale**

Die Patienten, bei denen unter der Gabe eines AED mit MDTI eine Suppression in wenigstens einem Gehirnschnitt erreicht werden konnte, unterschieden sich nicht in Bezug auf die vorhandenen epidemiologischen Daten. Ebenso konnte im Gyrus dentatus keine signifikant unterschiedliche Expressionsrate von PGP, MRP1, MRP2, MRP5 oder major vault-Protein festgestellt werden. Im Subiculum wurde zwar bei einem Patienten eine Suppression unter AED und MDTI gesehen, jedoch waren hier keine Expressionsdaten verfügbar. Eine deutliche Überexpression von Transportproteinen kann hier noch nicht ausgeschlossen werden.

Durch welche Eigenschaften sich ein Patient mit pharmakoresistenter Epilepsie, der von einer Kombinationstherapie mit einem MDTI profitieren würde, auszeichnet, kann hier nicht beantwortet werden.

Bei der Untersuchung von neocorticalen Schnitten von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie konnte ebenfalls kein Patientenmerkmal zur Beantwortung dieser Frage festgestellt werden [98].

### **5.10. Heterogene Effekte bei Gehirnschnitten eines Patienten**

Bei 36,8 % der Patienten, von denen mehr als ein Gehirnschnitt untersucht wurde, konnten durch AED + MDTI unterschiedliche Wirkungen auf die epileptiforme Aktivität beobachtet werden. Diese Patienten waren signifikant jünger als Patienten, in deren Gewebe eine homogene Wirkung gesehen wurde. Heterogene Effekte im

Gyrus dentatus wurden bereits für die Wirkung von CBZ beobachtet [97]. Hier zeigten sie sich unter allen drei verwendeten Antikonvulsiva. In der Untersuchung von neocorticalen Schnitten konnte ebenfalls eine Heterogenität festgestellt werden, die signifikant häufiger bei jüngeren Patienten auftrat [98]. Ein dort festgestellter Zusammenhang mit einer hohen Anfallsfrequenz konnte hier nicht bestätigt werden. Es wird vermutet, dass die Faktoren der Pharmakoresistenz heterogen im Gewebe verteilt sind, so dass bei der Resektion pharmakoresistente und pharmakosensitive Anteile entfernt werden. Das Auftreten bei jüngeren Patienten könnte als Phänomen einer sich entwickelnden Resistenz mit noch nicht vollständiger Ausprägung interpretiert werden. Letztendlich sind jedoch die Bedeutung und Ursache nicht geklärt.

### **5.11. Limitation dieser Untersuchung**

In diesem Projekt konnte kein Kontrollexperiment mit nicht-epileptogenem oder pharmakosensitivem Gewebe durchgeführt werden. Durch ethische Limitationen können nur sehr wenige Kontrollversuche mit menschlichem Gewebe durchgeführt werden. Die verwendeten Inhibitoren der Multidrug-Transporter sind in ihrer Wirkung unspezifisch und haben selbst eine modulierende Wirkung auf die epileptiforme Aktivität. Mit spezifischen Inhibitoren könnten zwar gezielt einzelne Transporter-Proteine blockiert werden, durch die unspezifische Substratspezifität der Transporterproteine an sich kann jedoch der Effekt verschleiert werden. Weiterhin wäre der Einfluss einer Veränderung der GABAergen Transmission zu untersuchen. Der GABA-A-Rezeptor durchläuft eine heterogene Expression der Untereinheiten in der Entwicklung, so dass eine Aktivierung nicht nur eine Inhibition, sondern eine Depolarisation bewirken kann [129]. Der GABA-A-Rezeptor zeigt auch beim Erwachsenen eine hohe Plastizität, die auch durch epileptische Anfälle beeinflusst wird [130]. Neben der neuronalen Transmission wäre noch der gliale Einfluss auf die Initiation, Erhaltung und Suppression der epileptischen Aktivität zu untersuchen. So unterdrücken VPA und PHT die astrozytäre Aktivität durch Suppression der glialen  $Ca^{2+}$ -Signale und Glutamat-Ausschüttung mit noch unklarer Relevanz [131]. Darüber

hat Valproat über die Inhibition der Histon-Deacetylase einen Einfluss auf die Genexpression [55]. Es wurde gezeigt, dass Valproat in einer astrozytären und gemischt astrozytär-neuronalen Zellkultur der Ratte einen Einfluss auf die astrozytären mRNA-Level von postsynaptischen Adhäsionsmolekülen und extrazellulären Matrixproteinen hatte [132]. Dies konnte auch bei Anwendung des Histon-Deacetylase-Inhibitors Natrium-Butyrat beobachtet werden. Deshalb wird von den Autoren dieser Arbeit vermutet, dass Valproat über die epigenetische Regulation der Bildung von Adhäsions- und extrazellulären Matrixproteinen die synaptische Exzitabilität beeinflussen kann [64]. In den hier durchgeführten Experimenten kann die Versuchsdauer als zu kurz angenommen werden, als dass ein relevanter epigenetischer Effekt zum Tragen kommen könnte.

## **5.12. Schlussfolgerungen**

Es konnte in vitro unter Umgehung der Bluthirnschranke gezeigt werden, dass die Gabe eines unspezifischen Inhibitors der Multidrug-Transporter eine Suppression in einzelnen hippocampalen Gehirnschnitten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie bewirkt. Dieser Effekt ist jedoch nur in einem Bruchteil der Patienten zu sehen und nicht immer in allen Gehirnschnitten eines solchen Patienten zu beobachten. Die Patienten, die von einer solchen Therapie profitieren würden, zeigten keine spezifische Merkmalsausprägung, insbesondere keine unterschiedliche Expressionsrate der untersuchten Transportproteine. Heterogene Effekte wurden bei jüngeren Patienten gesehen, was eine zeitabhängige Entwicklung der Pharmakoresistenz vermuten lässt. Zusammengefasst stellen Transportproteine einen hier wenig bedeutenden Faktor der in-vitro-Pharmakoresistenz dar, wobei wahrscheinlich durch die Gesamtheit aller möglichen Resistenzfaktoren das klinische Erscheinungsbild dargestellt wird.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Fisher, R.S., et al., *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia* 2005;46(4):470-2.
2. Berg, A.T., et al., *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. *Epilepsia* 2010;51(4):676-85.
3. Engel, J., Jr., *Report of the ILAE classification core group*. *Epilepsia* 2006;47(9):1558-68.
4. Verma, A. and R. Radtke, *EEG of partial seizures*. *J Clin Neurophysiol* 2006;23(4):333-9.
5. Alarcon, G., et al., *Origin and propagation of interictal discharges in the acute electrocorticogram. Implications for pathophysiology and surgical treatment of temporal lobe epilepsy*. *Brain* 1997;120 ( Pt 12):2259-82.
6. Bonnett, L.J., et al., *Risk of recurrence after a first seizure and implications for driving: further analysis of the Multicentre study of early Epilepsy and Single Seizures*. *BMJ* 2010;341:c6477.
7. Ngugi, A.K., et al., *Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis*. *Neurology* 2011;77(10):1005-12.
8. Hauser, W.A., J.F. Annegers, and W.A. Rocca, *Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota*. *Mayo Clin Proc* 1996;71(6):576-86.
9. Guekht, A., et al., *The epidemiology of epilepsy in the Russian Federation*. *Epilepsy Res* 2010;92(2-3):209-18.
10. Stafstrom, C.E., *The role of the subiculum in epilepsy and epileptogenesis*. *Epilepsy Curr* 2005;5(4):121-9.
11. Scoville, W.B. and B. Milner, *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20(1):11-21.
12. Stefan, H., et al., *Clinical prediction of postoperative seizure control: structural, functional findings and disease histories*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80(2):196-200.
13. Bone, B., et al., *Secondarily generalized seizures in temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia* 2012;53(5):817-24.

14. Yang, T., D. Zhou, and H. Stefan, *Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression?* J Neurol Sci 2010;296(1-2):1-6.
15. Kann, O., et al., *Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans.* Brain 2005;128(Pt 10):2396-407.
16. Freund, T.F., et al., *Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability.* Brain Res Bull 1992;28(1):27-38.
17. Sloviter, R.S., *Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity.* J Comp Neurol 1989;280(2):183-96.
18. Heinemann, U., et al., *Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus.* Prog Brain Res 2002;135:197-210.
19. Starkov, A.A., C. Chinopoulos, and G. Fiskum, *Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury.* Cell Calcium 2004;36(3-4):257-64.
20. Friberg, H. and T. Wieloch, *Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration.* Biochimie 2002;84(2-3):241-50.
21. Sloviter, R.S., *The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy.* Ann Neurol 1994;35(6):640-54.
22. Heinemann, U., *Basic mechanisms of partial epilepsies.* Curr Opin Neurol 2004;17(2):155-9.
23. Witter, M.P. and H.J. Groenewegen, *The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex.* Prog Brain Res 1990;83:47-58.
24. Greene, J.R. and S. Totterdell, *Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro.* J Comp Neurol 1997;380(3):395-408.
25. O'Mara, S.M., et al., *The subiculum: a review of form, physiology and function.* Prog Neurobiol 2001;64(2):129-55.
26. Naber, P.A., M.P. Witter, and F.H. Lopes Silva, *Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum.* Ann N Y Acad Sci 2000;911:392-403.

27. Deadwyler, S.A. and R.E. Hampson, *Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum*. Neuron 2004;42(3):465-76.
28. O'Mara, S., *The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us*. J Anat 2005;207(3):271-82.
29. Walther, H., et al., *Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium*. Neurosci Lett 1986;69(2):156-61.
30. Dugladze, T., U. Heinemann, and T. Gloveli, *Entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro*. Brain Res 2001;905(1-2):224-31.
31. Lehmann, T.N., et al., *Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats*. Epilepsia 2000;41 Suppl 6:S190-4.
32. Cavazos, J.E., S.M. Jones, and D.J. Cross, *Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy*. Neuroscience 2004;126(3):677-88.
33. Cohen, I., et al., *On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro*. Science 2002;298(5597):1418-21.
34. Wozny, C., et al., *The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy*. Epilepsia 2005;46 Suppl 5:17-21.
35. Buzsaki, G., *Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective*. J Sleep Res 1998;7 Suppl 1:17-23.
36. Soriano, E. and M. Frotscher, *Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive*. Hippocampus 1994;4(1):65-9.
37. Amaral, D.G., H.E. Scharfman, and P. Lavenex, *The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)*. Prog Brain Res 2007;163:3-22.
38. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med 1998;4(11):1313-7.
39. Wozny, C., et al., *Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats*. Neurobiol Dis 2005;19(3):451-60.
40. Behr, J. and U. Heinemann, *Low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in the subiculum before and after disconnection from rat hippocampal and entorhinal cortex slices*. Neurosci Lett 1996;205(1):25-8.

41. Behr, J., K.J. Lyson, and I. Mody, *Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus*. J Neurophysiol 1998;79(4):1726-32.
42. Mattson, R.H., J.A. Cramer, and J.F. Collins, *A comparison of valproate with carbamazepine for the treatment of complex partial seizures and secondarily generalized tonic-clonic seizures in adults. The Department of Veterans Affairs Epilepsy Cooperative Study No. 264 Group*. N Engl J Med 1992;327(11):765-71.
43. Richens, A., et al., *A multicentre comparative trial of sodium valproate and carbamazepine in adult onset epilepsy. Adult EPITEG Collaborative Group*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994;57(6):682-7.
44. Kwan, P. and M.J. Brodie, *Early identification of refractory epilepsy*. N Engl J Med 2000;342(5):314-9.
45. Kwan, P. and M.J. Brodie, *Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on?* Seizure 2000;9(7):464-8.
46. Landmark, C.J., *Targets for antiepileptic drugs in the synapse*. Med Sci Monit 2007;13(1):RA1-7.
47. Brodie, M.J. and M.A. Dichter, *Antiepileptic drugs*. N Engl J Med 1996;334(3):168-75.
48. Kuo, C.C., *A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na<sup>+</sup> channels*. Mol Pharmacol 1998;54(4):712-21.
49. Reckziegel, G., et al., *Carbamazepine effects on Na<sup>+</sup> currents in human dentate granule cells from epileptogenic tissue*. Epilepsia 1999;40(4):401-7.
50. Johannessen, C.U., *Mechanisms of action of valproate: a commentary*. Neurochem Int 2000;37(2-3):103-10.
51. Loscher, W., *Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy*. CNS Drugs 2002;16(10):669-94.
52. Johannessen, C.U., et al., *The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice*. Epilepsy Res 2001;47(3):247-56.
53. Harwood, A.J. and G. Agam, *Search for a common mechanism of mood stabilizers*. Biochem Pharmacol 2003;66(2):179-89.
54. Chetcuti, A., et al., *Altered gene expression in mice treated with the mood stabilizer sodium valproate*. Int J Neuropsychopharmacol 2006;9(3):267-76.
55. Brodie, S.A. and J.C. Brandes, *Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far*. Expert Rev Anticancer Ther 2014;14(10):1097-100.

56. Stephen, L.J., P. Kwan, and M.J. Brodie, *Does the cause of localisation-related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment?* *Epilepsia* 2001;42(3):357-62.
57. Semah, F., et al., *Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence?* *Neurology* 1998;51(5):1256-62.
58. Hitiris, N., et al., *Predictors of pharmaco-resistant epilepsy.* *Epilepsy Res* 2007;75(2-3):192-6.
59. Engel, J., Jr., *Surgery for seizures.* *N Engl J Med* 1996;334(10):647-52.
60. Wiebe, S., et al., *A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy.* *N Engl J Med* 2001;345(5):311-8.
61. Tanriverdi, T., et al., *Long-term seizure outcome after mesial temporal lobe epilepsy surgery: cortical amygdalohippocampectomy versus selective amygdalohippocampectomy.* *J Neurosurg* 2008;108(3):517-24.
62. Shneker, B.F. and N.B. Fountain, *Epilepsy.* *Dis Mon* 2003;49(7):426-78.
63. D'Antuono, M., et al., *Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro.* *Epilepsia* 2010;51(3):423-31.
64. Fang, M., et al., *A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis.* *Med Hypotheses* 2011;76(6):871-6.
65. Zhang, C.L., J.P. Dreier, and U. Heinemann, *Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants.* *Epilepsy Res* 1995;20(2):105-11.
66. Naylor, D.E., H. Liu, and C.G. Wasterlain, *Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmaco-resistance in status epilepticus.* *J Neurosci* 2005;25(34):7724-33.
67. Wasterlain, C.G., et al., *Molecular basis of self-sustaining seizures and pharmaco-resistance during status epilepticus: The receptor trafficking hypothesis revisited.* *Epilepsia* 2009;50 Suppl 12:16-8.
68. Ellerkmann, R.K., et al., *Molecular and functional changes in voltage-dependent Na(+) channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells.* *Neuroscience* 2003;119(2):323-33.
69. Remy, S., et al., *Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats.* *Eur J Neurosci* 2003;17(12):2648-58.
70. Remy, S., et al., *A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.* *Ann Neurol* 2003;53(4):469-79.

71. Bethmann, K., et al., *Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA A receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy*. *Neurobiol Dis* 2008;31(2):169-87.
72. Stefkova, J., R. Poledne, and J.A. Hubacek, *ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases*. *Physiol Res* 2004;53(3):235-43.
73. Schmidt, D. and W. Loscher, *Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms*. *Epilepsia* 2005;46(6):858-77.
74. van Vliet, E.A., et al., *Expression and cellular distribution of major vault protein: a putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia* 2004;45(12):1506-16.
75. Nies, A.T., et al., *Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain*. *Neuroscience* 2004;129(2):349-60.
76. Sisodiya, S.M., et al., *Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy*. *Brain* 2002;125(Pt 1):22-31.
77. Aronica, E., et al., *Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia* 2004;45(5):441-51.
78. Marchi, N., et al., *A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine*. *Epilepsia* 2005;46(10):1613-9.
79. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats*. *Epilepsia* 2003;44(12):1479-86.
80. Bachmeier, C.J. and D.W. Miller, *A fluorometric screening assay for drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier*. *Pharm Res* 2005;22(1):113-21.
81. Pastan, I., et al., *A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4486-90.
82. Kovacs, R., et al., *Functional test of multidrug transporter activity in hippocampal-neocortical brain slices from epileptic patients*. *J Neurosci Methods* 2011;200(2):164-72.
83. Ballerini, P., et al., *Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release*. *Neuroreport* 2002;13(14):1789-92.

84. Park, J.B. and S.J. Kim, *Anti-hypertensive effects of probenecid via inhibition of the alpha-adrenergic receptor*. *Pharmacol Rep* 2011;63(5):1145-50.
85. Potschka, H. and W. Loscher, *Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain*. *Neuroreport* 2001;12(11):2387-9.
86. Straub, H., et al., *The effects of verapamil and flunarizine on epileptiform activity induced by bicuculline and low Mg<sup>2+</sup> in neocortical tissue of epileptic and primary non-epileptic patients*. *Brain Res* 1996;733(2):307-11.
87. Wurlpel, J.N. and S.N. Iyer, *Calcium channel blockers verapamil and nimodipine inhibit kindling in adult and immature rats*. *Epilepsia* 1994;35(2):443-9.
88. Wiemann, M., et al., *Simultaneous blockade of intracellular calcium increases and of neuronal epileptiform depolarizations by verapamil*. *Brain Res* 1996;734(1-2):49-54.
89. Iannetti, P., et al., *Addition of verapamil in the treatment of severe myoclonic epilepsy in infancy*. *Epilepsy Res* 2009;85(1):89-95.
90. Abraham, A., et al., *Peripheral metabolism of (R)-[11C]verapamil in epilepsy patients*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35(1):116-23.
91. Chaisewikul, R., N. Baillie, and A.G. Marson, *Calcium antagonists as an add-on therapy for drug-resistant epilepsy*. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;(4):CD002750.
92. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain*. *Neuroreport* 2001;12(16):3557-60.
93. Summers, M.A., J.L. Moore, and J.W. McAuley, *Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy*. *Ann Pharmacother* 2004;38(10):1631-4.
94. Kubota, H., et al., *Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis*. *Epilepsy Res* 2006;68(3):213-28.
95. Iannetti, P., A. Spalice, and P. Parisi, *Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus*. *Epilepsia* 2005;46(6):967-9.
96. Gabriel, S., et al., *Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis*. *J Neurosci* 2004;24(46):10416-30.

97. Jandova, K., et al., *Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices*. Brain 2006;129(Pt 12):3290-306.
98. Sandow, N.F.A., *Faktoren der Pharmakoresistenz*, in *Medizinische Fakultät*. 2012, Charité - Universitätsmedizin Berlin.
99. Raue, C., *Ektope Expression ATP-abhängiger Transportproteine im humanen resezierten epileptogenen Gewebe*, in *Department of Medicine*. 2010, Charité - University Medicine Berlin.
100. Dlugos, D.J., *The early identification of candidates for epilepsy surgery*. Arch Neurol 2001;58(10):1543-6.
101. *Pre-surgical evaluation for epilepsy surgery - European standards*. European Federation of Neurological Societies Task Force. Eur J Neurol 2000;7(1):119-22.
102. Lux, H.D. and E. Neher, *The equilibration time course of (K + ) 0 in cat cortex*. Exp Brain Res 1973;17(2):190-205.
103. Wyler AR, D.F., Schweitzer JB, et al. , *A grading system for mesial temporal lobe pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy*. J Epilepsy 1992;5:220-5.
104. Huberfeld, G., et al., *Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy*. Nat Neurosci 2011;14(5):627-34.
105. Rutecki, P.A., F.J. Lebeda, and D. Johnston, *Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus*. J Neurophysiol 1985;54(5):1363-74.
106. Liotta, A., et al., *Partial disinhibition is required for transition of stimulus-induced sharp wave-ripple complexes into recurrent epileptiform discharges in rat hippocampal slices*. J Neurophysiol 2011;105(1):172-87.
107. Ogata, N., N. Hori, and N. Katsuda, *The correlation between extracellular potassium concentration and hippocampal epileptic activity in vitro*. Brain Res 1976;110(2):371-5.
108. Wendling, F., et al., *Epileptic fast intracerebral EEG activity: evidence for spatial decorrelation at seizure onset*. Brain 2003;126(Pt 6):1449-59.
109. Uva, L., M. Avoli, and M. de Curtis, *Synchronous GABA-receptor-dependent potentials in limbic areas of the in-vitro isolated adult guinea pig brain*. Eur J Neurosci 2009;29(5):911-20.
110. Gnatkovsky, V., et al., *Fast activity at seizure onset is mediated by inhibitory circuits in the entorhinal cortex in vitro*. Ann Neurol 2008;64(6):674-86.



111. de Curtis, M. and V. Gnatkovsky, *Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity*. *Epilepsia* 2009;50(12):2514-25.
112. de Curtis, M. and G. Avanzini, *Interictal spikes in focal epileptogenesis*. *Prog Neurobiol* 2001;63(5):541-67.
113. Kohling, R., et al., *Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients*. *Brain* 1998;121 ( Pt 6):1073-87.
114. Maier, N., V. Nimrich, and A. Draguhn, *Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices*. *J Physiol* 2003;550(Pt 3):873-87.
115. Nimrich, V., et al., *Induced sharp wave-ripple complexes in the absence of synaptic inhibition in mouse hippocampal slices*. *J Physiol* 2005;563(Pt 3):663-70.
116. Avoli, M., *Do interictal discharges promote or control seizures? Experimental evidence from an in vitro model of epileptiform discharge*. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 3:2-4.
117. Wilkus, R.J., C.B. Dodrill, and A.S. Troupin, *Carbamazepine and the electroencephalogram of epileptics: a double blind study in comparison to phenytoin*. *Epilepsia* 1978;19(3):283-91.
118. Spencer, S.S., et al., *Interictal spikes on intracranial recording: behavior, physiology, and implications*. *Epilepsia* 2008;49(11):1881-92.
119. de la Prida, L.M., et al., *The subiculum comes of age*. *Hippocampus* 2006;16(11):916-23.
120. Scism, J.L., et al., *Probenecid-inhibitable efflux transport of valproic acid in the brain parenchymal cells of rabbits: a microdialysis study*. *Brain Res* 2000;884(1--2):77-86.
121. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity*. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(1):124-31.
122. Tishler, D.M., et al., *MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy*. *Epilepsia* 1995;36(1):1-6.
123. Baltés, S., et al., *Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays*. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(1):331-43.
124. Vreugdenhil, M., et al., *Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy*. *Epilepsy Res* 1998;32(1-2):309-20.

125. Ghosh, C., et al., *A pro-convulsive carbamazepine metabolite: quinolinic acid in drug resistant epileptic human brain*. Neurobiol Dis 2012;46(3):692-700.
126. Kobayashi, Y., et al., *Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in mice*. Mol Pharmacol 2002;62(1):7-14.
127. Zelcer, N., et al., *Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2)*. J Biol Chem 2003;278(26):23538-44.
128. Gibbs, J.P., et al., *Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport*. Epilepsy Res 2004;58(1):53-66.
129. Fritschy, J.M., *Significance of GABAA Receptor Heterogeneity: Clues from Developing Neurons*. Adv Pharmacol 2015;73:13-39.
130. Scharfman, H.E. and A.R. Brooks-Kayal, *Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis?* Adv Exp Med Biol 2014;813:133-50.
131. Tian, G.F., et al., *An astrocytic basis of epilepsy*. Nat Med 2005;11(9):973-81.
132. Wang, C.C., et al., *Valproic acid mediates the synaptic excitatory/inhibitory balance through astrocytes--a preliminary study*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2012;37(1):111-20.

## **Lebenslauf**

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



## Publikationsliste

Zahn RK, Liotta A, **Kim S** et al. Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the hippocampal region in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurosci Lett*. 2012 Apr 4;513(2):124-8

Lautenbach M, Berndsen M, **Kim S** et al. Rheumahandchirurgie, *Handchir Scan* 2013; 02(01): 69-89

Lautenbach M, **Kim S**, Millrose M, Eisenschenk A. Nodular giant cell tumour of the tendon sheath of the hand: analysis of eighty-four cases--diagnostic decisions and outcome. *Int Orthop*. 2013 Nov;37(11):2211-5.

**Kim S**, Lautenbach M, Millrose M, Jodkowski JK, Asmus A, Eisenschenk A. Morbus Dupuytren (Übersichtsartikel), *Obere Extremität - Schulter, Ellenbogen, Hand*. 2013; 8(4):198-204.

Lautenbach M, **Kim S**, Berndsen M, Eisenschenk A. The palmar approach for PIP-arthroplasty according to Simmen - Results after 8 years follow up, *J Orthop Sci*. 2014 Sep;19(5):722-8.

Sadow N, **Kim S**, Raue C, Päsler D, Klaf ZJ, Antonio LL, Hollnagel JO, Kovacs R, Kann O, Horn P, Vajkoczy P, Holtkamp M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Pragst F, Gabriel S, Lehmann TN, Heinemann U. Drug resistance in cortical and hippocampal slices from resected tissue of epilepsy patients: no significant impact of P-glycoprotein and Multidrug resistance associated proteins. *Front Neurol* 2015;6:30.  
Nora Sadow and **Simon Kim** have contributed equally to this work

## Poster und Vorträge

2006/06 **Kim S**, Leite Antonio L, Kovács R, Päsler D, Raue C, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus (Poster) Berlin Neuroscience Forum 2006

- 2007/03 **Kim S**, Kovács R, Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Huchzermeyer C, Kann O, Heinemann U, Cavalheiro EA, Lehmann TN, Gabriel S. Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus and temporal cortex (Poster) 7. Tagung der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft/Göttingen
- 2008/06 **Kim S**, Sandow N, Kovács R, Raue C, Päsler D, Fidzinski P, Alam M, Klaft ZJ, Leite Antonio L, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. Drug transporters in human epileptic brain – functional studies (Poster) Berlin Neuroscience Forum 2008
- 2008/06 Sandow N, **Kim S**, Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Kovács R, Fidzinski P, Alam M, Klaft ZJ, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. Drug resistance in the human epileptic hippocampus and temporal cortex (Poster) Berlin Neuroscience Forum 2008
- 2010/02 **Kim S**, Sandow N, Gabriel S, Lehmann TN, Horn P, Heinemann U. Effects of drug transport inhibitors on high potassium induced seizure like events in human temporal lobe epilepsy (Vortrag) 4. Epicure Meeting, Marseille
- 2014/01 **Kim S**. Schnittführung beim M. Dupuytren (Vortrag) Trauma Treff Greifswald
- 2014/04 **Kim S**. Ulnar impaction syndrome (Vortrag) 11. Polnisch-Deutsches handchirurgisches Symposium, Stettin
- 2015/04 **Kim S** Schenkelhals- und pertrochantäre Frakturen (Vortrag) Trauma Treff Greifswald

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Simon Kim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Beitrag ATP-abhängiger Transportproteine zur Pharmakoresistenz von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie 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](http://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/der Betreuer/in, 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

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Simon Kim hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Sadow N, Kim S, Raue C, Päsler D, Klafz ZJ, Antonio LL, Hollnagel JO, Kovacs R, Kann O, Horn P, Vajkoczy P, Holtkamp M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Pragst F, Gabriel S, Lehmann TN, Heinemann U. Drug resistance in cortical and hippocampal slices from resected tissue of epilepsy patients: no significant impact of P-glycoprotein and Multidrug resistance associated proteins. Front Neurol 2015;6:30.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von 33,7% der elektrophysiologischen Experimente mit Auswertung

Zahn RK, Liotta A, Kim S et al. Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the hippocampal region in the pilocarpine model of epilepsy. Neurosci Lett. 2012 Apr 4;513(2):124-8

Beitrag im Einzelnen: Durchführung eines Teils der durchgeführten Experimente und  
Mitarbeit am Manuskript

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden



## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Uwe Heinemann für die Bereitstellung des Themas, das Aufschließen von Türen, die sich ohne seine Unterstützung nicht geöffnet hätten und seine unendliche Geduld.

Besonders danke ich Frau Dr. Siegrun Gabriel für die durchgängige intensive Betreuung bei den Experimenten, bei der Auswertung der Statistik, der Erstellung von Abbildungen und Überprüfung der Texte von Vorträgen und Schriftstücken, den Motivationsschüben, aber vor allem auch für die Zeit bei Sorgen jeder anderen Art.

Herrn Dr. Dennis Päsler danke ich für die Begleitung meiner ersten Versuche in der Neurophysiologie, ebenso Frau Dr. Claudia Raue, Frau Dr. Nora Sandow und Herrn Dr. Leandro Leite Antonio, mit denen die weiteren Versuche erfolgten, die ersten Vorträge entstanden und mit denen ich die ersten Konferenzen besuchte.

Herrn Dr. Thomas-Nicolas Lehmann danke ich dafür, dass er mich an Frau Dr. Gabriel weitergeleitet hat und mir diesen Weg bereitet hat.

Danken möchte ich den vielen Mitdoktoranden, Masterstudenten und Mitarbeitern des neurophysiologischen Instituts, die mich über die Zeit begleitet haben: Clemens Reiffurth, von dem ich anfangs das Bauen der Mikroelektroden lernte, Arnab und Gürsel für die Zeit im Labor und außerhalb, Herrn Dr. Gabriel, Herrn Dr. Siegmund und Herrn Schacht für die technische Unterstützung, Zin, der fleißig weiter gemessen hat, Robert für die Einladung, an der Publikation mitzuwirken, Richard und Professor Albus für die Einblicke in ihre Forschungsthemen und Frau Dr. Schulze und Frau Frosinski für alle Hilfen und Problemlösungen.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für alle Liebe und Unterstützung.