

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

DISSERTATION

Einfluss von Levetiracetam auf die Entstehung und  
Ausbreitung epileptischer Aktivität im limbischen Cortex

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ramazan Dag

aus Ömerli/Türkei

Datum der Promotion: 23.06.2019

***Für meine Familie***

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1. Epileptische Anfälle und Epilepsien.....	10
2.1.1. Epidemiologie epileptischer Anfälle und der Epilepsien.....	10
2.1.2. Definition und Einteilung epileptischer Anfälle .....	10
2.1.3. Definition und Einteilung der Epilepsien.....	11
2.2. Therapieansätze bei Epilepsie .....	12
2.3. Levetiracetam.....	13
2.3.1. Wirkmechanismen von Levetiracetam .....	14
2.4. Experimentelle Epileptologie.....	15
2.4.1. Der limbische Cortex und seine Rolle bei Temporallappenepilepsien .....	15
2.4.2. <i>In vitro</i> -Epilepsiemodelle .....	17
2.4.3. Intrinsische optische Signale .....	18
<b>3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>19</b>
<b>4. METHODIK.....</b>	<b>20</b>
4.1. Versuchstiere.....	20
4.2. Anfertigung der Hirnschnittpräparate.....	20
4.3. Versuchsaufbau .....	21
4.3.1. Perfusionskammer.....	21
4.3.2. Perfusionslösungen.....	22
4.4. Elektroden.....	23
4.4.1. Ableitelektroden .....	23
4.4.2. Bipolare Reizelektroden.....	23
4.5. Elektrophysiologische Messungen.....	23
4.5.1. Vitalitätsprüfung der Hirnschnittpräparate .....	23
4.5.2. Kontinuierliche Aufzeichnung der Feldpotenziale.....	24
4.6. Optische Messungen .....	24
4.7. Versuchsablauf .....	26
4.8. Datenerfassung und -analyse.....	28
4.9. Statistische Auswertung und Präsentation der Daten .....	30
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>

5.1.	Tiere und Gruppeneinteilung .....	31
5.2.	Elektrophysiologische Daten.....	32
5.2.1.	Latenz anfallsartiger Ereignisse .....	32
5.2.2.	Frequenz anfallsartiger Ereignisse .....	32
5.2.3.	Dauer anfallsartiger Ereignisse .....	34
5.2.4.	Amplitude des Feldpotenzials .....	36
5.3.	Optische Eigenschaften.....	38
5.3.1.	Ausbreitungsmuster anfallsartiger Ereignisse.....	38
5.3.2.	Ursprungsorte anfallsartiger Ereignisse .....	40
5.3.3.	Transmissionsänderung anfallsartiger Ereignisse.....	42
5.3.4.	Ausmaß der Ausbreitung epileptiformer Aktivität.....	46
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
6.1.	Einordnung der Ergebnisse.....	54
6.1.1.	Elektrophysiologische Messungen.....	54
6.1.2.	Optische Messungen .....	57
6.2.	Methodenkritik .....	59
6.3.	Klinische Relevanz der Ergebnisse und Übertragbarkeit.....	61
6.4.	Ausblick .....	63
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>65</b>
7.1.	Literatur .....	65
7.2.	Eidesstattliche Versicherung.....	78
7.3.	Lebenslauf .....	79
7.4.	Danksagung .....	80

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lage der Hippocampusformation und angrenzende Strukturen im Gehirn der Ratte .....	16
Abbildung 2: Elektroden im Hirnschnittpräparat .....	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs .....	27
Abbildung 5: Vergleich der Transmissionsänderung mit elektrischen Feldpotenzialen während eines AE.....	28
Abbildung 6: Originalbilder eines Hirnschnittpräparats während eines AE .....	29
Abbildung 7: Übersicht über die Anzahl der untersuchten Tiere und Hirnschnittpräparate in den jeweiligen Gruppen.....	31
Abbildung 8: Latenz zwischen Beginn der Einwaschphase von 4-AP bis zum Auftreten des ersten AE .....	32
Abbildung 9: Intragruppenvergleich der Frequenz der AEs.....	33
<b>Abbildung 10: Intergruppenvergleich der Frequenz der AEs.....</b>	<b>34</b>
Abbildung 11: Intragruppenvergleich der Dauer der AEs.....	35
<b>Abbildung 12: Intergruppenvergleich der Dauer der AEs .....</b>	<b>36</b>
Abbildung 13: Intragruppenvergleich der Feldpotenzial-Amplitude der AEs.....	37
Abbildung 14: Intergruppenvergleich der Feldpotenzial-Amplitude der AEs.....	38
Abbildung 15: Ausbreitungsmuster eines AE mit fehlfarbencodierten Differenzbildern .....	39
Abbildung 16: Verteilung der Ursprungsorte in den Hirnregionen in der jeweiligen Phase .....	42
Abbildung 17: Transmissionsänderung in der Kontroll-Gruppe in den Hirnregionen. ....	43
Abbildung 18: Transmissionsänderung in der 33 LEV-Gruppe in den Hirnregionen.....	44
Abbildung 19: Transmissionsänderung in der 100 LEV-Gruppe in den Hirnregionen.....	45
Abbildung 20: Transmissionsänderung in der 300 LEV-Gruppe in den Hirnregionen.....	46
Abbildung 21: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im gesamten Hirnschnittpräparat im Intragruppenvergleich .....	47
Abbildung 22: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im gesamten Hirnschnittpräparat im Intergruppenvergleich .....	48
Abbildung 23: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der Kontroll-Gruppe. ....	49
Abbildung 24: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 33 LEV-Gruppe. ....	50
Abbildung 25: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 100 LEV-Gruppe.....	51

Abbildung 26: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 300 LEV-Gruppe.....	52
Abbildung 27: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im temporalen Cortex in der 300 LEV-Gruppe im Intergruppenvergleich.....	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Anzahl der AEs in den einzelnen Gruppen bezüglich des Ausbreitungsmusters .....	40
--	----

## Abkürzungsverzeichnis

AE	Anfallsartiges Ereignis
aCSF	Artifizieller Liquor ( <i>artificial cerebrospinal fluid</i> )
AP	Aminopyridin
CA	Cornu ammonis
DG	Gyrus dentatus ( <i>dentate gyrus</i> )
EC	Entorhinaler Cortex
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie ( <i>International League Against Epilepsy</i> )
IOS	Intrinsisches optisches Signal
LEV	Levetiracetam
MO	Multifokaler Beginn ( <i>multifocal onset</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PC	Perirhinaler Cortex
SV	Synaptisches Vesikelprotein
Sub	Subiculum
TC	Temporaler Cortex
TLE	Temporallappen-Epilepsie

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsie ist eine häufige chronische Erkrankung des Gehirns, die durch eine andauernde erhöhte neuronale Erregungsbereitschaft charakterisiert ist und mit der Manifestation von mindestens einem unprovokierten epileptischen Anfall einhergeht. Bei der Behandlung der Epilepsie stehen Antiepileptika im Mittelpunkt. Levetiracetam hat sich in vielen klinischen Studien und in langjähriger klinischer Erfahrung als wirksames und relativ gut verträgliches Medikament erwiesen. Der Wirkmechanismus beruht auf Bindung an ein ubiquitär vorkommendes integrales Vesikelprotein, SV2A, das sich auf präsynaptischen Membranen befindet. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung. Der Hippocampus und die umliegenden Hirnregionen zeigen eine besonders niedrige Schwelle für die Entstehung epileptischer Aktivität. Außerdem ist dieser Teil des limbischen Systems an der Entstehung einer therapieresistenten Epilepsie entscheidend beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde als Modell das kombinierte entorhinaler Cortex-Hippocampus-Hirnschnitt-Präparat und 4-Aminopyridin als Chemokonvulsivum zur Induktion anfallsartiger Ereignisse gewählt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Auswirkungen von Levetiracetam in verschiedenen Konzentrationen auf die anfallsartigen Ereignisse im 4-Aminopyridin-Modell in kombinierten entorhinaler Cortex-Hippocampus-Präparaten von naiven Ratten und die epileptischer Aktivität *in vitro* mittels elektrophysiologischer und optischer Messmethoden zu definierten Zeitpunkten und Bedingungen zu analysieren.

Es haben sich die folgenden Ergebnisse ergeben:

- 1) Levetiracetam war sowohl in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  als auch von 300  $\mu\text{M}$  in der Lage, die Anfallsfrequenz in der Interventionsphase signifikant zu reduzieren. 300  $\mu\text{M}$  Levetiracetam bewirkte auch im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz.
- 2) 300  $\mu\text{M}$  Levetiracetam reduzierte signifikant die Dauer und die Feldpotenzial-Amplitude der anfallsartigen Ereignisse.
- 3) 300  $\mu\text{M}$  Levetiracetam konnte die Ausbreitung der epileptiformen Aktivität eindämmen und die Ausbreitungsfläche epileptischer Aktivität im gesamten Hirnschnittpräparat reduzieren.
- 4) Zusätzlich wurde im temporalen Cortex eine signifikante Reduktion der regionalen Ausbreitung durch 300  $\mu\text{M}$  Levetiracetam beobachtet.

Anhand dieser Ergebnisse können die folgenden Schlüsse gezogen werden: Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass Levetiracetam im *in vitro*-Modell eine dosisabhängige Wirkung auf mehrere Parameter wie Frequenz, Feldpotenzial-Amplitude und Dauer von anfallsartigen Ereignissen zeigte, was die Wirksamkeit der Substanz in der Klinik widerspiegelt. Zum anderen wurde gezeigt, dass Levetiracetam die Ausbreitung der epileptiformen Aktivität einschränkt; analog verhindert Levetiracetam bei Patienten mit Epilepsie häufig eine sekundäre Generalisierung fokaler Anfälle. Interessant wäre es, mit dieser Methode weitere Untersuchungen mit anderen Antiepileptika durchzuführen, um bestimmte Eigenschaften der Antiepileptika mit diesem Modell gezielt unter standardisierten Bedingungen zu vergleichen. Letztlich sollten weitere Untersuchungen über die bisher wenig erforschten Wirkmechanismen wie zum Beispiel die Modulation des Vesikelproteins SV2A erfolgen, um neue Antiepileptika zu entwickeln.

## **ABSTRACT**

Epilepsy is a common chronic brain disease that is characterized by increased neuronal excitability and that is associated with manifestation of at least one unprovoked epileptic seizure. The treatment of epilepsy focuses on anticonvulsant drugs. In many clinical trials, levetiracetam has proven to be an effective and relatively well-tolerated drug. The mechanism of action is based on binding to a ubiquitous integral vesicle protein, SV2A, located on presynaptic membranes. This protein plays an important role in the regulation of neurotransmitter release. The hippocampus and surrounding brain regions are known to have a particularly low threshold for the development of epileptic activity. In addition, this portion of the limbic system is critically involved in the development of refractory focal epilepsy. In the present work, the 4-aminopyridine-modell was chosen to induce seizure-like events in the combined *in-vitro* entorhinal cortex-hippocampus preparations of naïve rats. The aim of the present study was to evaluate the effects of levetiracetam on these experimentally induced seizure-like events using electrophysiological and optical measurement methods at defined timepoints and under specific conditions.

The following results have been found:

- 1) Levetiracetam concentrations of 100  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$  were both able to significantly reduce the seizure frequency in the intervention phase, with 300  $\mu\text{M}$



levetiracetam also showing a significant reduction in frequency as compared to controls.

- 2) 300  $\mu$ M levetiracetam significantly shortened the duration and field potential amplitude of seizure-like events.
- 3) 300  $\mu$ M levetiracetam significantly reduced the spread of epileptiform activity and significantly reduced the size of the whole brain slice with seizure activity.
- 4) In addition, in the temporal cortex 300  $\mu$ M levetiracetam resulted in a significant reduction of seizure spread.

Based on these results, the following conclusions can be drawn: on the one hand, it could be shown that levetiracetam had a dose-dependent effect on several electrophysiological parameters. On the other hand, it has been shown that levetiracetam limits the spread of epileptiform activity and thus potentially prevents secondary generalization of seizures. In any case, using this method it would be interesting to conduct further investigations with other anticonvulsants in order to specifically compare certain properties of anticonvulsants with this model under standardized conditions.

Finally, further investigations should be carried out on the hitherto little researched mechanisms of action such as modulation of vesicle protein SV2A in order to develop new anticonvulsants accordingly.

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1. Epileptische Anfälle und Epilepsien**

#### **2.1.1. Epidemiologie epileptischer Anfälle und der Epilepsien**

Epilepsien zählen weltweit zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (1). In einer Metaanalyse aus verschiedenen Studien und Ländern wurde die Punktprävalenz mit 6,38 pro 1.000 Personen und die jährliche kumulative Inzidenz mit 67,77 pro 100.000 Personen bestimmt (2). Es wird angenommen, dass in Deutschland etwa 500.000 bis 650.000 Menschen an Epilepsie erkrankt sind (3). Die Inzidenz ist im Kindesalter und im höheren Alter ab 65 Jahre am höchsten. Der Anteil älterer Patienten steigt infolge der demographischen Entwicklung weiter an. Die Wahrscheinlichkeit, einmal im Leben einen einzelnen epileptischen Anfall zu erleiden, liegt bei mehr als 10 %, während die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer Epilepsie zu erkranken, bis auf 3,5 % ansteigt (4).

#### **2.1.2. Definition und Einteilung epileptischer Anfälle**

Einen epileptischen Anfall definiert man als vorübergehendes klinisches Ereignis, bei dem aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronisierten neuronalen Aktivität im Gehirn paroxysmale Änderungen im Verhalten oder der subjektiven Wahrnehmung auftreten. Pathophysiologisch liegt eine Dysfunktion des Gehirns zugrunde, bei der sich unterschiedlich große Nervenverbände mit einer gesteigerten Depolarisation abnorm synchronisieren, sodass durch die Entladungen ein Ungleichgewicht zwischen Hemmung und Erregung entsteht (5). Die klinische Ausprägung oder Semiologie eines epileptischen Anfalls hängen von der jeweils betroffenen Region des Gehirns ab, in der dieser generiert wurde oder in die er sich ausbreitet. So können sich epileptische Anfälle je nach betroffenem Cortexareal klinisch durch eine Einschränkung oder einen Verlust des Bewusstseins sowie durch motorische Phänomene oder sensorische – zum Beispiel auditive, visuelle, olfaktorische, gustatorische oder vestibuläre – Wahrnehmungen als auch komplexere subjektive Empfindungen im Bereich von autonomen oder psychischen Phänomenen manifestieren (5).

Die Klassifikation von epileptischen Anfällen und Epilepsien wurde 2017 durch eine Kommission der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) überarbeitet (5, 6). Man spricht von fokalen Anfällen, wenn sie in einem auf eine Hemisphäre beschränkten Netzwerk beginnen und dabei eng umschrieben oder weiter ausgebreitet sind, während generalisierte Anfälle in einem bihemisphäriellen Netzwerk beginnen und sich dort rasch ausbreiten. Fokale Anfälle werden zusätzlich in Abhängigkeit von der Beeinträchtigung

des Bewusstseins beschrieben. Es wird unterschieden zwischen fokalen Anfällen ohne Einschränkung des Bewusstseins oder der Aufmerksamkeit (mit beobachteten motorischen oder autonomen Komponenten beziehungsweise mit subjektiven sensiblen/sensorischen oder psychischen Phänomenen), mit Einschränkung des Bewusstseins oder der Aufmerksamkeit und jenen mit Entwicklung zu einem bilateralen konvulsiven Anfall mit tonischen, klonischen oder tonisch-klonischen Elementen.

### **2.1.3. Definition und Einteilung der Epilepsien**

Ein isolierter epileptischer Anfall ist zunächst eine unspezifische Reaktion des Gehirns auf einen internen oder externen Reiz und stellt nicht immer eine Epilepsie dar. Von einer Epilepsie spricht man erst bei einer anhaltenden Veränderung des Gehirns, die die Generierung weiterer epileptischer Anfälle wahrscheinlich macht (7). Für die Diagnose einer Epilepsie ist mindestens ein unprovoked epileptischer Anfall erforderlich sowie zusätzlich Befunde, die auf eine Prädisposition für weitere epileptische Anfälle – mit einem Risiko von mehr als 60% in den nächsten 10 Jahren – hinweisen (7).

Darüber hinaus erfolgt die Einteilung der Epilepsien nach ätiologischen Gesichtspunkten. Bisher hatte man die Epilepsien in symptomatische, idiopathische und kryptogene Formen eingeteilt. Im neuen Klassifikationsvorschlag werden die Bezeichnungen „symptomatisch“ durch „strukturell, metabolisch, infektiös und immunologisch“, „idiopathisch“ durch „genetisch“ und „kryptogen“ durch „unbekannt“ ersetzt. Die bislang als symptomatisch klassifizierten Epilepsien sind Folge einer identifizierbaren Schädigung beziehungsweise Grunderkrankung des Gehirns. Bislang als idiopathisch klassifizierte Epilepsien können bereits nachgewiesene oder vermutete genetische Veränderungen zum Beispiel an Ionenkanälen oder Rezeptoren als Ursache haben. Bei den ungeklärten Epilepsien vermutet man eine symptomatische Ursache, kann diese aber mit den heutigen Untersuchungsmethoden nicht ausreichend nachweisen (6).

Unter den fokalen Epilepsien sind die Temporallappenepilepsien (TLE) am häufigsten (8). Zwar gibt es seltene genetische Formen der TLE, viel häufiger sind aber die strukturellen oder ätiologisch unbekannt Formen. Von großer Bedeutung sind TLEs aber nicht nur wegen ihrer relativ hohen Prävalenz (circa ein Drittel aller Epilepsien), sondern auch, weil bei dieser Epilepsieform die epileptischen Anfälle häufig nicht durch die antiepileptischen Medikamente unterdrückt werden können (9). Wir sprechen hier von Pharmakoresistenz. Die meisten Anfälle bei TLE sind durch eine Einschränkung

des Bewusstseins gekennzeichnet. Temporallappenepilepsien werden außerdem in mesiale Formen mit (peri)hippokampalem Anfallsursprung sowie laterale Formen mit neokortikalem Anfallsursprung unterteilt. Mindestens 80% der TLE haben einen hippocampalen Ursprung (10). Die häufigste erkennbare Ursache der mesialen TLE ist die Hippocampusklerose, die durch den Verlust von Nervenzellen und Gliose in den Cornu ammonis (CA)1-, CA3- und Hilus-Regionen des Hippocampus sowie durch eine exzito-exzitatorische Reorganisation der synaptischen Verbindungen gekennzeichnet ist (11). Außerdem wird heutzutage vermehrt festgestellt, dass eine mesiale TLE durch eine limbische Enzephalitis verursacht wird (12).

## **2.2. Therapieansätze bei Epilepsie**

Die Hauptsäule der Behandlung der Epilepsie ist die Pharmakotherapie. Ziel der Therapie ist eine dauerhafte antiepileptische Prophylaxe, d.h. das Auftreten weiterer epileptischer Anfälle soll möglichst verhindert werden. Das übergeordnete Ziel einer medikamentösen Behandlung von Epilepsien ist der Erhalt der Lebensqualität. Hierbei spielen zwei wichtige Faktoren eine tragende Rolle: Einerseits muss das Medikament gegenüber Anfällen wirksam sein, andererseits muss es gut verträglich sein (13). Dabei ist es sehr wichtig, auf mögliche Nebenwirkungsprofile der Medikamente, auf eventuelle Komorbiditäten und Komedikationen sowie auf das Alter und das Geschlecht der Patienten zu achten.

Die medikamentöse Behandlung der Epilepsie erfolgt mittels Antiepileptika, die aber nicht explizit antiepileptisch, d.h. gegen die chronische Erkrankung Epilepsie gerichtet, wirken. Man kann sie vielmehr als „Anfallsblocker“ bzw. „Antikonvulsiva“ oder im engeren Sinne als „antiiktual wirksame Medikamente“ bezeichnen, da sie die „Schwelle“ für das Auftreten von Anfällen erhöhen. Somit kann man den Schluss ziehen, dass eine pharmakologische Therapie der Epilepsie keinen kurativen, sondern einen symptomatischen Ansatz verfolgt. Allerdings ist der Begriff „Antiepileptikum“ weit verbreitet und wird daher auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Heutzutage gibt es eine große Zahl an antiepileptischen Medikamenten. Brom und Phenobarbital sind die beiden ältesten Substanzen, ihr antiepileptisches Potenzial wurde in der Mitte des 19. bzw. zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch sorgsame Beobachtung entdeckt. Phenytoin, Valproinsäure und Carbamazepin kamen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts hinzu, sie wurden durch Screening-Untersuchungen in Tierversuchen detektiert. Man spricht hier von den „alten“ oder „klassischen“ antiepileptischen Medikamenten. Seit Anfang der 1990er Jahre ist eine

ganze Reihe von neuen Präparaten mit der Vorstellung auf den Markt gekommen, dass sowohl eine bessere Wirksamkeit als auch eine bessere Verträglichkeit erzielt werden kann. Diese werden als „neue Antiepileptika“ bezeichnet (14, 15). In mehreren Studien wurden die Therapieerfolge von den alten und neuen Antiepileptika verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass die neuen antiepileptischen Medikamente nicht wesentlich wirksamer, aber häufig verträglicher als die alten Antiepileptika sind und weniger Interaktionen mit anderen Medikamenten haben (16). Der Wirksamkeit der unterschiedlichen antiepileptischen Medikamente können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, zum Beispiel die Reduktion synaptischer Erregung, die erhöhte synaptische Hemmung und die Anpassung spannungsgeladener Ionenkanäle (17). Mehrere Studien haben gezeigt, dass bis zu 35 % der Patienten mit Epilepsie trotz pharmakologischer Behandlung weiterhin Anfälle haben (18, 19). Wenn durch zwei Behandlungsversuche mit angemessen ausgewählten und ausreichend dosierten Antiepileptika keine Anfallsfreiheit erzielt werden kann, wird eine Epilepsie entsprechend den aktuellen Richtlinien der Internationalen Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE) als pharmakoresistent definiert (20). Insbesondere vor diesem Hintergrund sind neue Antiepileptika erforderlich, um einerseits auf die individuellen Bedürfnisse der Patienten noch spezifischer abgestimmte Therapien anbieten zu können und um andererseits bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie zumindest die Frequenz der Anfälle zu senken.

### **2.3. Levetiracetam**

Levetiracetam (LEV), das im Jahr 2000 unter dem Handelsnamen Keppra® in Deutschland zugelassen wurde, ist in den Industrieländern eins der am häufigsten verschriebenen antiepileptischen Medikamente (21). Levetiracetam ist bei fokalen Epilepsien als Monotherapie und Zusatztherapie zugelassen und wird in dieser Indikation von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie als Mittel der ersten Wahl empfohlen (22). Außerdem ist LEV bei generalisierten genetischen (früher: idiopathischen) Epilepsien als Zusatztherapie zugelassen (22). Es handelt sich bei LEV chemisch um (S)-alpha-Ethyl-2-Oxopyrrolidin-Azetamid, ein Pyrrolidonderivat und Abkömmling des Nootropikums Piracetam. LEV wurde durch systematische Screenings von verschiedenen Substanzen gegen epileptiforme Aktivität bei akustisch stimulierten schallsensiblen Mäusen entdeckt (23). Anfänglich zeigte LEV in den klassischen Modellen zum Screening von antiepileptischen Medikamenten, nämlich durch akuten maximalen Elektroschock und Pentylentetrazol induzierte Anfälle, keine oder geringe

Effekte (24). Trotzdem beschloss der Hersteller, LEV in weiteren präklinischen Modellen zu erproben. Im elektrisch induzierten Amygdala-Kindling-Modell von Nagern zeigte sich eine potente antiepileptische Wirkung sowohl gegen fokale als auch gegen sekundär generalisierte Anfälle (25). Außerdem wurde bei fokalen, limbisch beginnenden Anfällen, die durch Pilocarpin und Kainsäure ausgelöst wurden, ein potenter Schutz durch LEV beobachtet (26).

### **2.3.1. Wirkmechanismen von Levetiracetam**

LEV ist unter den neuen antiepileptischen Medikamenten eine der erfolgreichsten Substanzen im Hinblick auf Wirksamkeit und Verträglichkeit. Die Wirkung beruht möglicherweise auf einem neuen Mechanismus, der aber noch nicht in seiner ganzen Tragweite verstanden wurde. Im Gegensatz zu anderen antiepileptischen Medikamenten hat LEV keinen direkten Effekt auf die klassischen Ziele wie den Na<sup>2+</sup>-Kanal, T-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, GABA- und Glutamat-Rezeptoren (27, 28). In einer weiteren Studie hat LEV im Vergleich zu anderen antiepileptischen Medikamenten die Fähigkeit gezeigt, die neuronale Hypersynchronisation während epileptiformer Aktivität in hippocampalen Hirnschnitten von Ratten zu hemmen (29).

1995 haben Noyer et al. zum ersten Mal gezeigt, dass eine spezifische Bindungsstelle für LEV an der synaptischen Plasmamembran in verschiedenen Hirnregionen von Ratten existiert, unter anderem im Hippocampus (30). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass ein ubiquitär vorkommendes integrales synaptisches Vesikelprotein SV2A auf präsynaptischen Membranen den Angriffsort für LEV darstellt (31, 32). Dieses Glykoprotein gehört zu einer kleinen Genfamilie, bestehend aus den drei Isoformen SV2A, SV2B und SV2C (33). SV2A ist die am weitesten verbreitete Isoform und wird fast überall im zentralen Nervensystem, aber auch in endokrinen Zellen angetroffen. Obwohl die exakte Funktion des SVA2-Proteins noch nicht vollständig geklärt ist, haben Studien gezeigt, dass dieses eine wichtige Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung spielt. Hierbei scheint SVA2 an der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Regulation der Transmitterfreisetzung beteiligt zu sein (34). Außerdem zeigten Janz et al., dass es bei der Abwesenheit von SV2-Proteinen zu einer abnormalen Erhöhung der Transmitterfreisetzung durch die präsynaptische Akkumulation von Ca<sup>2+</sup> kommt, welche die synaptische Übertragung destabilisiert und dadurch epileptiforme Aktivität auslöst (35). In weiteren pharmakologischen Studien wurden zusätzliche Eigenschaften von LEV in Bezug auf verschiedene Mechanismen untersucht. In mehreren Studien wurde ein Einfluss von LEV auf die spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle der Pyramidenzellen

in der CA1-Region des Hippocampus zur Verringerung der neuronalen Depolarisation beobachtet (36, 37). Es wurde außerdem ein Effekt von LEV auf die Modulation von K<sup>+</sup>-Kanälen zur Stabilisierung der Membranpotenziale festgestellt (38). Einen weiteren Effekt hat LEV außerdem auf die Modulation der inhibitorischen Neurotransmitter Glycin und GABA im zentralen Nervensystem. LEV bewirkt einerseits eine Verstärkung der Freisetzung der beiden Neurotransmitter und damit eine hemmende Wirkung auf die Neuronenverbände (39). Andererseits reduziert LEV die neuronale Exzitabilität durch die Reduktion der Glutamat-Freisetzung (40). Schließlich konnte gezeigt werden, dass in einem Kindling-Modell der Epilepsie im Temporallappen von Ratten die pathologisch erhöhte Genexpression von Neuropeptid Y, Thyreotropin-Releasinghormon und saurem Gliafaserprotein durch LEV herunter reguliert wurde (41).

## **2.4. Experimentelle Epileptologie**

Die experimentelle Epilepsieforschung hat das Ziel, die pathophysiologischen Grundlagen der Erkrankung besser zu verstehen und dadurch therapeutische Ansätze zu optimieren. Experimentelle Untersuchungen sollen dabei helfen, die Mechanismen zu verstehen, die bei der Entstehung und Ausbreitung eines epileptischen Anfalls eine Rolle spielen. Diese Mechanismen können auf der Ebene neuronaler Netzwerke, auf zellulärer oder subzellulärer Ebene untersucht werden.

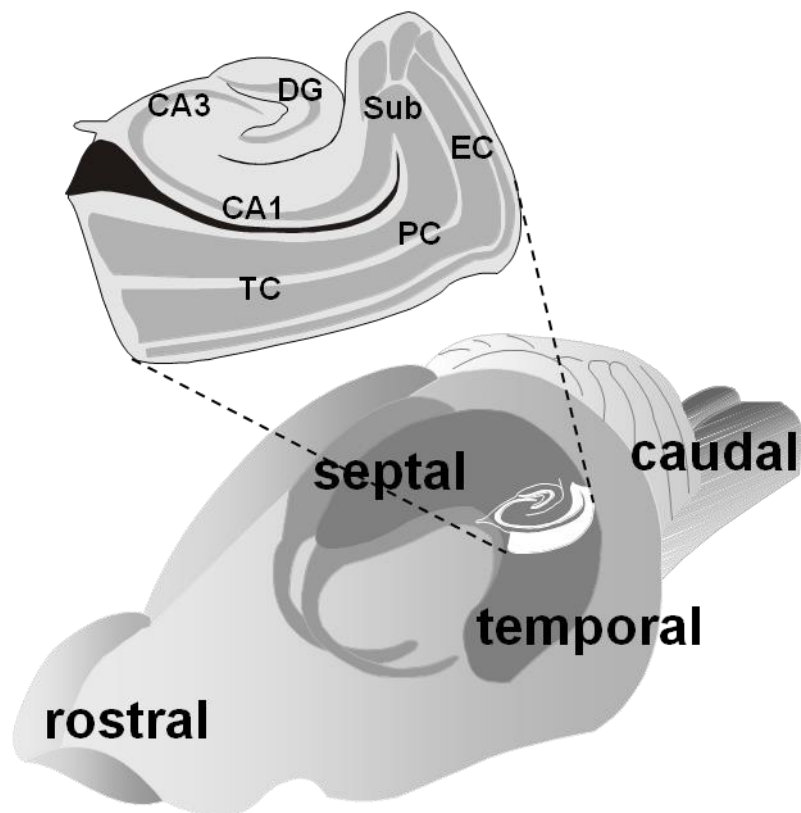
### **2.4.1. Der limbische Cortex und seine Rolle bei Temporallappenepilepsien**

Der limbische Cortex umfasst die Teile der Großhirnrinde, die zum limbischen System gehören. Dabei weisen diese Rindenareale einen drei- bzw. vierschichtigen Aufbau auf und werden auch als Allocortex bezeichnet. Das limbische System umfasst den Gyrus parahippocampalis, der die vordere und untere Fortsetzung des Gyrus Cinguli darstellt, sowie die darunter liegende Rinde der Hippocampusformation. Im limbischen System befinden sich biologisch elementare Gehirnstrukturen, die für Triebe, Motivationen und Emotionen zuständig sind (42).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hippocampusformation als zentraler Bestandteil des limbischen Systems näher untersucht. Sie befindet sich basomedial im telencephalen Temporallappen und umfasst die Regionen entorhinaler Cortex (EC), Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis (CA) und das Subiculum (43). Diese allocorticalen Strukturen weisen einen dreischichtigen Aufbau auf, während der temporale Cortex (TC), der perirhinale Cortex (PC) und der entorhinale Cortex (EC) einen für den Neocortex typischen sechsschichtigen Aufbau zeigen. Die Hippocampusrinde, also das Cornu ammonis, wird aufgrund ihrer Neuronendichte und

neuronalen Verschaltungen weiter in die Sektoren CA1, CA2 und CA3 untergliedert (44). Die zytoarchitektonische Struktur der Hippocampusformation ist durch zwei ineinander greifende c-förmige Strukturen gekennzeichnet, die einerseits aus dem Körnerzellband des Gyrus dentatus und andererseits aus dem Pyramidenzellband des Cornu ammonis gebildet werden (siehe Abbildung 1).

Der Hippocampus erhält Informationen aus allen Sinnesmodalitäten, die vorher verarbeitet wurden. Er beeinflusst durch seine Verbindungen zum Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli endokrine, emotionale und viszerale Vorgänge. Außerdem spielt der Hippocampus aufgrund seiner Verbindungen zu kognitiven Arealen im Neocortex eine wichtige Rolle für höhere Hirnleistungen, zum Beispiel bei der Gedächtniskonsolidierung (45).



**Abbildung 1: Lage der Hippocampusformation und angrenzende Strukturen im Gehirn der Ratte**

Im oberen Teil der Abbildung wurde das kombinierte Hirnschnitt-Präparat horizontal dargestellt, wie es in der vorliegenden Arbeit für die Experimente verwendet wurde. Es sind die folgenden Strukturen zu erkennen: Temporaler Cortex (TC), perirhinaler Cortex (PC), entorhinaler Cortex (EC), Subiculum (Sub), Ammonshorn (CA) und Gyrus dentatus (DG). (modifiziert nach Witter et al, 2000.- 46)

Diese Areale spielen bei der Pathophysiologie der Temporallappenepilepsie eine wichtige Rolle. Bei vielen Patienten mit Temporallappenepilepsie ist die



Hippocampusformation der Ursprungsort der epileptischen Aktivität (47). Diese Hirnregion verfügt über eine hohe Anfälligkeit für die Generierung epileptiformer Aktivität (48). In vielen *in vitro* Studien wurden Präparate aus diesen Regionen eingesetzt, um zu untersuchen, ob verschiedene Arten epileptiformer Entladungen strukturspezifisch sind und wie die Entladungen zu benachbarten Regionen weitergeleitet werden beziehungsweise wie sie einander beeinflussen können (49, 50, 51). Es wurde also gezeigt, dass nicht nur *in vivo* im Hippocampus anfallsartige Ereignisse (AEs) entstehen, sondern auch im Hirnschnittpräparat aus dieser Region, weshalb es sich gut für die Untersuchung von Mechanismen bei der Anfallsentstehung und -ausbreitung eignet. Aus diesem Grund wurde dieses Hirnschnitt-Präparat für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt.

#### **2.4.2. *In vitro*-Epilepsiemodelle**

Die *in vitro*-Epilepsiemodelle spielen in der Grundlagenwissenschaft eine wichtige Rolle. Hierbei werden beispielweise Substanzen auf ihre potentiell antiepileptischen Eigenschaften untersucht. Diese Modelle wurden bei Screeningverfahren von antiepileptischen Medikamenten verwendet (24, 52, 53). In der vorliegenden Arbeit wird ein chemisch induziertes Modell, das 4-Aminopyridin (4-AP) -Modell, eingesetzt. 4-AP ist chemisch ein organisches Präparat und den Aminopyridinen zuzuordnen (54). 4-AP wird im klinischen Alltag in der symptomatischen Behandlung von spastischen Gangstörungen bei Patienten mit Multipler Sklerose eingesetzt (55). Neben der klinischen Nutzung wird 4-AP im experimentellen Bereich aufgrund seiner prokonvulsiven Eigenschaften durch reversible Blockade von spannungsabhängigen Kaliumkanälen verwendet. 1982 konnten Galvan et al. als erste zeigen, dass 4-AP in Hirnschnitten von Meerschweinchen spontane oder Stimulus-evozierte iktale Entladungen ausgelöst hat (56). Buckle und Haas konnten 1982 in Hippocampus-Hirnschnitten von Mäusen eine erhöhte Freisetzung von sowohl inhibitorischen als auch exzitatorischen Transmittern feststellen (57). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass 4-AP in hippocampalen Hirnschnitten spontane langsame interiktale Entladungen verursacht. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem Kalium aufgezeichnet werden (58, 59). Das führt zu einer erhöhten Übererregbarkeit der Neuronen. Die genauen Mechanismen dieser neuronalen Übererregbarkeit sind zwar nicht abschließend geklärt, aber es wird angenommen, dass die Aktivität bestimmter Untergruppen von GABAergen Interneuronen durch depolarisierende GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu einer Netzwerksynchronisation führen (60).

Das 4-AP-Modell wurde als gut etabliertes *in vitro*-Epilepsiemodell bisher in zahlreichen Studien eingesetzt, um die Wirkung von Antiepileptika zu evaluieren (61, 62, 63).

### **2.4.3. Intrinsische optische Signale**

In der aktuellen Arbeit wurden Messungen des intrinsischen optischen Signals (IOS) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer aktivitäts-abhängigen Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Hirngewebes, wobei der zugrundeliegende biologische Mechanismus dieses Signals bislang nicht abschließend geklärt wurde. Es ist aber bekannt, dass die optischen Eigenschaften des Hirngewebes von elektrischer und metabolischer Aktivität der Zellen abhängig sind (64). Es wird angenommen, dass vor allem ionale Veränderungen im extrazellulären Raum die Lichtdurchlässigkeit des Gewebes beeinflussen (65). Es handelt sich um ein nicht-invasives Verfahren mit hoher räumlicher und guter zeitlicher Auflösung, um Ursprung und Ausbreitungsmuster epileptischer Aktivität in den Hirnschnittpräparaten darzustellen. (66, 67). Es konnte gezeigt werden, dass das intrinsische optische Signal Art und Stärke der neuronalen Aktivität reflektiert (68). Die Messung der optischen Eigenschaften im Hirnschnittpräparat wird mit elektrophysiologischen Methoden kombiniert.

### 3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des "neuen" Antiepileptikums LEV auf AEs temporalen Ursprungs in einem *in vitro* Tiermodell untersucht. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war, neue Aspekte über das Verhalten des Ausbreitungsmusters von epileptiformer Aktivität mittels IOS unter LEV zu gewinnen, zumal die bisherige Forschungsarbeiten Limitationen durch die elektrophysiologischen Untersuchungen aufwiesen. In der Literatur fanden sich bisher keine vergleichbaren Studien, in denen die Effekte von LEV auf das Ausbreitungsmuster der epileptiformen Aktivität durch 4-AP untersucht wurden.

Für die Experimente wurde ein kombiniertes entorhinaler Cortex-Hippocampus-Präparat von naiven Ratten verwendet. Zur Generierung von iktaler epileptischer Aktivität wurde das 4-AP-Modell verwendet. In diesem gut etablierten *in vitro*-Epilepsiemodell wurden akute AEs im Hirnschnitt-Präparat ausgelöst. Durch den kombinierten Einsatz von elektrophysiologischen und optischen Messmethoden wurden die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität in den Hirnschnittpräparaten erfasst.

Mit diesem Ansatz sollten folgende Hypothesen untersucht werden:

1. LEV ist in der Lage, *in vitro* die Entstehung von AEs zu verhindern oder deren Frequenz zu reduzieren.
2. Durch LEV wird *in vitro* die Dauer von AEs reduziert.
3. Die Ausbreitung von AEs von der Region ihres Ursprungs auf benachbarte Hirnregionen kann durch LEV begrenzt werden.
4. Die Effekte von LEV *in vitro* auf die Entstehung und Ausbreitung von AEs ist dosisabhängig.
5. Das 4-AP-Modell ist ein gut geeignetes Modell, um zur Evaluation der Wirksamkeit von neuen Antiepileptika beizutragen.

## **4. METHODIK**

### **4.1. Versuchstiere**

Für die *in vitro*-Experimente wurden ausschließlich männliche Wistar-Han Ratten im Alter zwischen 6 und 10 Wochen verwendet. Das Körpergewicht dieser Tiere betrug 180 bis 300 Gramm. Es handelte sich um gesunde, therapienaive Tiere.

Alle Tiere wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) an die Zentrale Versuchstierhaltung der Charité – Universitätsmedizin Berlin geliefert, wo sie bis zum Beginn der Experimente unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Zwischen der Anlieferung der Tiere und dem Beginn des Experiments lagen immer mindestens 7 Tage, damit sich die Tiere an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Am Tag des Experiments fand die Präparation jeweils in der Zeit zwischen 8:00-13:00 Uhr statt.

### **4.2. Anfertigung der Hirnschnittpräparate**

Für die Präparation wurden zunächst alle benötigten Materialien vorbereitet. Das Präparationsbesteck wurde in einer Eis-Box gekühlt. Ein Glas mit 250 ml künstlicher Nährlösung (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF, Zusammensetzung s. unten) wurde in einer Gefriertruhe bei -50°C für ca. 10 min gekühlt, bis ein halb eisiges Medium zwischen -5 und 0 °C erreicht wurde, um später das Gehirn nach Entnahme aus dem Schädel aufzubewahren und auf diese Temperatur herunter zu kühlen. Dann wurde diese Lösung ebenfalls in der Eis-Box gekühlt und kontinuierlich mit Carbogen-Gas (Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) versetzt.

Das Versuchstier wurde mit einem 2,5% Isofluran/O<sub>2</sub>-Gemisch tief anästhesiert. Sobald das Tier auf einen Schmerzreiz keine motorische Reaktion mehr zeigte, wurde es mit einer Guillotine dekapitiert. Das Fell des Kopfes wurde mit einem scharfen Skalpell von rostral nach occipital durchgetrennt. Dann wurde die Kaumuskulatur beidseits vom Schädel abgetrennt. Mit einer Knochensplitterzange wurde die Nackenmuskulatur vom Schädel abgetrennt und die Kalotte im Bereich des Foramen magnum eröffnet. Mit einer feinen Schere wurde die Kalotte vorsichtig und oberflächlich entlang der Sagittalnaht durchgeschnitten. Mit der Knochensplitterzange wurde der Nasenknochen aufgebrochen. Die nun zu zwei Hälften getrennte Kalotte wurde dann vorsichtig zur Seite wegeklappt, so dass das Gehirn frei lag. Mit der Duraschere wurde die Dura mater vorsichtig entlang des Interhemisphärenspalts aufgeschnitten und mit einer gebogenen Pinzette zur Seite abgezogen. Um das Gehirn ohne Trauma von der Schädelbasis anheben zu können, wurde mit einer feinen Schere der Temporalknochen

beidseits senkrecht eingeschnitten und zur Seite weggeklappt. Nun wurde das Gehirn mit Hilfe eines gebogenen Spatels von der Schädelbasis abgehoben und vorsichtig in das mit eisgekühlter aCSF-Lösung gefüllte Becherglas transferiert.

Im nächsten Schritt wurde die zuvor mit gefrorener aCSF-Lösung gefüllte und gekühlte Schneidekammer in das Vibratom (Vibroslice 752 M, Campden Instruments; Sileby, UK) eingesetzt. Zur Anfertigung der Hirnschnittpräparate wurde das Gehirn mit Hilfe eines Löffels aus der gekühlten Lösung entnommen und mit der Hirnunterseite nach unten auf ein mit aCSF-Lösung getränktes Filterpapier gelegt. Mit einer gekühlten Rasierklinge wurden zuerst das Kleinhirn und dann die Frontalpole einschließlich Sehnerven abgesetzt. Anschließend wurden die beiden Hemisphären voneinander getrennt und jeweils mit einem feinen Pinsel auf ihre medialen Flächen gedreht. Dann wurde der hochparietale Anteil jeder Hemisphäre durch einen Schnitt in der transversalen Achse parallel zur Hirnbasis entfernt. Mit den dadurch neu entstandenen Flächen wurden beide Hemisphären mit Klebstoff auf dem Schneidblock der Schneidekammer fixiert. Anschließend wurde die Schneidekammer sofort vollständig mit eisgekühlter und Carbogen-gesättigter aCSF-Lösung aufgefüllt, bis beide Hemisphären vollständig bedeckt waren. Eine dauerhafte Carbogen-Versorgung der Lösung in der Schneidekammer wurde sichergestellt. Mit dem Vibratom wurden dann horizontale Hirnschnittpräparate mit einer Dicke von 400 µm angefertigt. Die basalen Hirnanteile wurden verworfen, bis der Hippocampus, der entorhinale Cortex und der perirhinale Cortex von den anderen Regionen gut zu unterscheiden war. Somit konnte man aus jeder Hemisphäre 3 bis 4 geeignete Hirnschnittpräparate mit ventralem Teil des Hippocampus gewinnen (siehe Abbildung 1). Die fertigen Hirnschnittpräparate wurden mit Hilfe eines Spatels und eines Pinsels auf einen mit transparenter semipermeabler Membran (Millicell-CM; Millipore Bedford, Darmstadt, Deutschland) beklebten Platinrahmen transportiert. Anschließend wurden die Hirnschnittpräparate sowohl in der Messkammer als auch in der Aufbewahrungskammer unter standardisierten Bedingungen für mindestens 60 Minuten inkubiert.

### **4.3. Versuchsaufbau**

#### **4.3.1. Perfusionskammer**

Die Hirnschnittpräparate wurden unter sogenannten Interfacebedingungen inkubiert, d.h. sie wurden in der Perfusionskammer am Übergang zwischen gasförmiger und flüssiger Phase des Nährmediums aufbewahrt.

Die beiden Perfusionskammern sind in ein Plexiglasgehäuse eingelassen. Eine der beiden Kammern diente als Messkammer, die andere als Aufbewahrungskammer für maximal vier weitere Hirnschnittpräparate. Unter den beiden Kammern befand sich ein Plexiglasbehälter, der bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt war. Das Wasser wurden durch eine Heizspirale und einen Temperaturfühler auf einer konstanten Temperatur von  $35 \pm 0,5$  °C gehalten. Darüber hinaus wurde das destillierte Wasser kontinuierlich mit Carbogen durchströmt. Über je eine Öffnung zu beiden Seiten der Perfusionskammern wurde das angewärmte und zu 100% gesättigte Carbogengas in die Kammern geleitet, um dadurch die Oberfläche der Hirnschnittpräparate feucht zu halten und mit Sauerstoff zu versorgen.

Beide Kammern wurden permanent über separate Zuläufe durch ein Schlauchsystem mittels einer Umwälzpumpe (Rotilabo, Österreich) mit einer Geschwindigkeit von 1,5-2 ml/min mit der aCSF versorgt. Die aCSF wurde in einem externen Wasserbecken vorgewärmt und ebenfalls durchgehend mit Carbogen durchströmt. Unter der Messkammer im Plexiglasgehäuse wurde eine Lichtquelle mit Hilfe eines Glasstabes eingesetzt. Als Lichtquelle wurde eine mit einer stabilisierten und spannungsregulierten Stromquelle (KL 1500 electronic; Scott, Wiesbaden, Deutschland) verbundene Halogenlampe benutzt. Mittels eines Lichtleiters wurde die Beleuchtung des Hirnschnittpräparats durch den Plexiglasboden der Messkammer und die transparente semipermeable Membran gewährleistet. Um eine möglichst gleichmäßige Beleuchtung des Präparats zu gewährleisten, wurde diese genau über der Lichtquelle positioniert.

#### **4.3.2. Perfusionslösungen**

Damit die Hirnschnittpräparate während der Präparation, Inkubation und des gesamten Experiments vital gehalten werden konnten, wurde eine Nährlösung hergestellt. Diese Lösung ist in ihrer Zusammensetzung dem Liquor cerebrospinalis sehr ähnlich und wird daher auch als aCSF bezeichnet. Die ionale Zusammensetzung der Nährlösung entspricht dem Liquor der Ratte und beinhaltet folgende Stoffe und Konzentrationen: NaCl 124,0 mM; KCl 3,0 mM; MgSO<sub>2</sub> 2,0 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM; NaHCO<sub>3</sub> 26,0 mM und Glucose 10,0 mM (alle Chemikalien von Merck; Darmstadt, Deutschland). Zudem wurde der Lösung bei Bedarf Bikarbonat-Phosphat-Puffer hinzugefügt, um während der Begasung mit Carbogengas den pH-Wert konstant bei  $7,40 \pm 0,05$  zu halten. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (pH-Meter 761 Calimatic, Knick; Berlin, Deutschland) regelmäßig kontrolliert. Die Osmolarität der Lösung betrug

300 ± 10 mosmol/kg. Sie wurde vor jedem Experiment mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec; Berlin, Deutschland) kontrolliert.

#### **4.4. Elektroden**

##### **4.4.1. Ableitelektroden**

Zur Messung der Feldpotenziale in Hirnschnittpräparaten wurden Mikro-Ableitelektroden hergestellt. Hierbei kamen Kapillaren aus Borosilikatglas (Science Products GmbH, Hofheim; Deutschland) zum Einsatz. Eine Kapillare wurde mit einem Mikropipetten-Puller (PC-10 Puller, Narishige Group Product; Tokio, Japan) in der Mitte erhitzt, bis sie von alleine in der Mitte brach. Am Ende entstanden zwei Elektroden mit einer kegelförmigen Spitze. Die Elektroden wurden vor dem Experiment mit einer 154µM NaCl-Lösung gefüllt. Anschließend wurde ein chlorierter Silberdraht in die Elektrode eingelegt und mit Dentalwachs fixiert, gleichzeitig wurde die Elektrode am oberen Ende durch das Wachs verschlossen. Das exakte Manövrieren der Ableitelektroden erfolgte durch feststehende Mikromanipulatoren.

##### **4.4.2. Bipolare Reizelektroden**

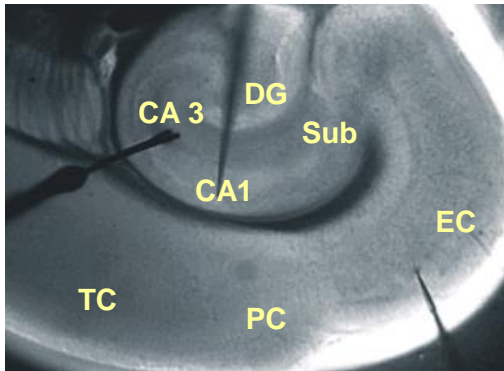
Die bipolare Reizelektrode wurde mit dem Puller aus doppellumigen Thetaglas-Kapillaren hergestellt. Die Spitzen wurden um ca. 100 µm zurückgebrochen. Anschließend wurde in jedes Lumen ein 50 µm dicker Platin-Iridium-Draht eingelegt (Goodfellow; Cambridge, UK) und zur Stabilisierung mit einem dickeren Draht verlötet.

#### **4.5. Elektrophysiologische Messungen**

##### **4.5.1. Vitalitätsprüfung der Hirnschnittpräparate**

Unmittelbar vor der Messung wurde jedes Hirnschnittpräparat auf seine Vitalität überprüft. Dafür wurde die Reizelektrode mittels eines Mikromanipulators im Stratum radiatum der Area CA3 des Hippocampus positioniert, um dort die Schaffer-Kollaterale zu stimulieren. Die Reizantwort wurde durch die Ableitelektrode im Stratum pyramidale der Area CA1 gemessen (siehe Abbildung 3). Beide Elektroden wurden in einer Tiefe von 100 µm unter der Oberfläche des Hirnschnittpräparats eingesetzt. Die Schaffer-Kollateralen projizieren als Axone der CA3-Pyramidenzellen auf die CA1-Pyramidenzellen, sodass durch deren Stimulation mithilfe des Reizisolators ein Summenaktionspotenzial (*Population spike*) in Area CA1 ausgelöst werden kann. Der Reizisolator wurde über einen externen programmierbaren Stimulusgenerator (Master-8; A.M.P.I. Jerusalem, Israel) angesteuert. Die Feldpotenzialantwort wurde nach Verstärkung des Signals durch einen Signal-Verstärker (Zwischenverstärker, Differenzverstärker, Eigenbau des Instituts für Neurophysiologie der Charité) auf

mehreren Wegen aufgezeichnet. Außerdem erfolgte eine sofortige Darstellung auf einem Speicheroszilloskop (HM305; HAMEG, Frankfurt/Main, Deutschland).



**Abbildung 2: Elektroden im Hirnschnittpräparat**

Die Reizelektrode wurde im Stratum radiatum der Area CA3 des Hippocampus positioniert, um dort die Schaffer–Kollaterale zu stimulieren. Eine Ableitelektrode lag im Stratum pyramidale der Area CA1 und eine in den Schichten II/III des lateralen entorhinalen Cortex (EC). DG: Gyrus dentatus, PC: Perirhinaler Cortex, TC: Temporaler Cortex, Sub: Subiculum, CA: Cornu ammonis /Ammonshorn.

Die Registrierung aller Daten erfolgte darüber hinaus durch einen Mehrkanalthermoschreiber (DASH IVxl; Astro-Med; West Warwick, USA). Die Signale wurden mittels eines Digitalwandlers (Digidata 1200B; Axon Instruments; Foster City, USA) digitalisiert und auf einem Personal-Computer gespeichert. Mithilfe des Softwareprogramms Signal (CED version 3.07; Cambridge, UK) wurde das durch die Stimulation ausgelöste Antwortpotenzial aufgezeichnet. Hierbei wurden entweder einzelne Stimuli oder eine Serie von Stimuli mit einer Reizstärke zwischen 5 V und 10 V gesetzt. Ein Hirnschnittpräparat wurde nur dann weiter für das Experiment verwendet, wenn die Summenaktionspotenziale eine Amplitude von mindestens 2 mV erreicht haben.

#### **4.5.2. Kontinuierliche Aufzeichnung der Feldpotenziale**

Die Reizelektrode wurde aus dem Präparat entfernt, nachdem das Hirnschnittpräparat die Kriterien für die Vitalität erfüllt hatte. Anschließend wurden die Ableitelektroden in Area CA1 und in den Schichten II/III des medialen entorhinalen Cortex positioniert, um die Feldpotenziale abzuleiten. Während des Experiments wurden auf diese Weise AEs aufgezeichnet, die durch folgende elektrophysiologische Merkmale gekennzeichnet waren: 1) Ein Abfall des Feldpotenzials von mindestens 1mV über mindestens 10 s; 2) eine Überlagerung der Feldpotenziale durch schnelle Spikes; 3) gleichzeitige Transmissionsänderung im IOS.

#### **4.6. Optische Messungen**

In der Einleitung wurde bereits auf die Mechanismen eingegangen, die dem intrinsischen optischen Signal zugrunde liegen. Zusammengefasst handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei dem sich die optischen Eigenschaften des

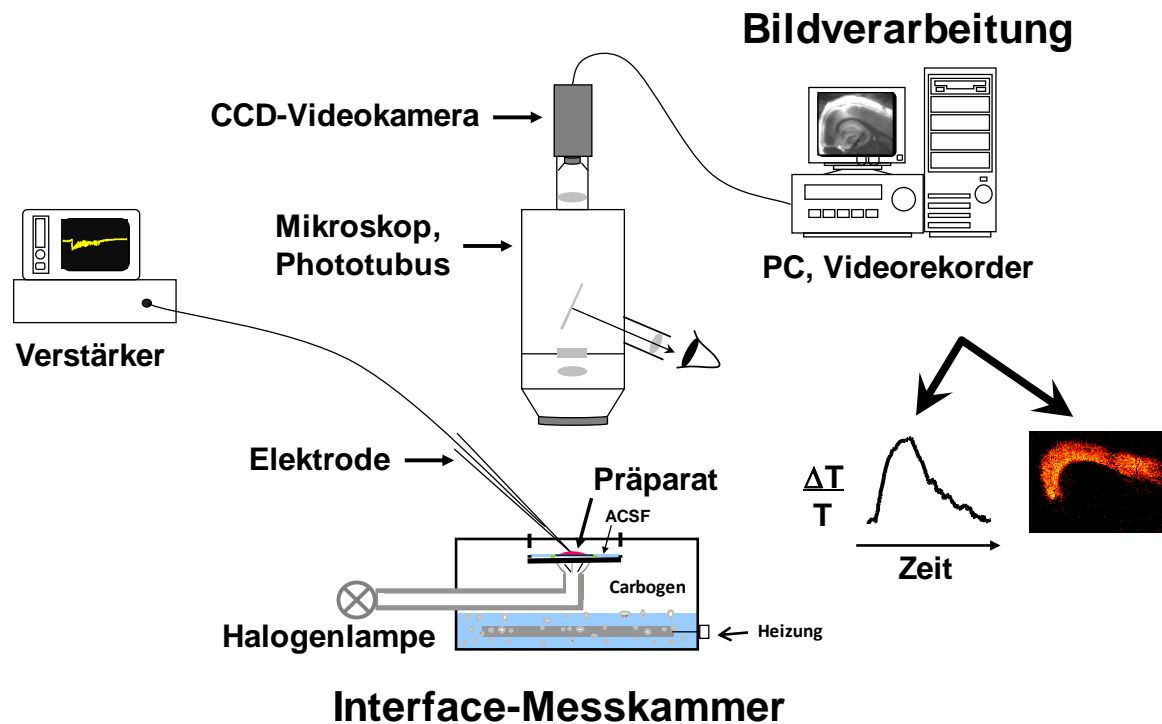


Hirngewebes, insbesondere dessen Lichtdurchlässigkeit (Transmission) während eines AE ändern (d.h. die Transmission nimmt zu).

Durch ein binokulares Mikroskop (MS 5, Leica; Bensheim, Deutschland), das sich über der Messkammer befand, konnte die Lage des Präparats kontrolliert werden. Das Mikroskop war über einen monokularen Phototubus (Leica; Wetzlar, Deutschland) mit einer 8 Bit-CCD-Videokamera (VC 1910, Sanyo; Osaka, Japan) verbunden. Hierüber konnten Bilder von den Hirnschnittpräparaten aufgenommen werden. Die Bilder wurden auf einem Videomonitor angezeigt und mit einem S-VHS-Videorekorder (AG-6720A, Panasonic; Osaka, Japan) auf herkömmlichen Videobändern aufgezeichnet. Die aufgenommenen Bilder wurden entweder parallel zur Messung am Computer verarbeitet oder zu einem späteren Zeitpunkt auf einem Videoband zur Auswertung gespeichert. Durch eine Video-Digitalisierungskarte (Video-Grabber Karte PCI Grabber 4+, Phytex GmbH; Mainz, Deutschland) konnte das von der Kamera analog aufgezeichnete Videosignal für den Computer bei einem Bildintervall von 100 ms in ein digitales Bild umgewandelt werden. Durch ein speziell für diese Methode entwickeltes, hauseigenes Computerprogramm konnte man optische Messungen dieser Art erfassen. Diese Spezialsoftware wurde auch später für die Bildauswertung angewandt. Das entstandene Bild setzte sich aus 240 Reihen mit je 320 Bildpunkten (Pixel) zusammen. Die 8 Bit-Information jedes umgewandelten Bildpunkts zeigten entsprechend der Lichtintensität im Originalbild eine von 256 Graustufen. Die Bilder wurden erst aufgenommen, wenn sich elektrophysiologisch durch die Ableitelektrode ein AE zeigte. Um den Beginn des AE nicht zu verpassen, wurden durch die Software in Folge in einer Endlosschleife durchgehend bis zu 100 Bilder zwischengespeichert. Somit konnten bis zu 10 Sekunden vor dem elektrischen Beginn eines AE Bilder aufgezeichnet werden. Beim Auftreten eines AE wurde die Endlosschleife automatisch gestoppt und die vorher gesicherten Bilder vor den eigentlichen Bildern eingefügt.

Auf diese Weise wurden die optischen Eigenschaften eines kompletten AE erfasst. Anschließend konnte durch die Berechnung von Subtraktionsbildern die Änderung des optischen Signals untersucht werden, indem das erste Bild jeder Serie als Kontrollbild diente und von jedem der folgenden Bilder subtrahiert wurde. Es kamen in diesen Subtraktionsbildern diejenigen Areale des Hirnschnittpräparats zur Darstellung, in denen sich die Lichtdurchlässigkeit über die Zeit änderte. Zudem konnte durch das Erstellen einer sogenannten Fehlfarbencodierung der Effekt weiter verstärkt werden. Hierbei wurden einzelnen Grauwerten andere Farben zugeordnet. Dadurch sind

Veränderungen für den Betrachter einfacher zu erkennen. In der Abbildung 3 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

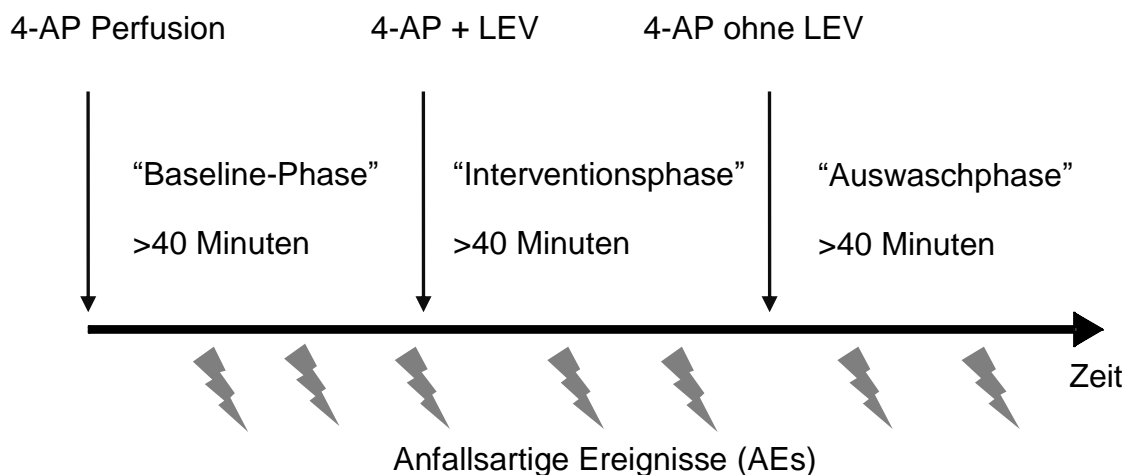
Die fertigen Hirnschnittpräparate befinden sich auf einer transparenten, semipermeablen Membran in der Interface-Messkammer. Die beiden Kammern werden permanent über separate Zuläufe mit der Nährlösung (aCSF) durch ein Schlauchsystem mittels einer Umwälzpumpe versorgt. Die Nährlösung wurde in einem externen Wasserbecken vorgewärmt und ebenfalls ständig mit Carbogen begast. Die electrophysiologische Messung erfolgte durch eine Ableitelektrode. Die Feldpotentialantwort wurde nach Verstärkung des Signals durch einen Signal-Verstärker (Zwischenverstärker und Differenzverstärker) weitergeleitet und auf einem Speicheroszilloskop dargestellt. Für die optischen Messungen wurde der Hirnschnittpräparat durch eine Halogenlampe von unten beleuchtet und von oben mit einem mit einer CCD-Videokamera verbundenen Mikroskop gefilmt. Die aufgenommenen Bilder wurden mit einem Videorekorder gespeichert und durch eine Video-Digitalisierungskarte auf dem Computer gespeichert und weiterverarbeitet (Überlassung durch Katharina Buchheim† und Florian Weissinger, AG Klinische und Experimentelle Epileptologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin).

#### 4.7. Versuchsablauf

Alle Experimente wurden in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase wurde „Baseline-Phase“ genannt. In dieser Phase wurde 100  $\mu\text{M}$  4-AP in die Nährlösung eingewaschen,

um AEs auszulösen. Diese Phase hat zwischen 60 und 90 Minuten gedauert. In dieser Zeit zeigten die AEs eine Dynamik, bei der nach einer Latenzzeit zuerst hochfrequent kurze AEs mit einer Dauer von 10-15 Sekunden auftraten. Hieraus entwickelten sich nach einer bestimmten Zeit monomorph konfigurierte Ereignisse mit einer Dauer von mindestens 30 Sekunden. Der Baseline-Phase folgte die „Interventionsphase“, in der das Hirnschnittpräparat zusätzlich zu 4-AP mit der antiepileptischen Substanz Levetiracetam behandelt wurde. Hierbei wurde die in den vorangegangenen Studien am häufigsten verwendeten Konzentrationen 33  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  verwendet (29, 69). Diese Phase dauerte zwischen 50 und 60 Minuten. Die letzte Phase des Experiments wurde als „Auswaschphase“ bezeichnet. In dieser Phase wurde wie in der Baseline-Phase wieder auf die reine 4-AP-haltige Nährlösung umgestellt, Levetiracetam wurde ausgewaschen. Diese Phase dauerte 40 bis 60 Minuten.

Es dauerte jeweils 10 Minuten, um einen *steady state* nach dem Wechsel der Lösungen zu erreichen, die reine und stabile Beobachtungszeit betrug dann 30 min. Somit hat jede Phase mindestens 40 Minuten gedauert. Wenn eine der drei Phasen kürzer als 40 Minuten war, wurde das gesamte Experiment von der weiteren Analyse ausgeschlossen. In Abbildung 4 wird der Versuchsablauf nochmal schematisch dargestellt.



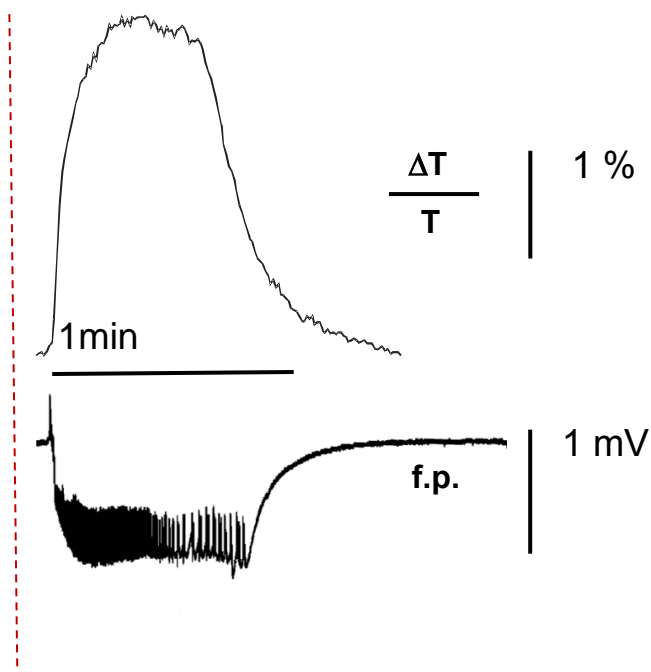
**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

In der Baseline-Phase wurden die Schnitte mit 4-Aminopyridin (4-AP) -haltiger Nährlösung behandelt. Hierdurch wurden nach einer Latenz repetitive anfallsartige Ereignisse (AEs) mit zunehmender Dauer und Frequenz ausgelöst. In der Interventionsphase wurden die Schnitte zusätzlich zu 4-AP mit Levetiracetam (LEV) in drei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. In der Auswaschphase wurde Levetiracetam ausgewaschen, um zu sehen, ob die Wirkung des Medikaments reversibel ist.

#### 4.8. Datenerfassung und -analyse

Die Aufzeichnung wurde zeitgleich mit Beginn der 4-AP-Perfusion begonnen. Es wurden folgende elektrophysiologische Parameter erfasst. Die Latenz wurde als die Zeit zwischen dem Beginn der 4-AP-Perfusion und dem ersten AE, die Amplitude der AEs als Ausmaß des Feldpotenzialabfalls, die Dauer als elektrophysiologische Länge des Ereignisses und die Frequenz als die Häufigkeit der aufgetretenen AEs pro Minute definiert. Diese Parameter wurden mit einem selbst erstellten Skript in MATLAB (R2014b, Math Works Natick, USA) standardisiert ausgewertet. Die Daten der intrinsischen optischen Signale wurden ebenfalls mit einem hauseigenen Skript in MATLAB ausgewertet. Dabei wurden die Transmissionsänderung, der Ursprungsort, die Ausbreitungsmuster eines AE sowie das Ausbreitungsmaß im gesamten Hirnschnittpräparat und in den jeweiligen Hirnregionen ausgewertet. Die Ausbreitung eines AE über die verschiedenen Regionen des Hirnschnitts wurde im Rahmen der Auswertung quantifiziert; somit konnte festgestellt werden, welcher Flächenanteil innerhalb eines Hirnschnittpräparats von der epileptiformen Aktivität erfasst wurde. Der Flächenanteil wurde zuerst in der gesamten Hirnschnittoberfläche absolut, anschließend in jeder Hirnregion anteilig proportional in Prozent berechnet. Bei der Berechnung wurde das Verhältnis des von der epileptiformen Aktivität erfassten Areals zu dem gesamten Hirnschnittpräparat berücksichtigt.

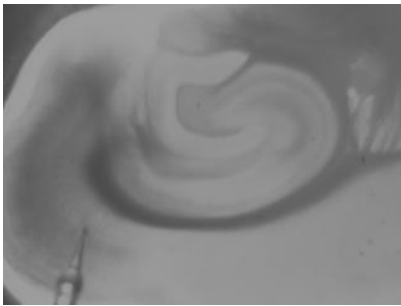
Das optische und elektrophysiologische Signal haben sich synchronisiert verhalten, d.h. dass der Beginn der beiden Signale während des Auftretens eines AE zeitgleich war. Zudem fand sich eine Übereinstimmung zwischen der elektrophysiologisch gemessenen Anfallsdauer und der optischen Signaldauer, auch wenn das optische Signal eine längere Abklingzeit hat (siehe Abbildung 5).



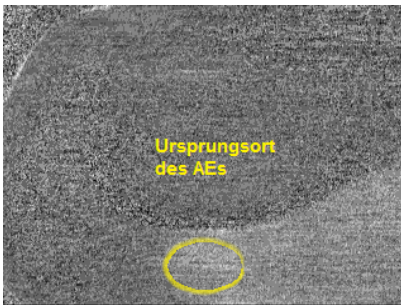
**Abbildung 5: Vergleich der Transmissionsänderung mit elektrischen Feldpotenzialen während eines AE**

Der Beginn des AEs wird durch die vertikale Linie markiert. Das AE wird sowohl elektrophysiologisch als auch optisch gleichzeitig aufgezeichnet. Man kann außerdem erkennen, dass die die intrinsischen optischen Signale als die elektrophysiologisch aufgezeichneten Feldpotenziale etwas länger andauern.

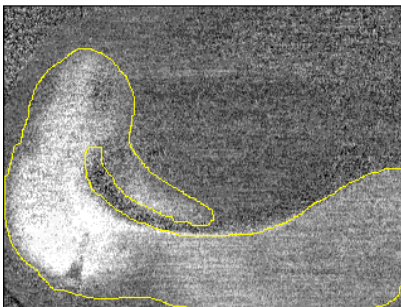
Zur Berechnung der Gesamtfläche eines AE wurde jeder Bildpunkt zur Auswertung genommen, der mindestens eine Transmissionsänderung von 0,1% auf mindestens 20 Bildern zeigte. In der hierdurch errechneten Summe der Bilder wurde dann die maximale Ausdehnung des AE markiert. Als Ursprungsort wurde die Region definiert, in welcher zuerst eine Transmissionsänderung registriert wurde (siehe auch Abbildung 6).



1. Das originale Bild mit der Messelektrode im entorhinalen Cortex

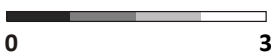


2. Der Beginn und das Ursprungsort des AE im temporalen Cortex



3. Die maximale Ausdehnung des AE über das gesamte Hirnschnittpräparat

$\Delta T/T$  (%)



**Abbildung 6: Originalbilder eines Hirnschnittpräparats während eines AE**

In den obigen Bildern liegt der Ursprungsort des AE im entorhinalen Cortex. Zudem ist die maximale Ausdehnung des AE im gesamten Hirnschnittpräparat im Verlauf zu sehen.

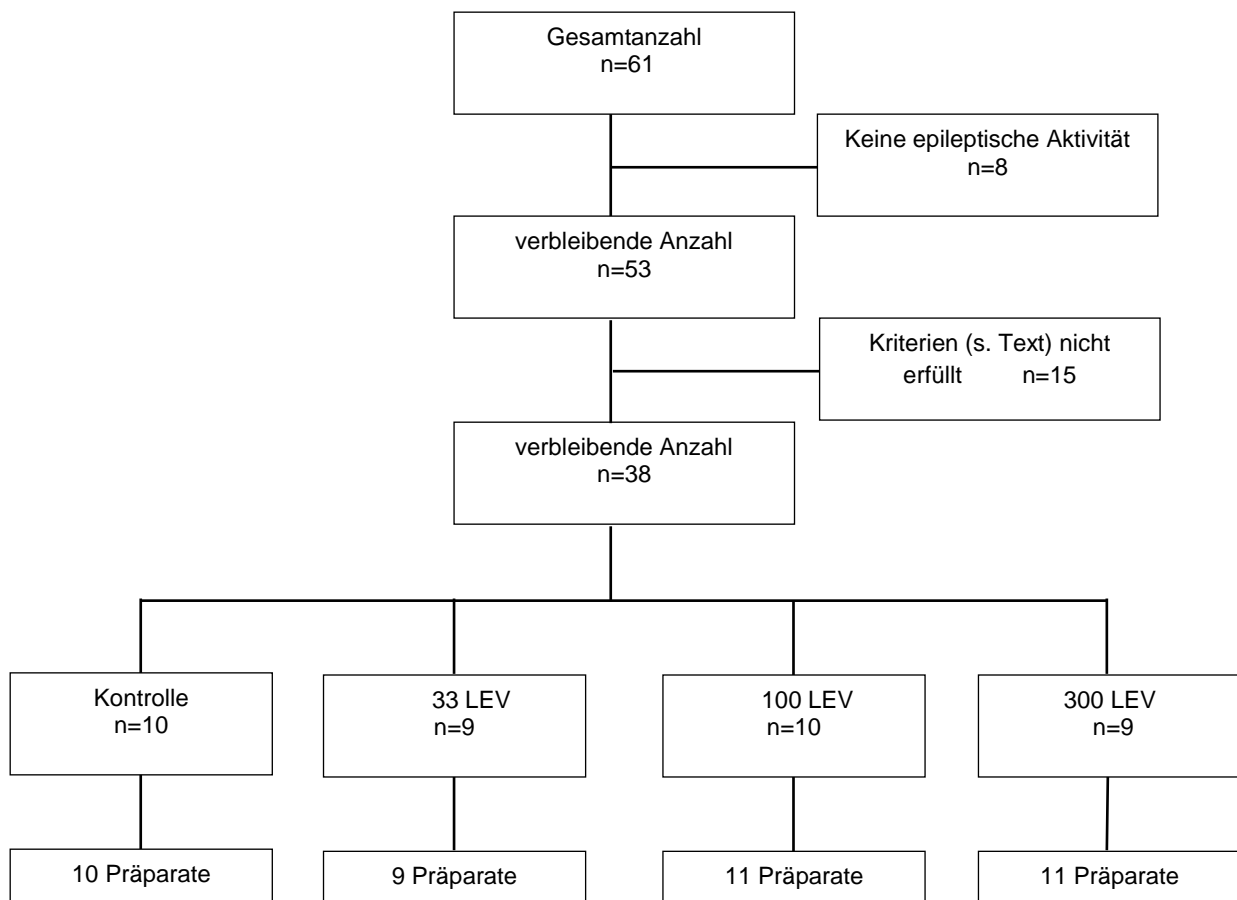
#### 4.9. Statistische Auswertung und Präsentation der Daten

Für die statistische Auswertung der Daten wurden insgesamt vier Gruppen gebildet: eine Kontrollgruppe (Kontrolle), die lediglich mit 4-AP behandelt wurde; und drei Gruppen mit verschiedenen Levetiracetam-Konzentration in Höhe von 33  $\mu\text{M}$  (33 LEV), 100  $\mu\text{M}$  (100 LEV) und 300  $\mu\text{M}$  (300 LEV). Bei allen elektrophysiologischen und den meisten optischen Parametern wurde zunächst das arithmetische Mittel über alle AEs je Phase pro Hirnschnittpräparat ermittelt, anschließend wurden diese Werte über alle Hirnschnittpräparate und Gruppen gemittelt. Bei der Berechnung des Ausbreitungsmusters und der Bestimmung von Ursprungsorten wurde die prozentuale Verteilung über alle AEs von allen Hirnschnittpräparaten berechnet. Die statistische Berechnung erfolgte zuerst mit der Prüfung der Normalverteilung der Werte durch einen *Shapiro-Wilk-Test*. Die statistische Signifikanz innerhalb einer Gruppe (Intragruppenvergleich) zwischen den drei Phasen wurde durch *repeated measure ANOVAs* und *Bonferroni als post-hoc-Test* mit dem Statistikprogramm Prism® (La Jolla, USA) berechnet. Beim Intergruppenvergleich wurde einerseits die Ratio von allen Parametern zwischen Interventions- und Baseline-Phase, andererseits zwischen Baseline- und Auswaschphase gebildet. Hierfür wurden die *einfaktorielle ANOVA* und der *Bonferroni als post-hoc-Test* mit dem Statistikprogramm Prism verwendet. Für signifikante Unterschiede wurde  $p < 0,05$  und für hochsignifikante Unterschiede  $p < 0,001$  angenommen. Die Erstellung der Grafiken und Bilder erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2013, Microsoft Powerpoint 2013 und Prism.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Tiere und Gruppeneinteilung

Für die Experimente wurden insgesamt 61 Tiere verwendet. Bei Hirnschnittpräparaten von acht Tieren konnte durch 4-AP keine epileptische Aktivität ausgelöst werden. Bei Hirnschnittpräparaten von 15 Tieren wurden nicht alle drei Phasen des Experiments durchlaufen, weswegen sie aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden. Damit wurden für die Experimente insgesamt 38 Tiere verwendet, wobei bei 35 Tieren ein Hirnschnitt- und bei drei Tieren jeweils zwei Hirnschnittpräparate, also insgesamt 41 Hirnschnittpräparate zum Einsatz kamen.



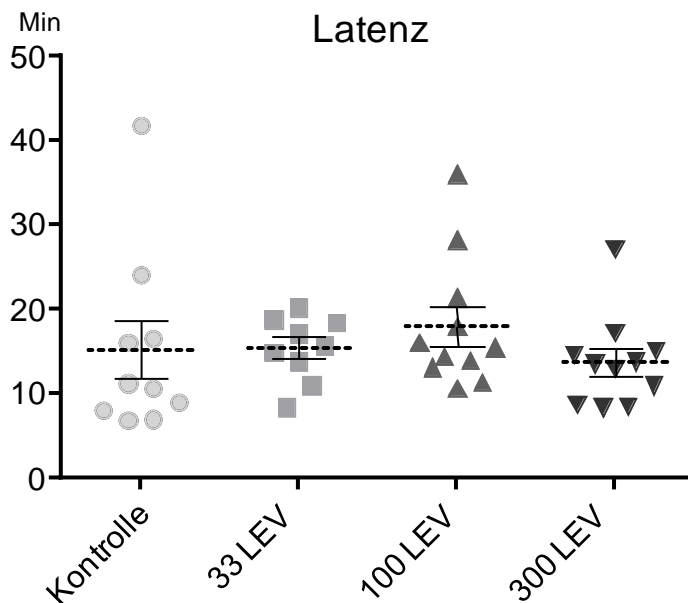
**Abbildung 7: Übersicht über die Anzahl der untersuchten Tiere und Hirnschnittpräparate in den jeweiligen Gruppen.**

Es wurde mehrheitlich pro Tier ein Hirnschnitt untersucht. Insgesamt haben 38 von 61 Tieren und hieraus 41 Hirnschnittpräparate alle Kriterien für die Auswertung erfüllt. (n: Tieranzahl, Kontrolle: Kontroll-Gruppe, 33 LEV: 33 µM Levetiracetam, 100 LEV: 100 µM Levetiracetam, 300 LEV: 300 µM Levetiracetam)

## 5.2. Elektrophysiologische Daten

### 5.2.1. Latenz anfallsartiger Ereignisse

Die Latenz vom Beginn der Interventionsphase bis zum ersten AE betrug in der Kontroll-Gruppe  $15,1 \pm 10,8$  min, in der 33 LEV-Gruppe  $15,3 \pm 3,9$  min, in der 100 LEV-Gruppe  $16,5 \pm 5,1$  min und in der 300 LEV-Gruppe  $13,7 \pm 5,3$  min, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Latenz zwischen Beginn der Einwaschphase von 4-AP bis zum Auftreten des ersten AE**

In allen Gruppen fanden sich vergleichbare Werte ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

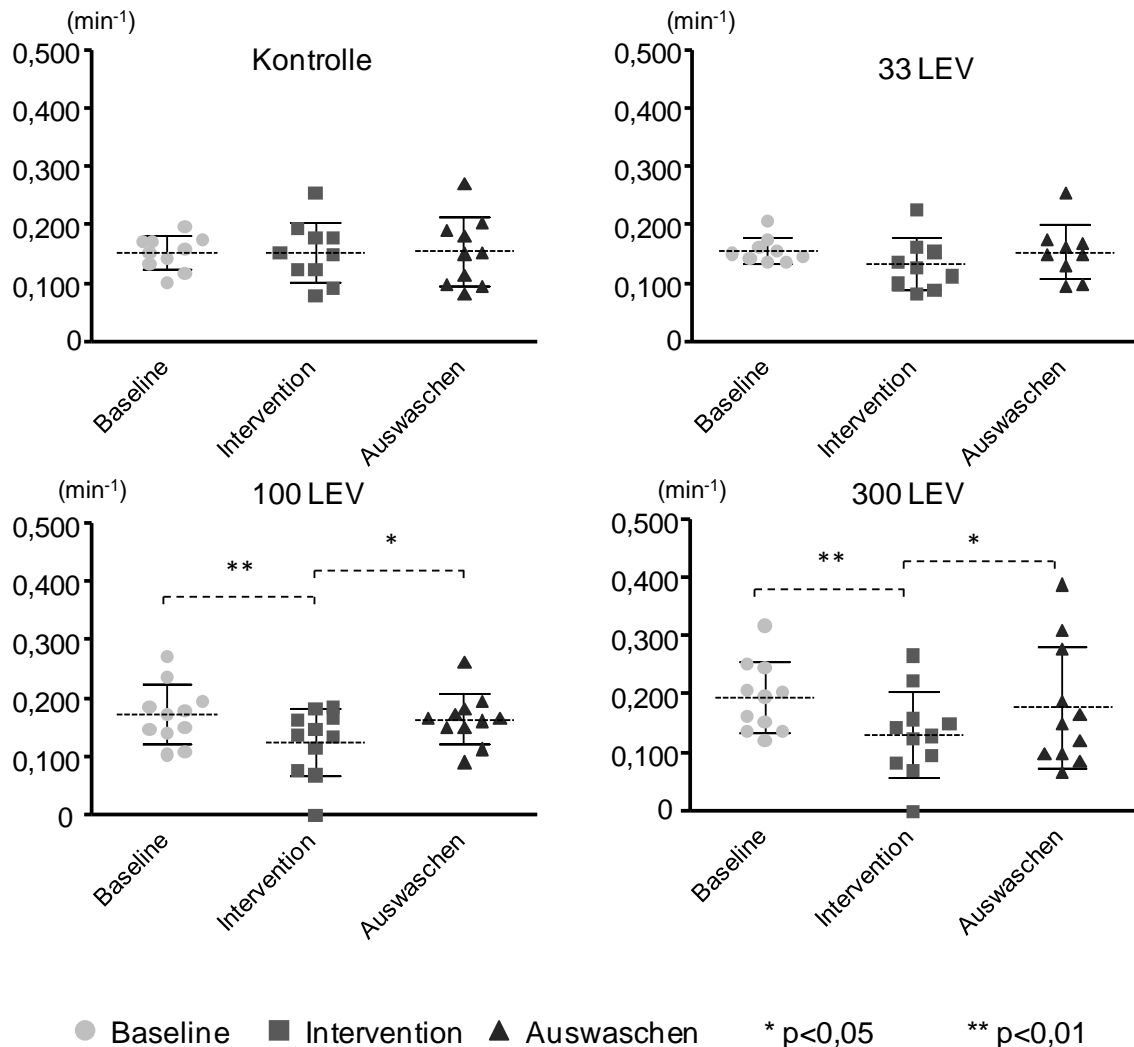
### 5.2.2. Frequenz anfallsartiger Ereignisse

Beim Vergleich der Frequenz der AEs während der unterschiedlichen Phasen des Experiments (Baseline, Interventions- und Auswaschphase) gab es innerhalb der Kontroll-Gruppe (Intragruppenvergleich) keine signifikanten Unterschiede (Baseline-Phase  $0,15 \pm 0,03$   $\text{min}^{-1}$ , Interventionsphase  $0,15 \pm 0,05$   $\text{min}^{-1}$ , Auswaschphase  $0,16 \pm 0,06$   $\text{min}^{-1}$ ).

Auch in der 33 LEV-Gruppe gab es im Intragruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Phasen des Experiments, allerdings zeigte sich eine tendenzielle Abnahme ( $p < 0,1$ ) der Frequenz zwischen Baseline- ( $0,16 \pm 0,02$   $\text{min}^{-1}$ ) und Interventionsphase ( $0,13 \pm 0,05$   $\text{min}^{-1}$ ), mit Rückkehr zum Ausgangsniveau in der Auswaschphase ( $0,16 \pm 0,05$   $\text{min}^{-1}$ ).



In der 100 LEV-Gruppe wurde zwischen der Baseline-Phase ( $0,17 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ ) und der Interventionsphase ( $0,13 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ ) ein hochsignifikanter ( $p < 0,01$ ) sowie zwischen der Interventions- und der Auswaschphase ( $0,17 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ ) ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied festgestellt.

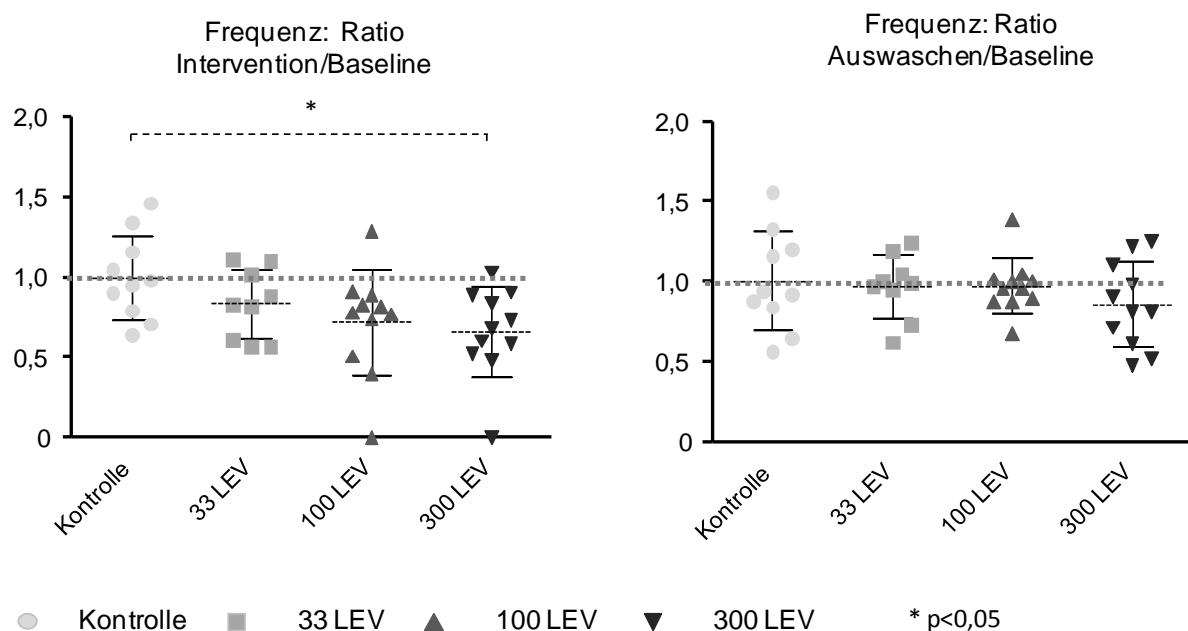


**Abbildung 9: Intragruppenvergleich der Frequenz der AEs**

Während in der Kontroll-Gruppe und in der 33 LEV-Gruppe in drei beschriebenen Phasen keine signifikante Werte erzielt wurden, fand sich in der 100 LEV- und der 300 LEV-Gruppe eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduktion der Frequenz zwischen der Baseline- und Interventionsphase sowie ein ebenfalls signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen der Interventions- und Auswaschphase.

In der 300 LEV-Gruppe konnte ebenfalls eine hochsignifikante Reduktion ( $p < 0,01$ ) der Anfallsfrequenz zwischen der Baseline- ( $0,20 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ ) und Interventionsphase ( $0,13 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ ) sowie ein signifikanter Unterschied zwischen Interventionsphase und Auswaschphase ( $0,18 \pm 0,11 \text{ min}^{-1}$ ) festgestellt werden. Bei einem Hirnschnittpräparat wurde sogar eine komplette Unterdrückung von AEs beobachtet (siehe Abbildung 10).

Es ergab sich eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) der Frequenz im Intergruppenvergleich zwischen der Kontroll-Gruppe ( $1,00 \pm 0,25$ ) und der 300 LEV-Gruppe ( $0,66 \pm 0,28$ ) bei der Ratio zwischen Interventions-/Baseline-Phase. In der 33 LEV- und 100 LEV-Gruppe ergab sich jeweils kein signifikanter Unterschied. Es wurde außerdem untersucht, ob hinsichtlich der Frequenz der AEs ein signifikanter Unterschied zwischen Auswaschphase und Baseline-Phase besteht oder ob die Frequenz der AEs nach Auswaschen des Levetiracetams wieder das Ausgangsniveau erreicht. Hierbei ergaben sich fast in allen Gruppen im Mittel unveränderte Werte. Lediglich in der 300 LEV-Gruppe zeigte sich in der Auswaschphase mit einer Ratio von  $0,86 \pm 0,27$  ein deutlich niedrigerer Wert ( $p = 0,18$ ) als in der Baseline-Phase (siehe Abbildung 10).



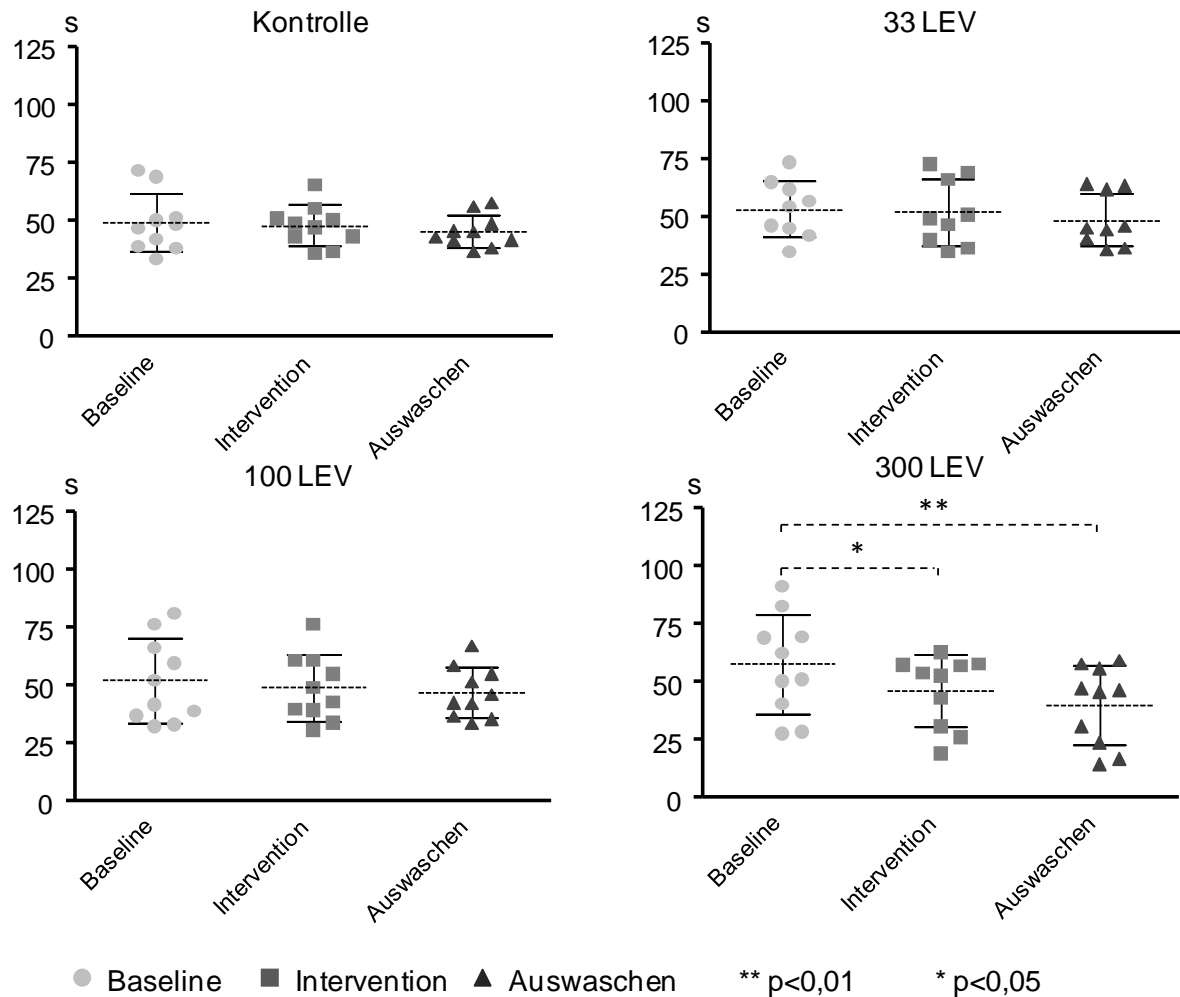
**Abbildung 10: Intergruppenvergleich der Frequenz der AEs**

Die Ratio zwischen der Interventions- und der Baseline-Phase sowie Auswasch- und Baseline-Phase der jeweiligen Gruppen (Intergruppenvergleich). Die Ratio Intervention/Baseline in der 300-LEV-Gruppe unterscheidet sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontroll-Gruppe.

### 5.2.3. Dauer anfallsartiger Ereignisse

In der Kontroll-Gruppe hat sich die Dauer der AEs zwischen den drei Phasen nicht signifikant verändert (Baseline-Phase  $49,1 \pm 12,7$  Sekunden, Interventionsphase  $47,9 \pm 8,8$  Sekunden, Auswaschphase  $45,4 \pm 7$  Sekunden).

In der 33 LEV-Gruppe konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Phasen gemessen werden (Baseline-Phase  $53,2 \pm 12,3$  Sekunden, Interventionsphase  $51,8 \pm 14,3$  Sekunden, Auswaschphase  $48,5 \pm 11,5$  Sekunden).



**Abbildung 11: Intragruppenvergleich der Dauer der AEs**

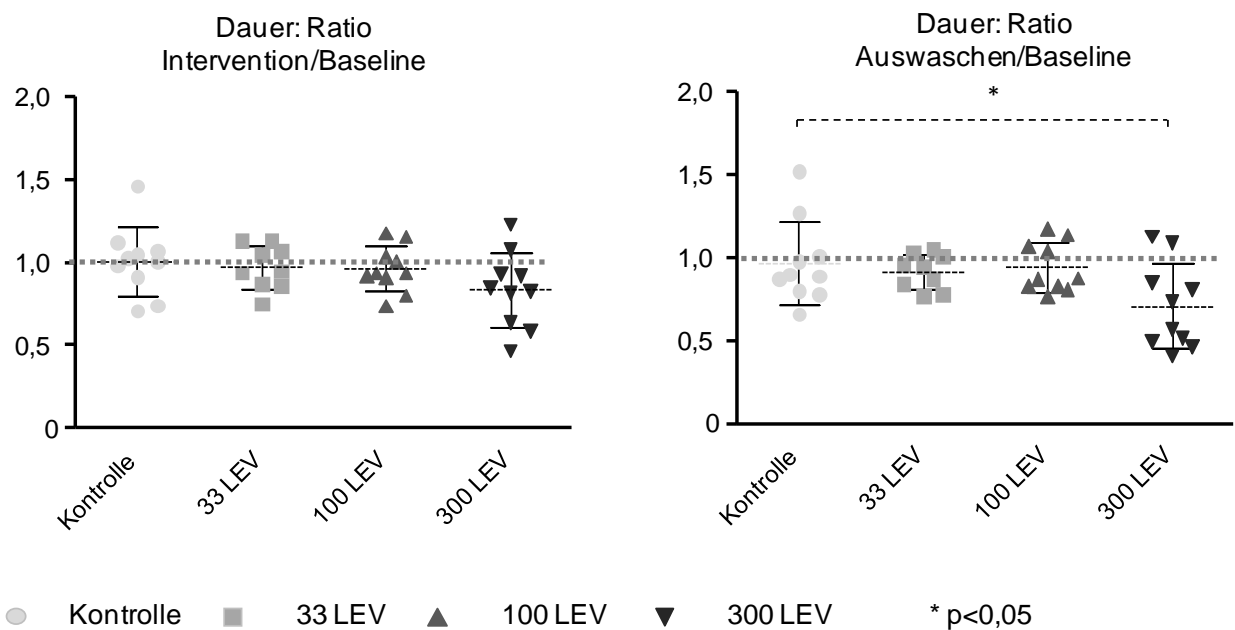
In der 300 LEV Gruppe zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Dauer von Baseline- zu Interventions- bzw. zu Auswaschphase, während die Dauer in den anderen Gruppen über die Zeit relativ stabil bleibt.

In der 100 LEV-Gruppe haben sich auch hier vergleichbare Werte ergeben, die keinen signifikanten Unterschied zeigten. Die Werte waren wie folgt: in der Baseline-Phase  $52 \pm 18,1$  Sekunden, in der Interventionsphase  $48,9 \pm 14,4$  und in der Auswaschphase  $46,9 \pm 11$  Sekunden.

In der 300 LEV-Gruppe konnte eine statistisch signifikante Verkürzung ( $p < 0,05$ ) der Dauer zwischen der Baseline- ( $57,6 \pm 21,6$  Sekunden) und Interventionsphase ( $46,2 \pm 15,5$  Sekunden) gemessen werden. Es wurde außerdem zwischen Baseline- ( $57,6 \pm$

21,6 Sekunden) und Auswaschphase ( $40 \pm 17$  Sekunden) ein statistisch hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied festgestellt.

Im Intergruppenvergleich zwischen der Kontroll- und 300 LEV-Gruppe zeigte sich bei der Ratio von Auswaschphase ( $0,97 \pm 0,3$ ) /Baseline-Phase ( $0,71 \pm 0,3$ ) ein statistisch signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied. Bei anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 12: Intergruppenvergleich der Dauer der AEs**

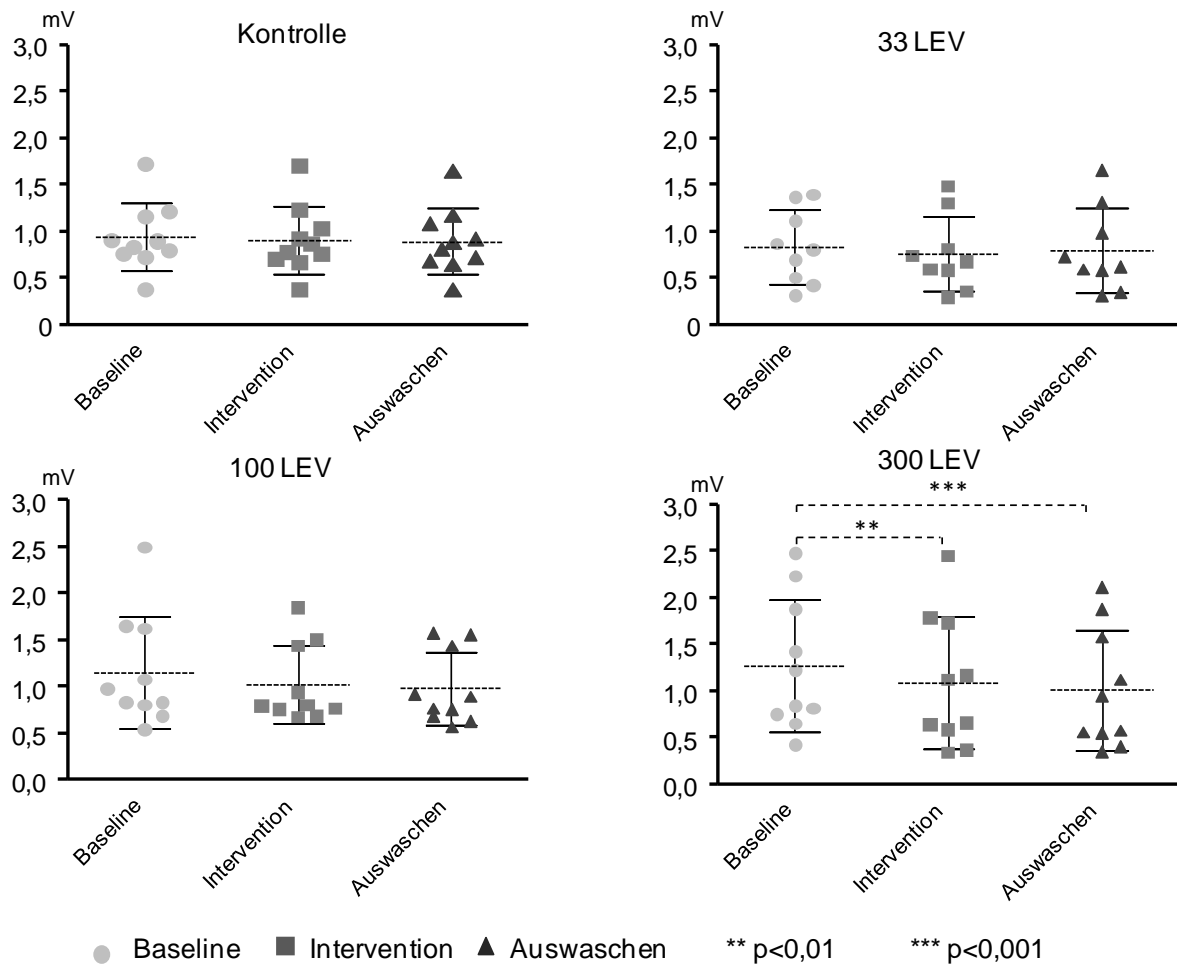
Es fand sich zwischen der Kontroll- und 300 LEV-Gruppe ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied bei Auswaschen/Baseline.

#### 5.2.4. Amplitude des Feldpotenzials

In der Kontroll-Gruppe zeigte sich im Intragruppenvergleich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Phasen.

In der 33 LEV- und in der 100 LEV-Gruppe wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (33 LEV-Gruppe: Baseline-Phase  $0,83 \pm 0,4$  mV, Interventionsphase  $0,76 \pm 0,4$  mV, Auswaschphase  $0,80 \pm 0,5$  mV; 100 LEV-Gruppe: Baseline-Phase  $1,16 \pm 0,6$  mV, Interventionsphase  $1,02 \pm 0,4$ , Auswaschphase  $0,99 \pm 0,4$  mV).

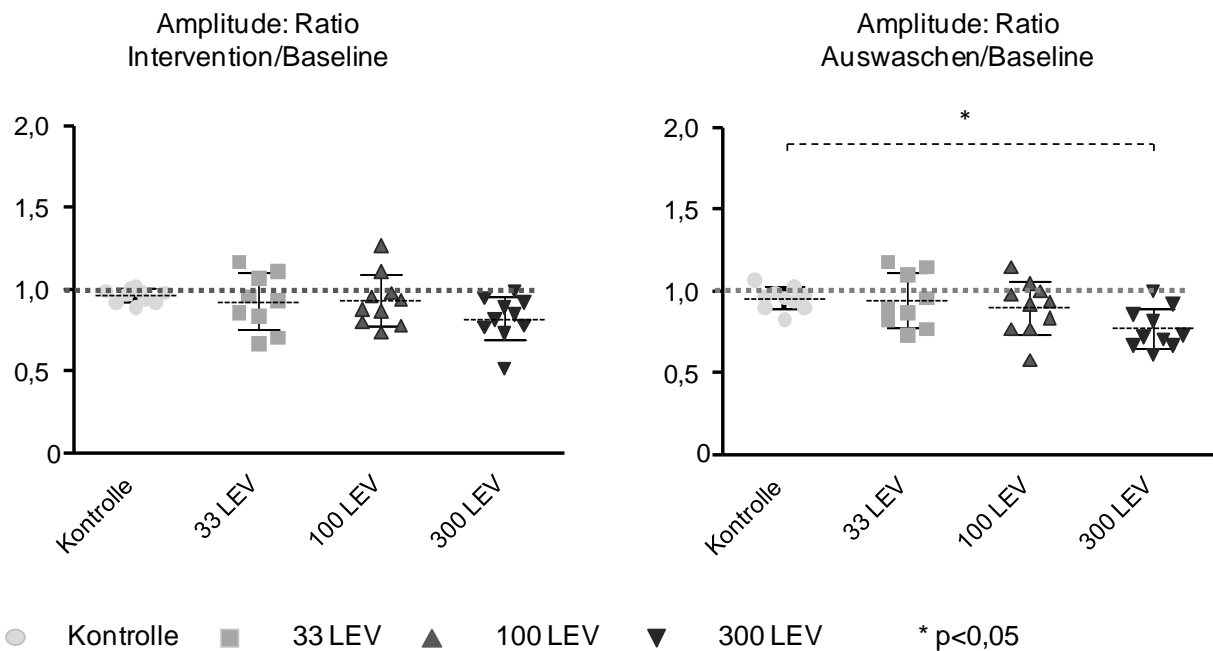
In der 300 LEV-Gruppe ergab sich hingegen eine statistisch hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Amplitude des Feldpotenzials sowohl zwischen der Baseline- ( $1,27 \pm 0,71$  mV) und der Interventionsphase ( $1,09 \pm 0,7$  mV) als auch zwischen der Baseline- und der Auswaschphase ( $1,01 \pm 0,7$  mV).



**Abbildung 13: Intragruppenvergleich der Feldpotenzial-Amplitude der AEs**

In der 300 LEV-Gruppe zeigte sich eine hochsignifikante kontinuierliche Reduktion der Amplitude in der Interventions- und der Auswaschphase, während in den anderen Gruppen keine großen Unterschiede zwischen den Phasen zu sehen waren.

Beim Intergruppenvergleich ergab sich in der Auswasch-/Baseline-Phase zwischen der Kontroll- ( $0,96 \pm 0,1$ ) und der 300 LEV-Gruppe ( $0,77 \pm 0,1$ ) ein statistisch signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied.



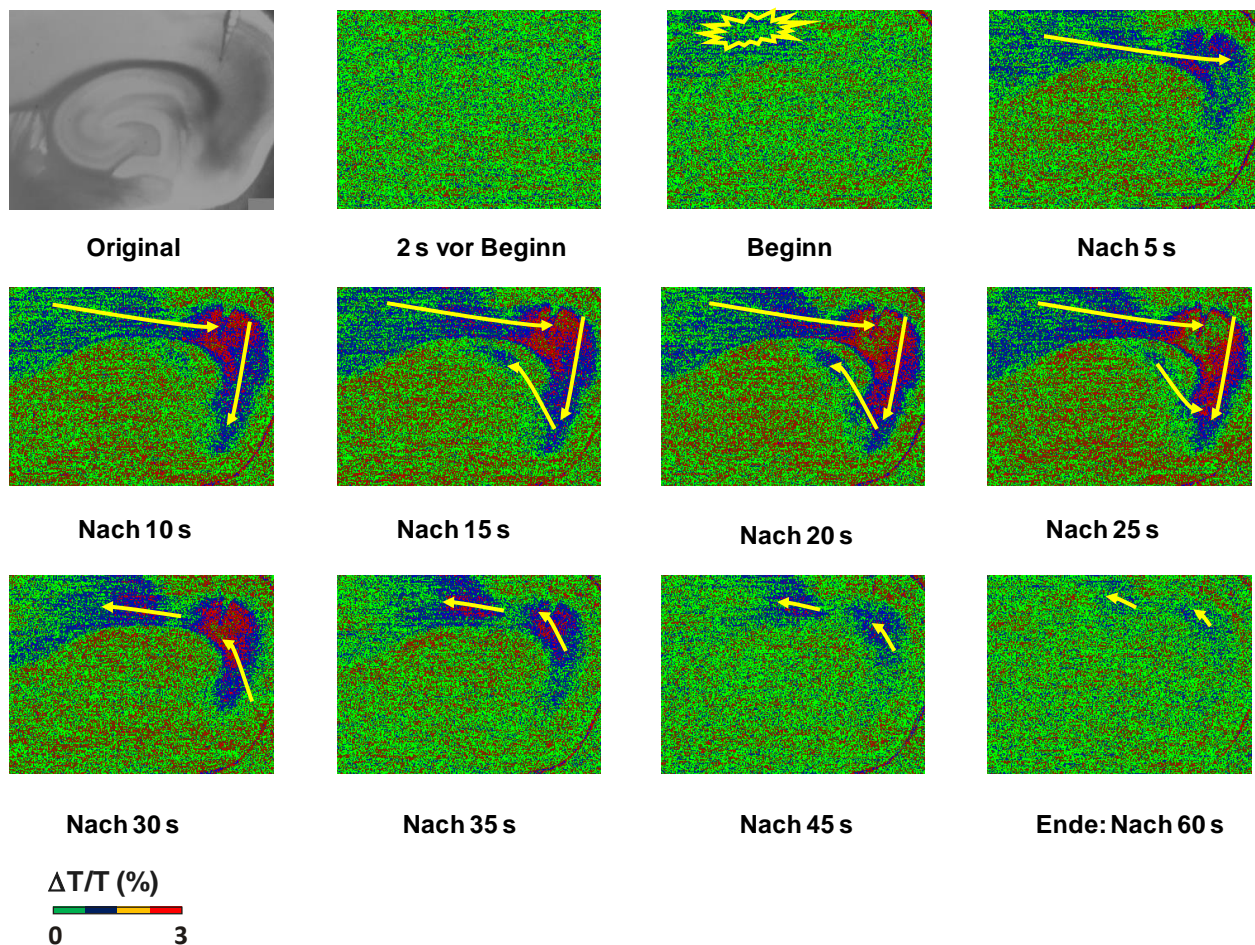
**Abbildung 14: Intergruppenvergleich der Feldpotential-Amplitude der AEs**

Es zeigte sich zwischen der Kontrolle und 300 LEV bei der Ratio Auswasch-/Baseline-Phase ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied.

### 5.3. Optische Eigenschaften

#### 5.3.1. Ausbreitungsmuster anfallsartiger Ereignisse

Neben der Bestimmung des Ursprungsortes wurde außerdem beobachtet, wie sich jedes anfallsartige Ereignis innerhalb des Hirnschnittpräparats ausbreitet. Es wurden hierbei zwei verschiedene Ausbreitungsmuster unterschieden: Kontinuierlich und diskontinuierlich. Bei dem kontinuierlichen Ausbreitungsmuster handelte es sich um die AEs, die vom Ursprungsort aus fortlaufend in die jeweils benachbarte Region wanderten. Bei dem diskontinuierlichen Ausbreitungsmuster konnte man hingegen keine optisch nachvollziehbare kontinuierliche Wanderung beobachten. AEs hatten sich zum Teil sprunghaft ausgebreitet. In der folgenden Abbildung sind – fehlfarbencodiert – der Beginn und das Ausbreitungsmuster eines AE im Vergleich zum originalen Bild zu sehen.



**Abbildung 15: Ausbreitungsmuster eines AE mit fehlfarbcodierten Differenzbildern**

Im ersten Bild ist das Originalbild mit der Ableitelektrode im entorhinalen Cortex zu sehen. Alle aufeinander folgenden Bilder wurden von diesem Originalbild subtrahiert, um so die mögliche Transmissionsänderung während eines AE sichtbar zu machen. Der zeitliche Verlauf wurde durch die Zeitangaben unter den Bildern dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein Rauschen nach 3 s in blauer Farbe im temporalen Cortex den Beginn des AE signalisiert. Die epileptiforme Aktivität breitet sich rasch Richtung perirhinalen und entorhinalen Cortex aus. Nach circa 20 Sekunden wurde die maximale Ausbreitung erreicht. Die höchste Transmissionsänderung fand im entorhinalen Cortex in roter Farbe statt. Die optische Signaländerung bildet sich nach 25 s allmählich zurück und endet nach 60 Sekunden im entorhinalen Cortex. Die epileptiforme Aktivität begrenzte sich auf vier Regionen, nämlich entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PC), temporaler Cortex (TC) und Subiculum (Sub). Hingegen waren Cornu ammonis (CA) und Gyrus dentatus (DG) von der epileptiformen Aktivität nicht betroffen.

Es hat sich in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Ausbreitungsmuster gezeigt. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der einzelnen Gruppen dargestellt.

	Kontinuierlich			Diskontinuierlich		
	Baseline	Intervention	Auswaschen	Baseline	Intervention	Auswaschen
<b>Kontrolle</b>	<b>33</b>	<b>31</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>33 LEV</b>	<b>34</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<b>100 LEV</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>31</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>300 LEV</b>	<b>34</b>	<b>30</b>	<b>28</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

**Tabelle 1: Darstellung der Anzahl der AEs in den einzelnen Gruppen bezüglich des Ausbreitungsmusters**

In allen Gruppen ergaben sich mehrheitlich kontinuierliche und vereinzelt diskontinuierliche Ausbreitungsmuster ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

### **5.3.2. Ursprungsorte anfallsartiger Ereignisse**

Als Ursprungsort eines AE wurde diejenige anatomische Region bezeichnet, in der die ersten Änderungen der Transmission (Lichtdurchlässigkeit) auftraten. In dieser Region wurde ein AE generiert, das sich von hier aus in die anderen Regionen ausgebreitet hat. Bei manchen AE trat die epileptiforme Aktivität zum selben Zeitpunkt in mehreren Regionen auf. In diesem Fall wurde mehr als ein Ursprungsort festgestellt, sodass dieses Phänomen „multifokaler Onset (MO)“ benannt wurde. Die meisten AEs hatten als Ursprungsort den entorhinalen Cortex. In den CA1- und CA3-Regionen der Hippocampusformation konnte keine epileptiforme Aktivität aufgezeichnet werden und dementsprechend kein Ursprungsort.

In der Kontroll-Gruppe wurden 36 AEs in der Baseline-Phase, 36 in der Interventionsphase und 31 in der Auswaschphase bezüglich ihres Ursprungsortes untersucht. In allen drei Phasen traten die meisten AEs im entorhinalen Cortex (Baseline-Phase 47,2 %, Interventionsphase 41,7 %, Auswaschphase 45,2 %) auf. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein signifikanter Unterschied bei der Verteilung der Ursprungsorte auf die Hirnregionen festgestellt. Im Subiculum (Baseline-Phase 2,8 %, Interventionsphase 2,8 %, Auswaschphase 3,2 %) hatten die wenigsten AEs ihren Ursprung. Die Häufigkeit der AEs mit multifokalem Onset war wie folgt verteilt: Baseline-Phase 5,6 %, Interventionsphase 2,8 %, Auswaschphase 3,2 %.

In der 33 LEV-Gruppe konnten 36 AEs in der Baseline-Phase, 32 in der Interventionsphase und 31 in der Auswaschphase untersucht werden. Hierbei fand sich

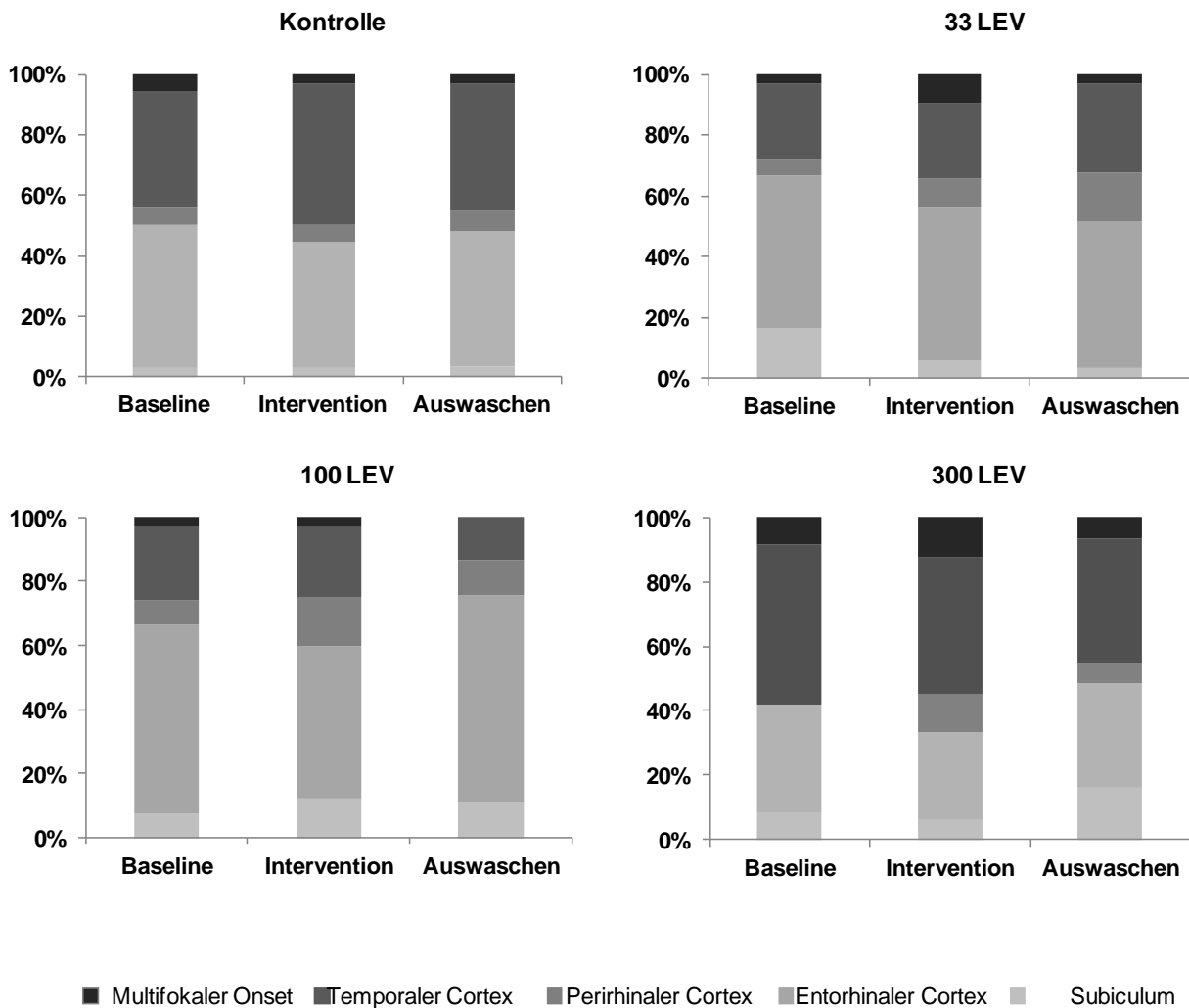


ebenfalls zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied. Auch hier hatten die meisten AEs ihren Ursprung im entorhinalen Cortex (Baseline-Phase 50 %, Interventionsphase 50 %, Auswaschphase 48,4 %); nur wenige AEs hatten einen multifokalen Onset (Baseline-Phase 2,8 %, in der Interventionsphase 9,4 % und in der Auswaschphase 3,2 %).

In der 100 LEV-Gruppe wurden 39 AEs in der Baseline-Phase, 40 in der Interventionsphase und 37 in der Auswaschphase aufgezeichnet. Während der Interventionsphase (47,5 %) reduzierte sich zwar der Anteil von AEs mit Ursprung im entorhinalen Cortex im Vergleich zur Baseline-Phase (59 %), stieg aber in der Auswaschphase (64,9 %) wieder an. Dabei hat sich kein signifikanter Unterschied zwischen keiner der Phasen gezeigt.

In der 300 LEV-Gruppe wurden 37 AEs in der Baseline-Phase, 33 in der Interventionsphase und 31 in der Auswaschphase aufgezeichnet. Es zeigte sich im entorhinalen (Baseline-Phase 32,4 %, Interventionsphase 27,3 %, Auswaschphase 32,3 %) und temporalen Cortex (Baseline-Phase 48,7 %, Interventionsphase 42,4 %, Auswaschphase 38,7 %) sowie im Subiculum (Baseline-Phase 10,8 %, Interventionsphase 6,1 %, Auswaschphase 16,1 %) während der Interventionsphase eine Änderung des Ursprungsorts im nicht signifikanten Ausmaß. Nur ein geringer Anteil der AEs hatte einen multifokalen Onset (Baseline-Phase 8,1 %, Interventionsphase 12,1 %, Auswaschphase 6,5 %).

In der Summe über die gesamten Messungen war der entorhinale Cortex die Region, in der die meisten AEs (46 %) ihren Ursprungsort hatten. Anschließend fanden im temporalen Cortex 33 % aller AEs ihren Ursprungsort. Folglich wurden in Reihenfolge im Subiculum und perirhinalen Cortex je 8 % der AEs generiert. Letztlich hatten 5 % der AEs einen multifokalen Onset (5 %).



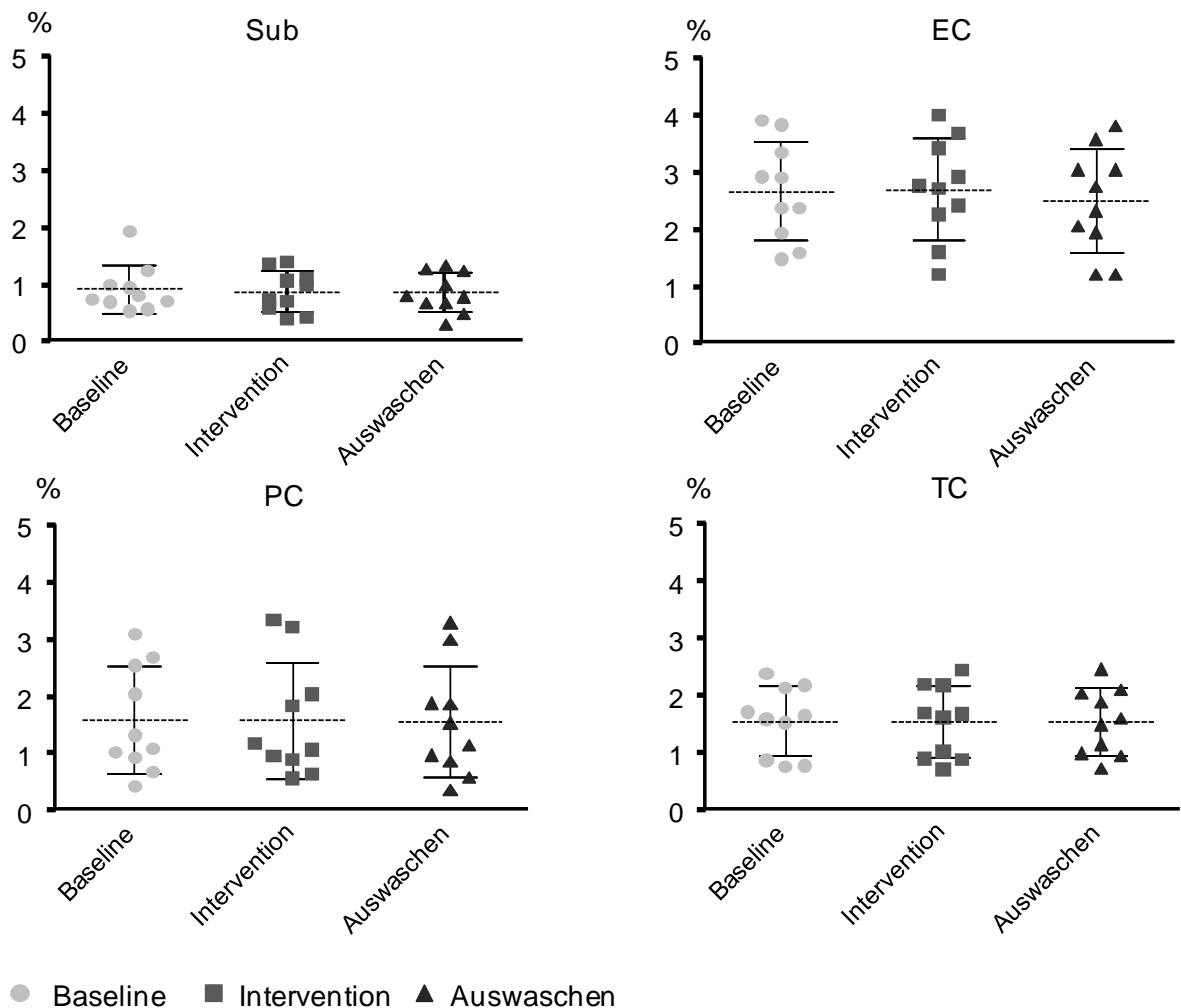
**Abbildung 16: Verteilung der Ursprungsorte in den Hirnregionen in der jeweiligen Phase**

Wenn die epileptiforme Aktivität gleichzeitig in mehreren Regionen begann, wurde diese als „multipler Onset“ bezeichnet. Es hat sich insgesamt in keiner der Gruppen zwischen den drei Phasen ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Ursprungsregion gezeigt. Die meisten AE hatten ihren Ursprungsort im entorhinalen Cortex, am zweithäufigsten war der temporale Cortex.

### 5.3.3. Transmissionsänderung anfallsartiger Ereignisse

Bei jedem elektrophysiologisch aufgezeichneten AE konnte eine Transmissionsänderung im Hirnschnitt beobachtet werden, die durch das intrinsische optische Signal erfasst wurde. Es handelte sich hierbei ausschließlich um eine Zunahme der Transmission im Hirngewebe. Während des AE konnte in den Regionen, die betroffen waren, eine Änderung der Lichttransmission gemessen werden: Subiculum, entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex. Es wurden insgesamt 419 AEs mittels IOS aufgezeichnet.

In der Kontroll-Gruppe fand sich in allen drei Phasen die höchste Transmissionszunahme im entorhinalen Cortex. Im Subiculum wurde hingegen die geringste Transmissionszunahme erfasst. Im perirhinalen Cortex und im temporalen Cortex zeigten sich vergleichbar große Werte. In der folgenden Grafik finden sich die einzelnen Ergebnisse wieder.

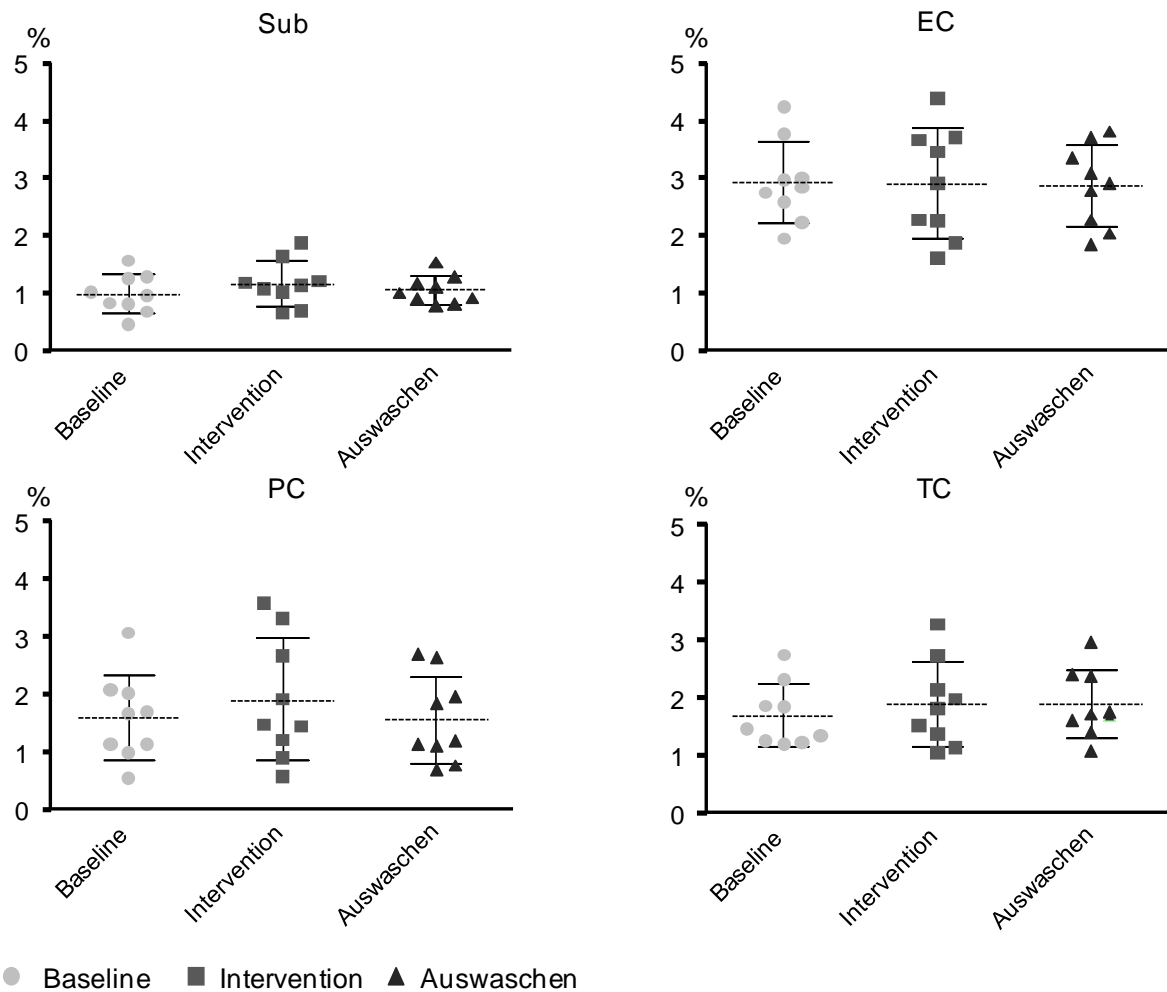


**Abbildung 17: Transmissionsänderung in der Kontroll-Gruppe in den Hirnregionen.**

Die höchste Transmissionsänderung (in %) war im entorhinalen Cortex (EC) und die niedrigste im Subiculum (Sub) zu verzeichnen. Es zeigte sich aber insgesamt in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den drei beschriebenen Phasen. TC: temporaler Cortex (TC), perirhinaler Cortex (PC)

In der 33 LEV-Gruppe hat sich die Transmissionsänderung der Hirnschnittpräparate in allen Regionen in den drei Phasen vergleichbar verhalten wie in der Kontroll-Gruppe. Es gab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied. Die höchste Transmissionszunahme fand sich ebenfalls im entorhinalen Cortex und die niedrigste im

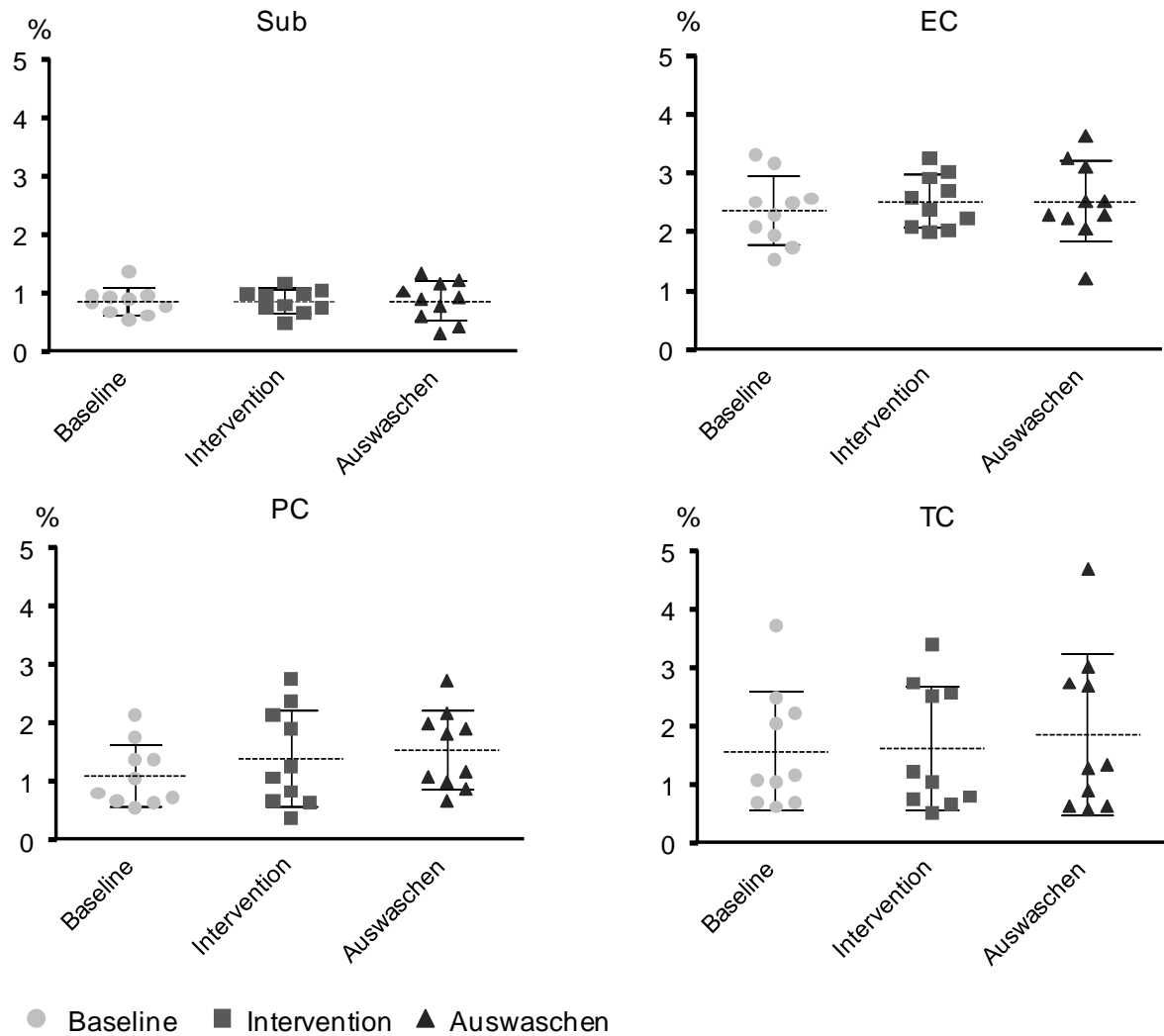
Subiculum. Im perirhinalen Cortex und temporalen Cortex zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 18: Transmissionsänderung in der 33 LEV-Gruppe in den Hirnregionen.**

Es hat sich in allen Hirnregionen zwischen den drei Phasen keinen Unterschied gezeigt. Sub: Subiculum; EC: entorhinaler Cortex; TC: temporalen Cortex (TC), perirhinaler Cortex (PC).

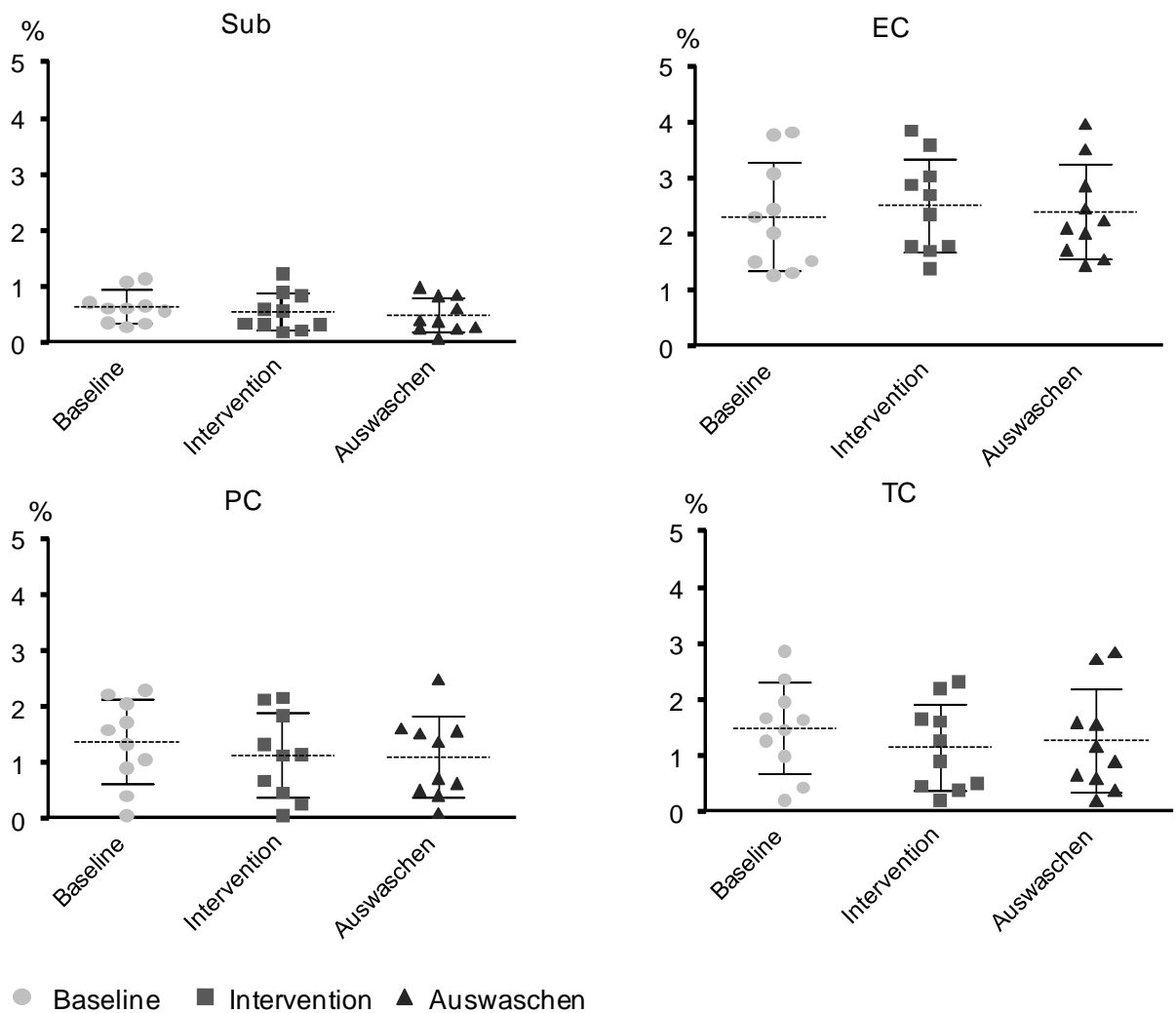
In der 100 LEV-Gruppe wurde ebenfalls in keiner der Hirnregionen zwischen den drei Phasen ein signifikanter Unterschied festgestellt. Im entorhinalen Cortex fand sich die höchste Zunahme der Transmission. Es konnte zwar im perirhinalen Cortex, im temporalen Cortex und im Subiculum während der Interventionsphase eine Zunahme der Transmission festgestellt werden, es gab aber keinen statistisch signifikanten ( $p=0.55$ ) Unterschied.



**Abbildung 19: Transmissionsänderung in der 100 LEV-Gruppe in den Hirnregionen**

Hierbei zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung zwischen den Phasen. Sub: Subiculum; EC: entorhinaler Cortex; TC: temporaler Cortex, PC: perirhinaler Cortex.

In der 300 LEV-Gruppe sank die Transmissionsänderung im Vergleich zu anderen Gruppen im Subiculum, perirhinalen Cortex und im temporalen Cortex während der Interventionsphase. Dieser Trend hatte jedoch keine statistische Signifikanz. Im entorhinalen Cortex zeigte sich diese Tendenz nicht.



**Abbildung 20: Transmissionsänderung in der 300 LEV-Gruppe in den Hirnregionen**

Die Transmissionszunahme sank hierbei im Vergleich zu anderen Gruppen im Subiculum (Sub), im perirhinalen (PC) und im temporalen Cortex (TC) während der Interventionsphase, allerdings nicht im signifikanten Ausmaß. EC: entorhinaler Cortex

### 5.3.4. Ausmaß der Ausbreitung epileptiformer Aktivität

#### *Ausbreitung im gesamten Hirnschnittpräparat*

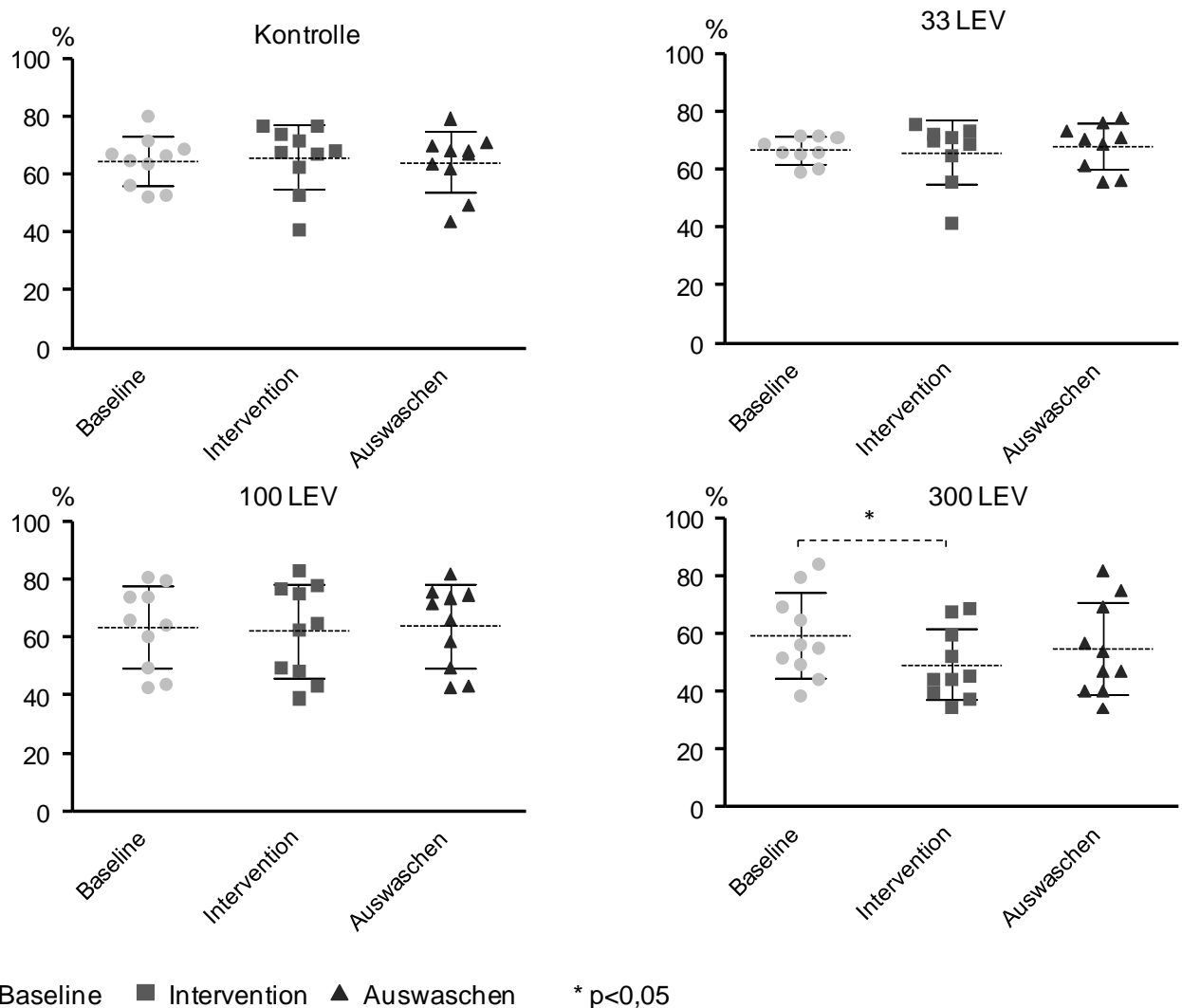
In der Kontroll-Gruppe wurden in zehn Hirnschnittpräparaten insgesamt 103 AEs ausgewertet. Im Intragruppenvergleich ergaben sich in allen drei Phasen vergleichbare Werte, die sich statistisch voneinander nicht unterschieden (Baseline-Phase:  $64,5 \pm 8,7$  %; Interventionsphase:  $65,9 \pm 11,2$  %; Auswaschphase:  $64,3 \pm 10,4$  %).

In der 33 LEV-Gruppe wurden in zehn Hirnschnittpräparaten insgesamt 99 AEs analysiert. Hierbei zeigten sich zwischen den Phasen keine statistisch signifikanten

Unterschiede (Baseline-Phase:  $66,7 \pm 4,7$  %; Interventionsphase:  $66 \pm 10,9$  %; Auswaschphase:  $68 \pm 8,2$  %).

In der 100 LEV-Gruppe wurden zehn Hirnschnittpräparate verwendet und in diesen insgesamt 116 AEs aufgezeichnet. Auch hierbei ergaben sich im Intragruppenvergleich aller drei Phasen keine signifikanten Unterschiede (Baseline-Phase:  $63,6 \pm 14,2$  %; Interventionsphase:  $62,3 \pm 16,1$  %; Auswaschphase:  $63,9 \pm 14,4$  %).

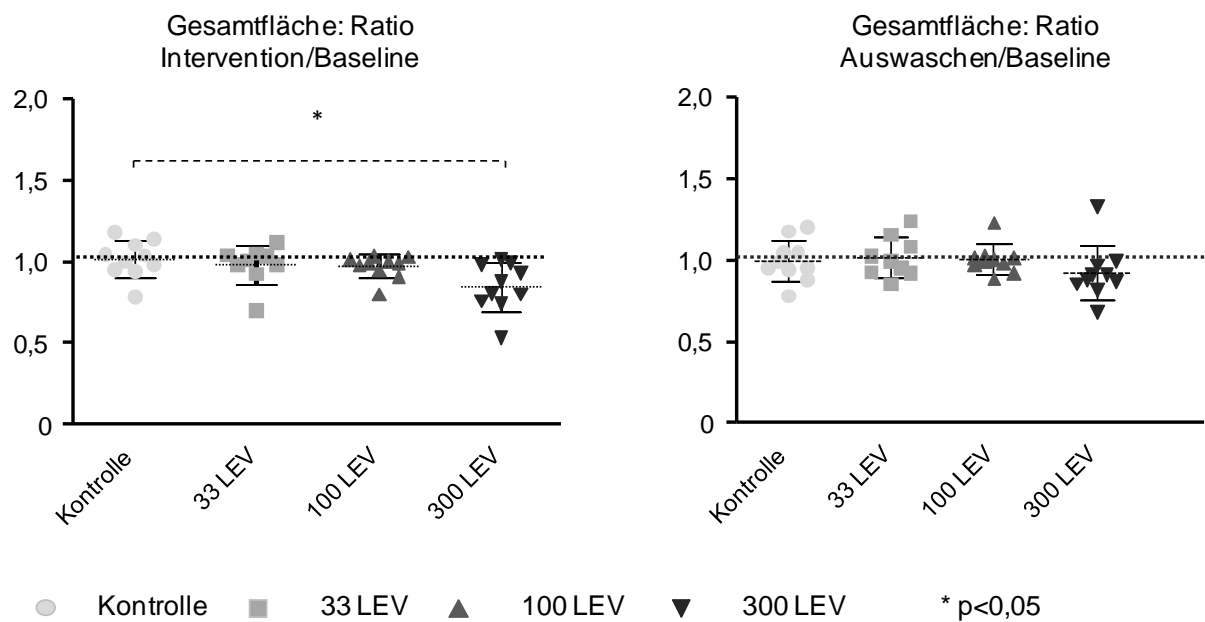
In der 300 LEV-Gruppe konnten elf Schnitte untersucht werden; dabei wurden 101 AEs ausgewertet. Hierbei konnte zwischen der Baseline-Phase ( $59,1 \pm 15$  %) und der Interventionsphase ( $49,4 \pm 12,2$ ) eine statistisch signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) der vom AE betroffenen Hirnschnittoberfläche gemessen werden. In der Auswaschphase stieg der von der epileptiformen Aktivität erfasste Flächenanteil wieder auf  $54,7 \pm 16$  % an.



**Abbildung 21: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im gesamten Hirnschnittpräparat im Intragruppenvergleich**

In der 300 LEV-Gruppe zeigte sich zwischen Baseline- und Interventionsphase eine signifikante Reduktion der Fläche, die von dem anfallsartigen Ereignis erfasst war.

Im Intergruppenvergleich ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe ( $1,0 \pm 0,1$ ) und der 300 LEV-Gruppe ( $0,8h \pm 0,2$ ) hinsichtlich des Flächenanteils mit epileptiformer Aktivität beim Verhältnis von Interventions- zu Baseline-Phase. Beim Verhältnis von Auswasch- zu Baseline-Phase wurde zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied beobachtet.



**Abbildung 22: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im gesamten Hirnschnittpräparat im Intergruppenvergleich**

Das Verhältnis von der Intervention- zu Baseline-Phase unterscheidet sich zwischen Kontroll- und 300 LEV-Gruppe statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

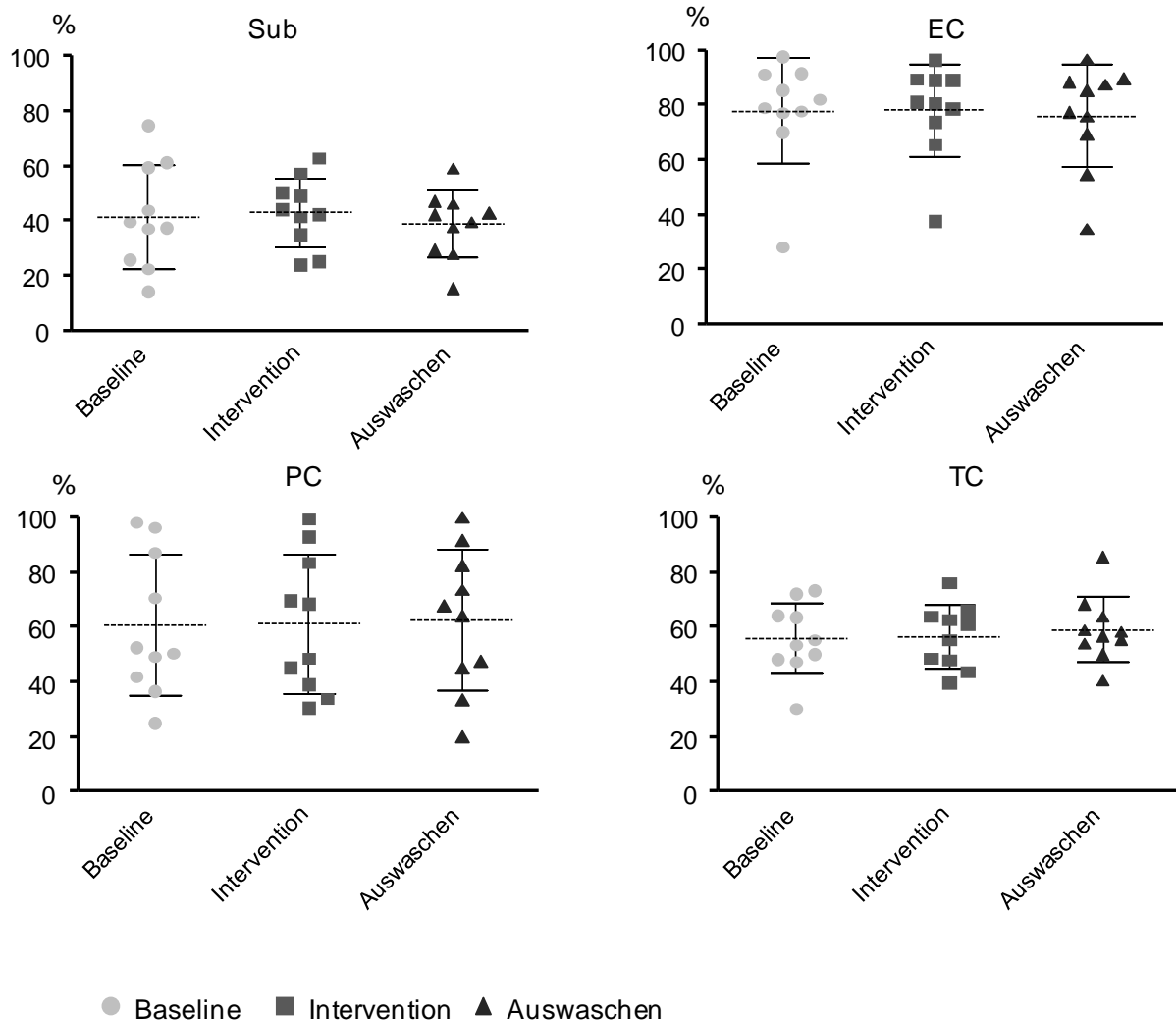
### *Ausbreitung in den Hirnregionen*

Neben dem gesamten Flächenanteil des Hirnschnittpräparats wurden auch die einzelnen Regionen hinsichtlich des Flächenanteils mit AE untersucht. In fast allen Regionen und Gruppen fanden sich vergleichbare Ergebnisse. Die detaillierten Ergebnisse finden sich in den Abbildungen wieder.

In der Kontroll-Gruppe wurde der entorhinale Cortex in der Baseline-Phase zu  $78 \pm 19,3$  %; in der Interventionsphase zu  $78,1 \pm 16,7$  und in der Auswaschphase zu  $76,1 \pm 18,7$  % von der epileptiformen Aktivität erfasst. Es zeigte sich auch in den anderen Regionen kein signifikanter Unterschied. Der perirhinale Cortex (Baseline-Phase:  $60,7 \pm 25,8$  %; Interventionsphase:  $61,1 \pm 25,1$  %; Auswaschphase:  $62,6 \pm 25,7$  %), der temporale



Cortex (Baseline-Phase:  $55,8 \pm 13$  %; Interventionsphase:  $56,5 \pm 11,5$  %; Auswaschphase:  $59,2 \pm 12$  %), das Subiculum (Baseline-Phase:  $41,6 \pm 18,9$  %; Interventionsphase:  $43,3 \pm 12,6$  %; Auswaschphase  $38,9 \pm 12,1$  %).

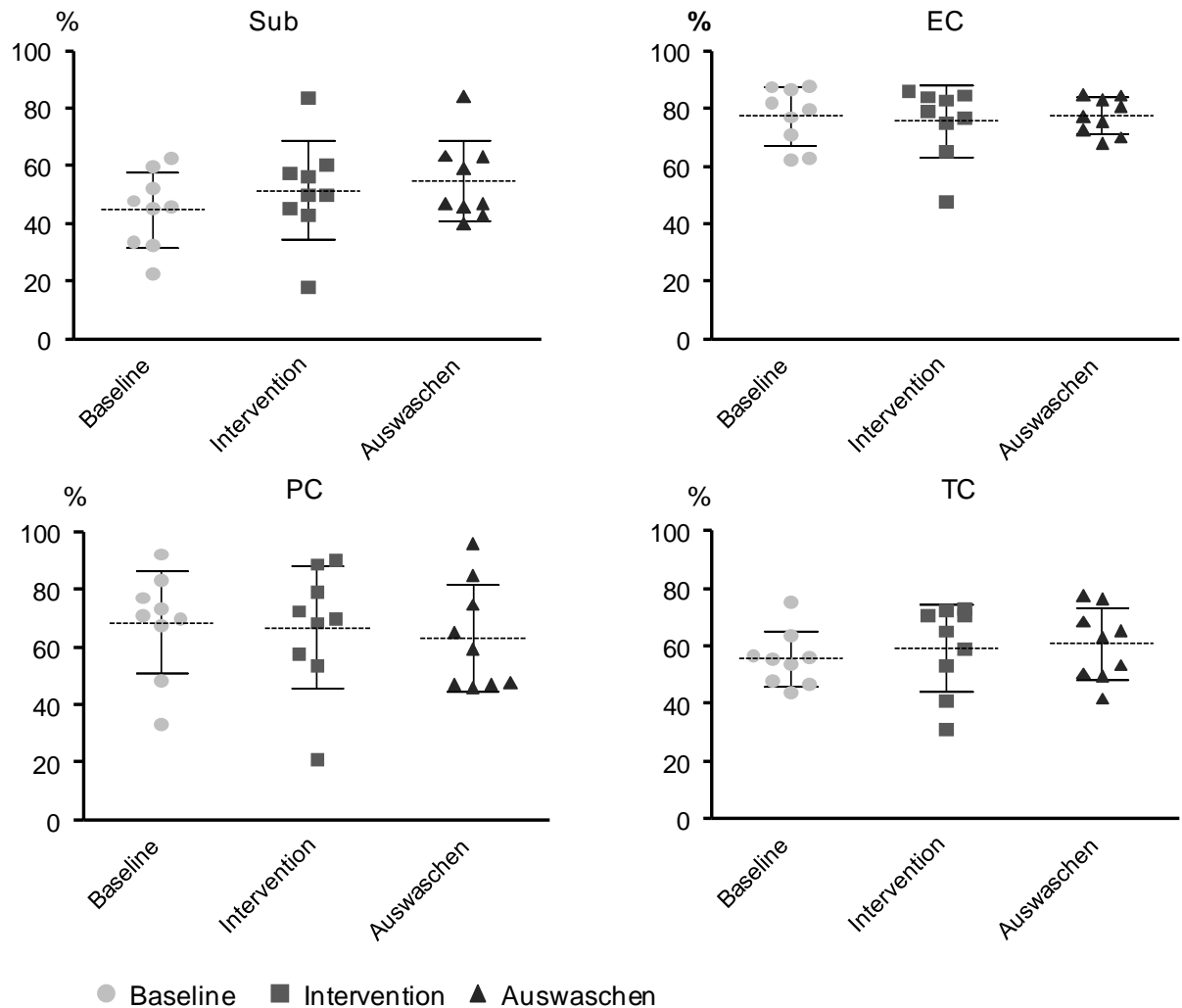


**Abbildung 23: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der Kontroll-Gruppe.**

Im entorhinalen Cortex (EC) zeigte sich prozentual die größte von epileptiformer Aktivität erfasste Fläche. Die anderen Regionen in abnehmender Reihenfolge sind perirhinaler Cortex (PC), temporaler Cortex (TC) und Subiculum (Sub).

In der 33 LEV-Gruppe haben sich in keiner der Phasen statistisch signifikante Unterschiede feststellen lassen. Der höchste Anteil der Hirnschnittoberfläche, die von der epileptiformen Aktivität erfasst wurde, war ebenfalls der entorhinale Cortex. (Baseline-Phase:  $77,6 \pm 10$  %; Interventionsphase:  $75,9 \pm 12,4$  %; Auswaschphase:  $77,7 \pm 6,3$  %) Der perirhinale Cortex (Baseline-Phase:  $68,5 \pm 17,8$  %, Interventionsphase:  $66,8 \pm 21,2$  %; Auswaschphase:  $63,2 \pm 18,6$  %), der temporale

Cortex (Baseline-Phase:  $55,6 \pm 9,5$  %; Interventionsphase:  $59,6 \pm 15,1$  %; Auswaschphase:  $60,8 \pm 12,6$  %), das Subiculum (Baseline-Phase:  $44,9 \pm 14,9$  %; Interventionsphase:  $51,7 \pm 17,4$  %; Auswaschphase:  $55 \pm 14,2$  %).

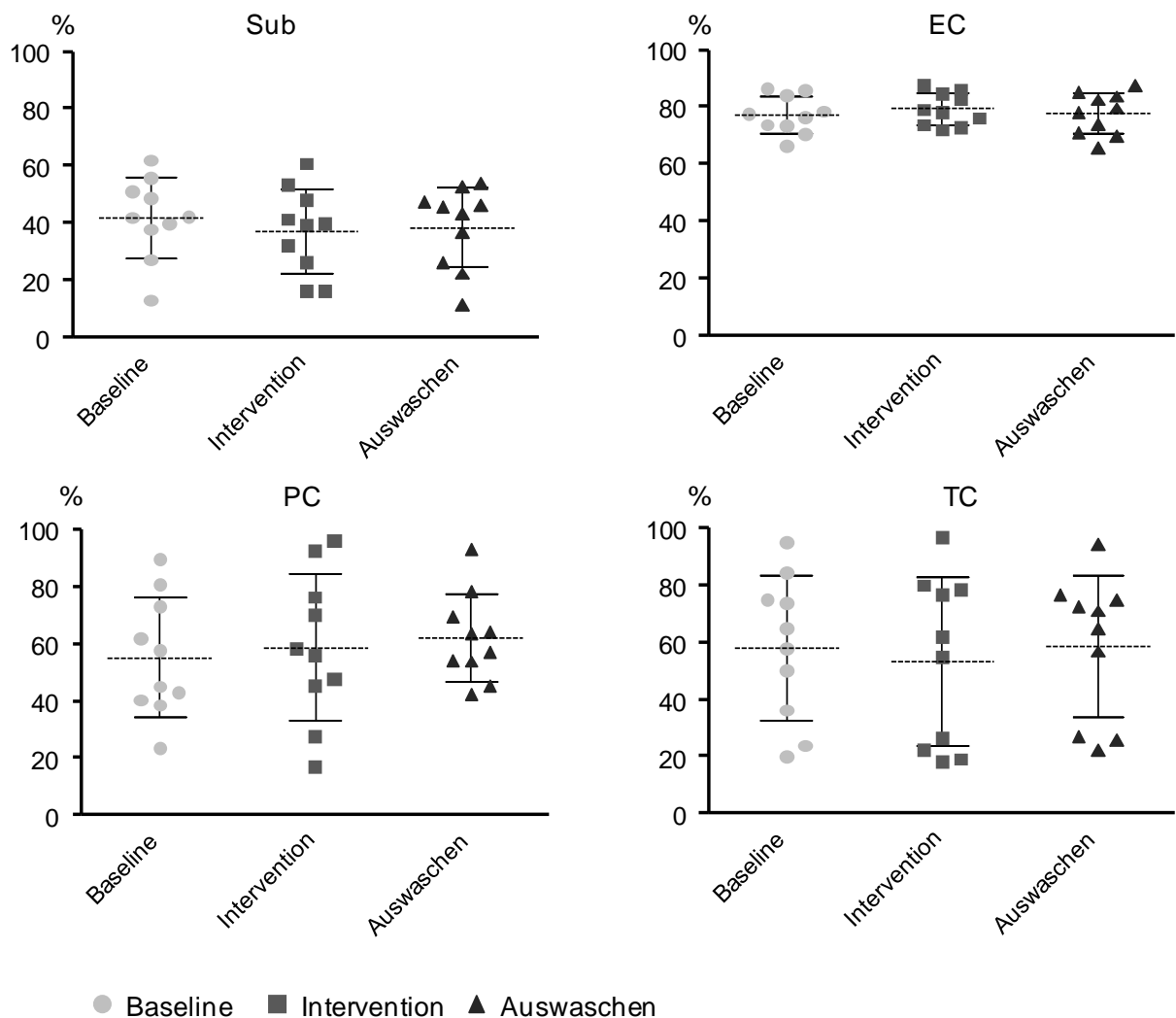


**Abbildung 24: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 33 LEV-Gruppe.**

In der 33 LEV-Gruppe hat sich bis auf kleine Unterschiede die gleiche Rangfolge absteigend gezeigt: Entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PC), temporaler Cortex (TC) und Subiculum (Sub).

In der 100 LEV-Gruppe zeigten sich ebenfalls in allen Phasen vergleichbare Werte, die sich voneinander nicht signifikant unterschieden. Entorhinaler Cortex (Baseline-Phase:  $77,3 \pm 6,7$  %; Interventionsphase:  $79,4 \pm 5,7$  %; Auswaschphase:  $77,9 \pm 7,4$  %), der perirhinale Cortex (Baseline-Phase:  $55,4 \pm 20,9$  %; Interventionsphase:  $58,8 \pm 25,7$  %; Auswaschphase:  $62,2 \pm 15,3$  %), der temporale Cortex (Baseline-Phase:  $58 \pm 25,2$  %; Interventionsphase:  $53,5 \pm 29,6$  %; Auswaschphase:  $58,6 \pm 25$  %; das Subiculum

(Baseline-Phase:  $42 \pm 14,2$  %; Interventionsphase:  $37,3 \pm 14,9$  %; Auswaschphase:  $38,7 \pm 14,2$  %).

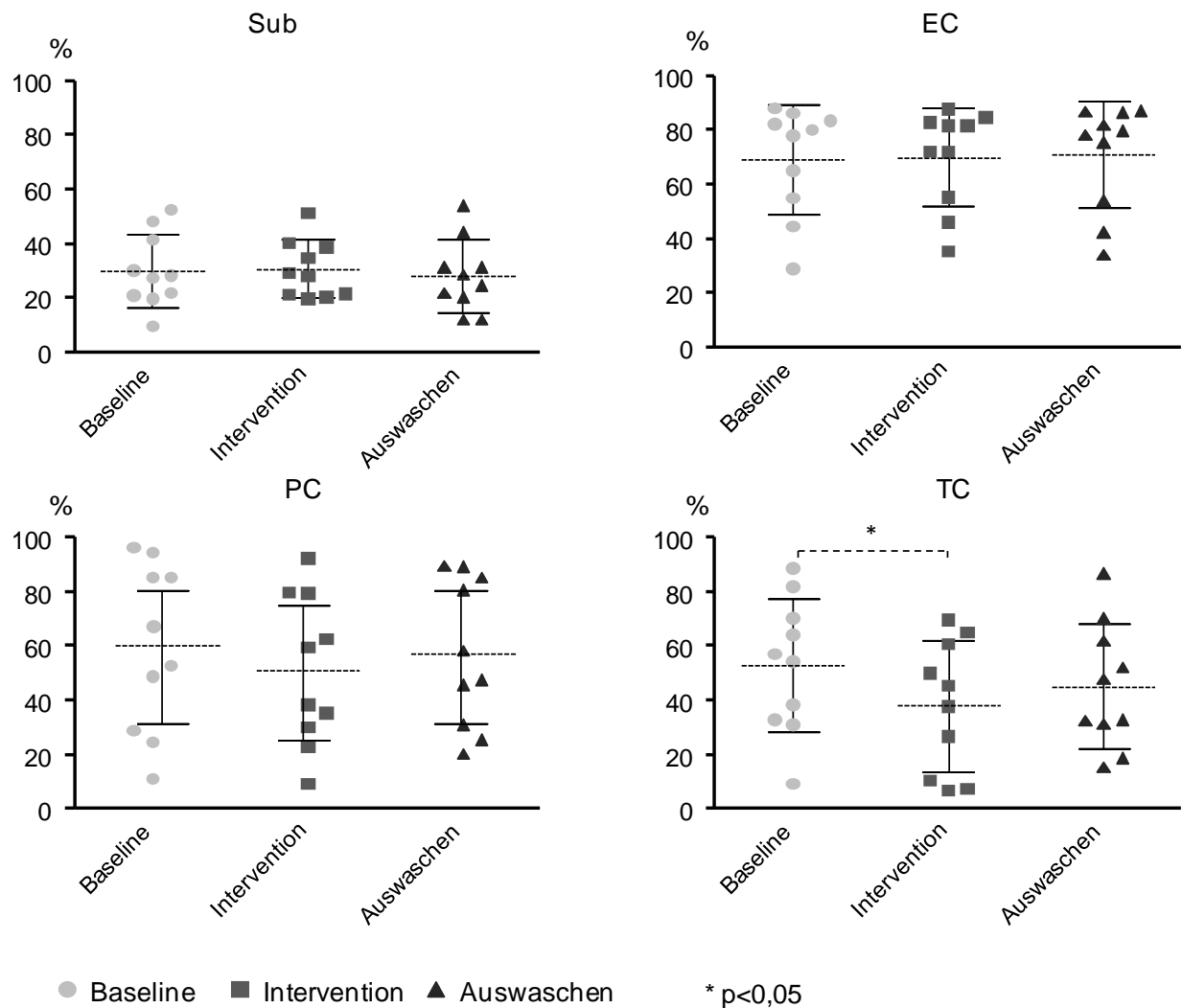


**Abbildung 25: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 100 LEV-Gruppe**

Es zeigte innerhalb der jeweiligen Gruppen ähnliche Werte, die sich voneinander nicht signifikant unterschieden haben. Entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PC), temporaler Cortex (TC) und Subiculum (Sub).

In der 300 LEV-Gruppe gab es im temporalen Cortex eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) der epileptiformen Aktivität zwischen der Baseline-Phase mit  $53,4 \pm 24,4$  %- und Interventionsphase mit  $37,8 \pm 24,3$  % (Auswaschphase:  $45,1 \pm 23,1$  %). In allen anderen Regionen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im Verlauf des Experiments beobachtet. Entorhinaler Cortex (Baseline-Phase:  $69,3 \pm 20,2$  %, Interventionsphase  $69,9 \pm 18,1$  %; Auswaschphase:  $70,8 \pm 19,7$  %), der perirhinale Cortex (Baseline-Phase:  $59,5 \pm 31$  %; Interventionsphase:  $51 \pm 27,8$  %;

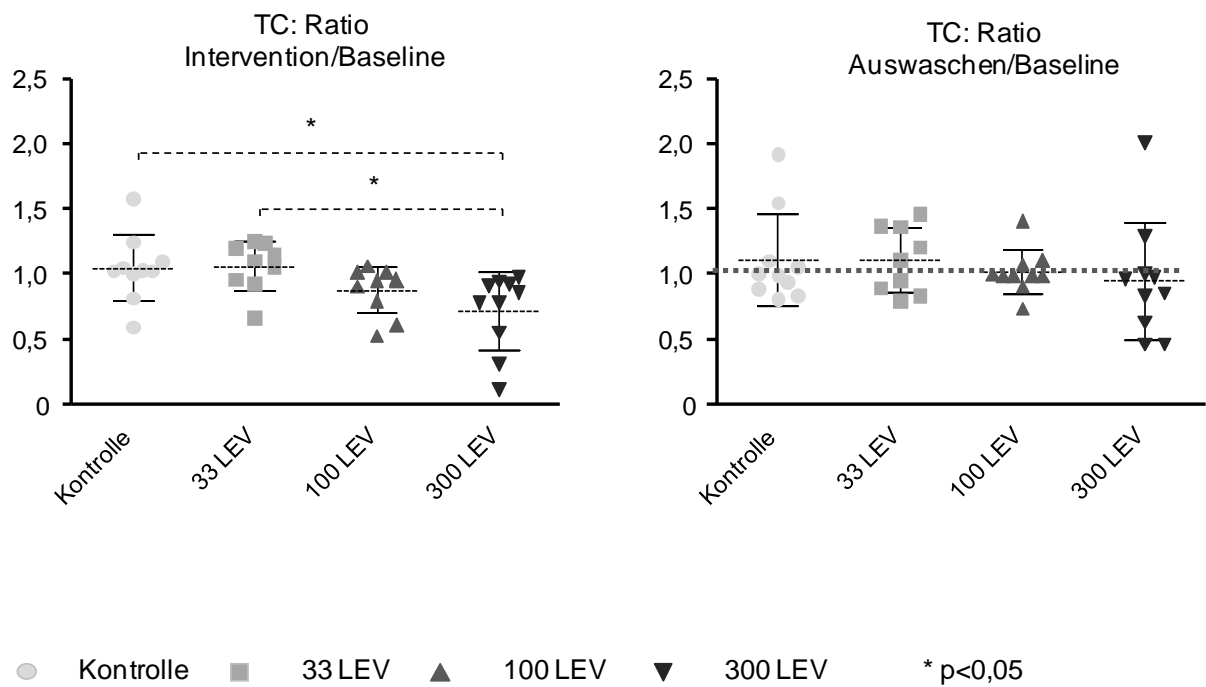
Auswaschphase  $57,4 \pm 27,3$  %), das Subiculum (Baseline-Phase:  $30,1 \pm 13,6$  %; Interventionsphase:  $30,6 \pm 10,7$  %; Auswaschphase:  $28,2 \pm 13,3$  %).



**Abbildung 26: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität in den Hirnregionen in der 300 LEV-Gruppe**

Es fand sich im temporalen Cortex (TC) eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) der epileptiformen Aktivität zwischen der Baseline- und Interventionsphase. Entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PC) und Subiculum (Sub).

Im Intergruppenvergleich unterschied sich bei der 300 LEV-Gruppe die Ratio von Intervention-/Baseline-Phase ( $0,7 \pm 0,2$ ) im temporalen Cortex sowohl von der 33 LEV-Gruppe ( $1,1 \pm 0,2$ ) als auch von der Kontroll-Gruppe ( $1,1 \pm 0,3$ ) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). In den anderen Regionen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Daten hier nicht dargestellt).



**Abbildung 27: Flächenanteil der epileptiformen Aktivität im temporalen Cortex in der 300 LEV-Gruppe im Intergruppenvergleich**

In der 300 LEV-Gruppe fand sich im Intergruppenvergleich eine statistisch signifikante Reduktion der epileptiformen Aktivität im temporalen Cortex.

## **6. DISKUSSION**

Epilepsien stellen eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen dar, die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter aufgrund erworbener, potenziell epileptogener Hirnläsionen an. Durch die demographische Altersentwicklung wird die Inzidenz und somit auch die Prävalenz von Epilepsien weiter zunehmen (69, 70). Daher ist es umso wichtiger, optimierte Therapiekonzepte mit antiepileptisch wirksamen Medikamenten zu entwickeln, die gar keine oder allenfalls geringe unerwünschte Wirkungen haben. Gerade neuere Antiepileptika sind besser verträglich als die älteren Substanzen. Die klinisch verfügbaren Antiepileptika können jedoch die Anfälle bei etwa 35% der Patienten mit Epilepsie nicht kontrollieren (18,19). Durch die Verbesserung der diagnostischen Methoden können mittlerweile vermehrt strukturelle Ursachen der Epilepsien nachgewiesen werden, sodass ein Teil der Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie epilepsiechirurgisch behandelt werden kann (71). Für diejenigen Patienten mit bislang pharmakoresistenter Epilepsie, die nicht für einen epilepsiechirurgischen Eingriff geeignet sind, ist die Entwicklung neuer antiepileptisch wirksamer Medikamente erforderlich, die idealerweise andere als die bisherigen Wirkmechanismen besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit eines der in der Praxis derzeit am häufigsten verwendeten antiepileptischen Medikamente, Levetiracetam (LEV), in einem *in vitro*-Modell untersucht. LEV moduliert das synaptische Vesikelprotein SV2A und hat somit einen anderen Wirkmechanismus als die anderen bis dahin verfügbare Antiepileptika.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse im Hinblick auf die Fragestellungen vorgestellt; danach sollen die eingesetzten Methoden kritisch erörtert und im wissenschaftlichen Kontext betrachtet werden. Zum Schluss soll die Übertragbarkeit der Ergebnisse einerseits auf die Klinik und andererseits die Perspektiven für die Zukunft diskutiert werden.

### **6.1. Einordnung der Ergebnisse**

#### **6.1.1. Elektrophysiologische Messungen**

Einer der wichtigsten elektrophysiologischen Parameter, anhand dessen die Wirksamkeit von LEV gemessen werden kann, ist die Frequenz der AEs. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass LEV dosisabhängig die Frequenz der AEs in einem etablierten *in vitro*-Modell reduziert. Dabei wurde zunächst der Einfluss von LEV in drei verschiedenen Dosierungen auf die Frequenz innerhalb einer Gruppe zwischen den definierten drei Phasen (Baseline-, Intervention-, und Auswaschphase)

verglichen (Intragruppenvergleich). In der Kontrollgruppe ohne LEV gab es keine Änderung der Frequenz der AEs, während in der 33-LEV-Gruppe eine knapp nicht signifikante ( $p < 0,1$ ) Reduktion der AE-Frequenz verzeichnet werden konnte. Es ergab sich erst in der 100 LEV-Gruppe und insbesondere in der 300 LEV-Gruppe eine signifikante Reduktion der Frequenz der AEs um 27 bzw. 32 %. Zudem fand sich ein statistisch signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied der Frequenzen der AEs zwischen der Interventions- und Auswaschphase, jedoch nicht zwischen der Baseline- und Auswaschphase, so dass die Effekte durch die Intervention mit LEV auf die Frequenz der AEs reversibel sind. Margineanu und Klitgaard haben ebenfalls *in vitro* im Hoch-Kalium-Epilepsiemodell mit niedrig konzentriertem Kalzium einen dosisabhängigen Effekt von LEV auf die epileptische Aktivität in der CA 3-Region des Hippocampus festgestellt (29). Hierbei reduzierten die Konzentrationen 32  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  LEV im vergleichbaren Maße signifikant die Anzahl der AEs während der Intervention mit 10  $\mu\text{M}$  LEV nur einen subsignifikanten Trend ( $p < 0,1$ ) zeigte. In der Studie von Madeja et al. führte 100  $\mu\text{M}$  LEV zu einer signifikanten Reduktion der Generierung epilepsietypischer Aktivität in der CA1-Region des Hippocampus. In höheren Konzentrationen bis zu 1000  $\mu\text{M}$  fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  (28). Im Vergleich zur vorliegenden Studie fand sich also in dieser Studie kein dosisabhängiger Effekt von LEV auf die epileptiforme Aktivität. Zudem zeigte sich in der Auswaschphase ein reversibler Effekt.

Im nächsten Schritt wurde im Intergruppenvergleich der Behandlungseffekt von LEV anhand der Ratio Interventions- vs. Baseline-Phase sowie Interventions- vs. Auswaschphase zwischen den drei LEV-Gruppen und der Kontroll-Gruppe betrachtet. Es zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der 300 LEV-Gruppe, während sich bei den 33- und 100 LEV-Gruppen keine signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe fanden. Die Frequenz der AEs wurde in ähnlichem Ausmaß reduziert wie in einer vergleichbaren Studie von Leniger et al. In dieser Studie wurde festgestellt, dass LEV im 4-AP-Modell die Frequenz von epileptiformen Entladungen und von Aktionspotenzialen in der CA3-Region des Hippocampus um 30-55 % reduziert (72).

Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurden in jener Untersuchung 50  $\mu\text{M}$  4-AP und LEV in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  verwendet. Es zeigte sich hierbei kein dosisabhängiger Effekt, zudem fand sich kein Einfluss auf die Amplitude der epileptiformen Entladungen und der Aktionspotenziale.

Als weitere elektrophysiologische Parameter wurden die Dauer und die Feldpotenzial-Amplitude der AEs gemessen, um die Effekte von LEV auf die Eigenschaften der AEs zu untersuchen. Hierbei fand sich im Intragruppenvergleich durch die Intervention von 300 LEV eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der Dauer und der Feldpotenzial-Amplitude sowohl zwischen der Baseline- und Interventionsphase als auch zwischen der Baseline- und Auswaschphase. Dies bedeutet, dass hierbei die Effekte von LEV in der Interventionsphase über diese hinaus reichten und noch in der Auswaschphase präsent waren. Dieser Überhangeffekt zeigte sich zudem auch im Intergruppenvergleich zwischen der Kontroll- und der 300 LEV-Gruppe. Es fand sich nämlich ein nicht reversibler Effekt durch LEV. Dieser Überhangeffekt fand sich in den vorherigen Studien nicht (23, 73, 37). In einer weiteren Arbeit von Pisani et al. konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dauer als auch die Feldpotenzial-Amplitude der AEs im *in vitro*-Epilepsiemodell mit reduzierter Magnesium-Konzentration und Zugabe von Bicucullin sowie 4-AP (500  $\mu\text{M}$ ) dosisabhängig reduziert werden, während die Frequenz der AEs nicht signifikant beeinflusst wird (37). In der Studie wurden 30  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  LEV Konzentrationen benutzt, wobei die maximale Reduktion unter 300  $\mu\text{M}$  LEV beobachtet wurde und die höheren Konzentrationen keinen zusätzlichen Effekt erbrachten. Eine weitere Studie von Meehan et al., die die Exzitabilität einzelner Neurone im Hirnschnittpräparat mit Hilfe intrazellulären Ableitungen untersucht hat, konnte zeigen, dass durch Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  LEV die Amplitude der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale signifikant reduziert wurde, dass also eine Abnahme der exzitatorischen Aktivität stattgefunden hat (73). Außerdem wurde in der Studie gezeigt, dass LEV die Neurotransmitterfreisetzung in Zeiträumen mit hochfrequenter Aktivität verringert. In einer anderen Studie von Gorji et al. wurden die antiepileptischen Effekte von LEV mit humanen neokortikalen Hirnschnitten untersucht, die im Rahmen der operativen Behandlung der pharmakoresistenten Epilepsie gewonnen wurden (74). LEV (in 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  Konzentrationen) hatte keinen Einfluss auf die Dauer, Amplitude und die Erscheinungshäufigkeit der spontan auftretenden epileptiformen Entladungen, genauso wie die durch Niedrig-Magnesium ausgelöste epileptiforme Aktivität. Es zeigte sich allerdings in derselben Studie eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Amplitude, Dauer und Frequenz durch die Intervention mit LEV (in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ), wenn die epileptiforme Aktivität durch Bicucullin ausgelöst wurde. Diese Studie bekräftigt erneut, dass die Effekte der Antiepileptika in verschiedenen Epilepsie-Modellen unterschiedlich aussehen.



Zusammenfassend können anhand der elektrophysiologischen Messungen die anfangs gestellten Fragestellungen wie folgt beantwortet werden: 1) Es kann bestätigt werden, dass LEV in der Lage ist, dosisabhängig (in 100  $\mu$ M und 300  $\mu$ M Konzentrationen) die Häufigkeit der AEs zu reduzieren, jedoch kann nicht bestätigt werden, dass LEV die AEs komplett unterdrücken kann. 2) Es konnte beobachtet werden, dass lediglich 300  $\mu$ M LEV sowohl die Dauer als auch die Amplitude der AEs signifikant reduzieren kann. Zudem fand sich hierbei ein Überhangeffekt von 300  $\mu$ M LEV, so dass trotz Auswaschen von LEV die Effekte auf die Amplitude und die Dauer - konträr zu bisherigen Studien - nicht reversibel waren.

Wie sich das Ausbreitungsmuster der epileptiformen Aktivität durch LEV - gemessen mit optischen Methoden - verhalten hat, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

### **6.1.2. Optische Messungen**

Während der Experimente wurden, parallel zu den elektrophysiologischen Messungen, die intrinsischen optischen Signale gemessen, anhand derer der Ort der Entstehung und die Wege der Ausbreitung von AEs bestimmt werden konnten. Dabei konnte bei allen AEs, die durch 4-AP ausgelöst wurden, eine Zunahme der Transmissionen (Zunahme der Lichtdurchlässigkeit) im Hirngewebe mit variabler räumlicher Ausdehnung beobachtet werden. Damit konnten die Effekte der LEV-Behandlung auf Entstehung und Ausbreitung der AEs räumlich sehr genau untersucht werden. Beide Parameter können auch klinisch von Bedeutung sein, da Antiepileptika mitunter die sekundäre Generalisierung von fokal beginnenden Anfällen verhindern können.

Die Transmissionszunahme während der AEs wurde in allen Gruppen in den anatomischen Regionen Subiculum, entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex gemessen. Sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in den drei LEV-Gruppen ergab sich in keiner der Regionen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Transmissionsänderung durch die Intervention mit LEV. Eine wichtige Erkenntnis war, dass in allen Gruppen die höchste Transmissionszunahme und häufigste Entstehung der AEs im entorhinalen Cortex und die geringste im Subiculum erfasst wurde. Dass der entorhinale Cortex bei der Entstehung von ictalen Entladungen eine primäre Rolle spielt, konnte schon in früheren Studien nachgewiesen werden. Damit ist gemeint, dass diese Region eine besonders niedrige Erregungsschwelle aufweist (75, 76, 77). Ein weiteres Indiz für die hohe Suszeptibilität dieser Region war, dass in der vorliegenden Studie in der Summe die meisten AEs ihren Ursprungsort im EC hatten. Es wurde diesbezüglich festgestellt, dass keine AEs im Hippocampus generiert wurden. Dafür gibt

es zwei Argumente: Erstens kann es sein, dass im Hippocampus aufgrund der „dentate gate-Theorie“ keine AEs entstehen. Diese Theorie besagt, dass der Gyrus dentatus im gesunden Gehirn die hippocampalen Schaltkreise vor Übererregung aus dem entorhinalen Cortex schützt (78). Zweitens besitzt das Hippocampusnetzwerk eine höhere Sensitivität gegenüber Hypoxie (79). Daher könnten die Hirnschnittpräparate nach der Präparation hypoxische Schäden erlitten haben, somit nicht vital genug gewesen sein.

In der vorliegenden Studie konnte LEV während der Experimente in keiner der Gruppen einen Einfluss auf die Verteilung der Ursprungsorte von AEs ausüben. Ein anderer wichtiger Parameter, der in der vorliegenden Arbeit herangezogen wurde, um die Auswirkung von LEV auf epileptische Aktivität zu untersuchen, war das Ausmaß der Ausbreitung von AEs innerhalb des Hirnschnittpräparats. Anhand des IOS war es möglich, die von der epileptiformen Aktivität betroffene Fläche innerhalb des gesamten Hirnschnittpräparats und auch in den einzelnen Hirnregionen zu quantifizieren. Hierbei fand sich in der 300 LEV-Gruppe eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der Fläche innerhalb des gesamten Hirnschnittpräparats durch die Intervention mit LEV, die von dem AE erfasst war. Beim Vergleich der Hirnregionen ergab sich wiederum in der 300 LEV-Gruppe im temporalen Cortex eine statistisch signifikante Reduktion der epileptiformen Aktivität während der Interventionsphase. Das bedeutet, dass 300  $\mu\text{M}$  LEV in der Lage waren, die Ausbreitung der epileptiformen Aktivität einzudämmen und somit z.B. eine sekundäre Generalisierung zu verhindern. Ein ähnliches Ergebnis fand sich in der *in vivo*-Studie von Ishimaru et al. mit Kindling-Modell sowie einem genetischen Epilepsie-Tiermodell. Hierbei wurde die antiepileptische Wirkung von LEV auf die klinischen und elektrographischen Anfälle evaluiert. Es wurde gezeigt, dass LEV die Latenz zur sekundären Generalisierung deutlich verlängert (80). In einer Arbeit von Dárcangelo et al. konnte mit Hilfe des intrinsischen optischen Signals gezeigt werden, dass LEV in den Hirnschnitten die von der epileptiformen Aktivität erfasste Fläche dosisabhängig (in Konzentrationen von 200 bis 500  $\mu\text{M}$  LEV) signifikant reduziert, wobei in dieser Studie ein genetisches Modell von Absence-Epilepsie mit IOS-Methoden verwendet wurde (81).

Zusammengefasst können folgenden Aussagen auf Basis der optischen Untersuchungen gemacht werden. In 300  $\mu\text{M}$  Konzentration reduziert LEV signifikant die von der epileptiformen Aktivität erfasste Fläche innerhalb des gesamten Hirnschnittpräparats. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere im temporalen Cortex

während der Intervention mit 300  $\mu$ M LEV. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LEV dosisabhängig die Ausdehnung der epileptiformen Aktivität begrenzt. Klinisches Korrelat für dieses Ergebnis könnte die Verhinderung einer sekundären Generalisierung fokaler Anfälle sein.

## **6.2. Methodenkritik**

Zur Bestimmung der antiepileptischen Aktivität von LEV wurde das kombinierte entorhinaler Cortex-Hippocampus-Präparat ausgewählt. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Präparat, das häufig *in vitro*-Studien mit akut symptomatischen Modellen angewendet wurde (75, 77, 82). Diese Studien ermöglichen der neurowissenschaftlichen Forschung folgende Vorteile: 1) stabile Aufzeichnungen für einen längeren Zeitraum im Stundenbereich; 2) die Fähigkeit, das extrazelluläre Milieu zu verändern; 3) direkte Anwendungen von bekannten Arzneimittelkonzentrationen auf das Hirngewebe. Ein großer Nachteil dieses Modells ist dagegen die Tatsache, dass die benachbarten Strukturen im limbischen System wie Amygdala oder Gyrus cinguli fehlen, die insbesondere in der Pathophysiologie von Temporallappenepilepsien eine wichtige Rolle spielen (83). Außerdem werden während des Präparationsvorgangs viele afferente und efferente Fasern von und zu den Nachbarregionen durchtrennt. Nichtsdestotrotz wurde durch die Messung von Feldpotenzialen vor Beginn der Einwaschung von 4-AP nachgewiesen, dass zwischen entorhinalem Cortex und Hippocampus die entorhinale Verbindung erhalten bleibt, sodass die Ausbreitung von epileptischer Aktivität zwischen hippocampalen und parahippocampalen Strukturen analysiert werden kann (84). Eine andere Limitation der vorliegenden Arbeit waren die möglichen hypoxischen Schädigungen auf die neuronalen Netzwerke im Hirnschnittpräparat, die durch die Präparation entstanden sind.

Nachdem das kombinierte entorhinale Cortex-Hippocampus-Präparat ausgewählt wurde, stellte sich die Frage, welches *in vitro*-Epilepsiemodell für die Fragestellungen geeignet ist. Dazu existieren verschiedene *in vitro*-Modelle, bei denen epileptiforme Aktivität chemisch induziert wird (zur Übersicht siehe 85). In der vorliegenden Arbeit wurde als Chemokonvulsivum der Kaliumkanal-Blocker 4-AP ausgewählt. Das zeitliche und räumliche Ausbreitungsverhalten epileptiformer Aktivität durch Auslösung von AEs durch 4-AP wurde bisher in mehreren Studien erfolgreich nachgewiesen (58, 59, 60, 86, 87). 4-AP hat eine ubiquitäre Wirkung auf zellulärer Ebene und beeinflusst sowohl die glutamaterge als auch die GABA-erge Transmitterfreisetzung (88). Ein Vorteil des 4-AP-Modells ist, die Auslösung einer Netzwerk-Synchronisation bei erhaltener GABAerger

Inhibition. Diese Synchronisation spielt in der Pathophysiologie eines epileptischen Anfalls eine wichtige Rolle (88). Fueta und Avoli et al. haben 1992 schon erfolgreich 4-AP als *in vitro*-Epilepsiemodell zur Überprüfung der Effekte der klassischen Antiepileptika (Carbamazepin, Valproat, Phenytoin und Phenobarbital) eingesetzt. In dieser Studie wurden lediglich elektrophysiologische Messungen durchgeführt (61). Ein anderes, seit langem verwendetes Epilepsiemodell ist das Niedrig-Magnesium-Modell, das für die vorliegende Studie in Frage kam. Bei diesem Modell induziert der niedrige Magnesiumgehalt in der Nährlösung epileptiforme Aktivität im Hirngewebe (75). Das Entblocken von exzitatorischen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren – transmembranären ionotropen Glutamatrezeptoren – durch den Entzug von Magnesium führt zur erhöhten synaptischen Erregung und damit zur Entstehung von epileptiformer Aktivität (89). In der Studie von Buchheim et al. wurden das Niedrig-Magnesium- und das 4-AP-Modelle verglichen und die folgenden Unterschiede festgestellt: Erstens war die relative Dauer der intrinsischen optischen Signalveränderungen im Niedrig-Magnesium-Modell signifikant länger als im 4-AP-Modell, obwohl die elektrophysiologische Dauer der AEs nicht signifikant unterschiedlich war. Zweitens wurde im 4-AP-Modell keine einheitliche Region des Anfallsbeginns oder Ausbreitungsmusters beobachtet, während AEs im Niedrig-Magnesium-Modell überwiegend im entorhinalen Cortex mit anschließender Ausbreitung zum Subiculum und zu neokortikalen Strukturen auftraten; letzteres deutet darauf hin, dass die Anfallsinitiation nicht auf eine bestimmte Region in diesem Modell beschränkt ist (86). Ein entscheidender Faktor für die Auswahl des 4-AP-Modells in der vorliegenden Studie war die unverändert anhaltende epileptiforme Aktivität, die – anders als beim Niedrig-Magnesium-Modell – nicht in Spätaktivität übergeht oder *spreading depressions* zeigt (90); durch diese könnte nämlich das Experiment nicht fortgeführt werden, da keine AEs mehr im weiteren Verlauf auftreten würden.

In den meisten experimentellen Studien zur Entstehung und Ausbreitung von epileptiformer Aktivität in Hirnschnittpräparaten werden ausschließlich elektrophysiologische Methoden angewandt. Dabei wird das Feldpotenzial als Summenpotenzial einer Gruppe von Neuronen auf der Netzwerkebene gemessen, wodurch zahlreiche Eigenschaften eines Netzwerks von Neuronen und deren Änderungen während neuronaler Erregung bestimmt werden können. Der größte Vorteil elektrophysiologischer Messungen ist die gute zeitliche Auflösung. Sogar sehr kurze Entladungen wie einzelne schnelle Aktionspotenziale von Mikrosekundendauer können

mit dieser Methode aufgezeichnet werden (75). In der vorliegenden Arbeit war es durch die elektrographische Ableitung möglich, das Feldpotenzial kontinuierlich zu messen. Der größte Nachteil elektrophysiologischer Messungen besteht in der geringen räumlichen Auflösung, aufgrund derer lediglich Informationen aus dem unmittelbaren Umfeld der Elektroden Spitze gesammelt werden können. Um größere Bereiche eines Hirnschnitts beurteilen zu können, müssen gegebenenfalls mehrere Elektroden verwendet werden, was das Gewebe und die Strukturen beschädigen kann. Untersuchungen zur Ausbreitung epileptischer Aktivität können dadurch maßgeblich behindert werden. Damit können keine ausreichenden Aussagen über den Ursprungsort eines AE gemacht werden. Also können AEs mit stationären Elektroden zwar lokal verlässlich aufgezeichnet werden, jedoch können über entfernt von der Elektroden Spitze liegende Anfallsursprungsorte und Ausbreitungswege keine Aussagen gemacht werden.

An dieser Stelle wurde das intrinsische optische Signal als ergänzende Messmethode genutzt, um die Problematik der räumlichen Auflösung zu überwinden. Damit können große Bereiche eines Hirnschnitts erfasst und der Ursprung, das Ausbreitungsmuster sowie das Ausmaß der betroffenen Fläche eines AE sichtbar gemacht und analysiert werden. Dabei ist die IOS-Methode im Gegensatz zu elektrophysiologischen Messungen mit Elektroden eine nicht-invasive Methode. Die gute räumliche Auflösung dieser Methode ist allerdings der zeitlichen Auflösung von elektrophysiologischen Messungen deutlich unterlegen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Kombination aus beiden Methoden verwendet, um die Nachteile der jeweils anderen Methode zu kompensieren.

### **6.3. Klinische Relevanz der Ergebnisse und Übertragbarkeit**

Die Ergebnisse der Tier-Experimente können nicht ohne weiteres auf die Klinik übertragen werden, da erhebliche Unterschiede zwischen Nagetieren und Menschen bestehen. Ratten benötigen beispielsweise im Vergleich zu Menschen höhere Dosierungen von Substanzen, um gleich hohe Spiegel zu erreichen, da sie das Pharmakon schneller aus dem Blutkreislauf eliminieren (91). Nichtsdestotrotz bieten die Modelle mit Ratten im Rahmen der Grundlagerecherche eine wichtige Möglichkeit zum Verständnis der Auswirkungen eines Pharmakons auf zellulärer Ebene. Die Eigenschaften des Hirngewebes von Ratten können nicht eins zu eins auf das menschliche Hirngewebe übertragen werden. Es bestehen jedoch viele Indizien, dass die AEs, die sich *in vitro* im entorhinalen Cortex generieren, ähnliche neurobiologische

Merkmale (Ablauf, Ionenverschiebungen und das Ausbreitungsverhalten in die umliegenden anatomischen Regionen) wie die des Menschen zeigen (92). Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass es sich bei der vorliegenden Studie um ein akut symptomatisches Modell handelt, sodass das aktuelle Modell nicht ohne Weiteres auf eine chronische Epilepsie bei Patienten übertragen werden kann. Das akut symptomatische Modell stellt jedoch eine Grundlage für die neurowissenschaftliche Forschung und speziell für elektrophysiologische Studien dar, die sich auf die grundlegenden Mechanismen der neuronalen Erregbarkeit konzentrieren (93).

Im klinischen Alltag gehört LEV zu den am häufigsten eingesetzten Antiepileptika (21). Da LEV nicht über die bisher üblichen Wirkprinzipien der klassischen Antiepileptika wirkt, stellt es in der Behandlung der Epilepsie eine wichtige Option dar. In den klinischen Studien zeigte LEV bei guter Verträglichkeit auch bei zuvor pharmakoresistenten Epilepsien gute Ergebnisse (94, 95). Es wurde zudem untersucht, ob LEV neurotoxische Effekte auf das sich entwickelnde Rattenhirn ausübt. In der Studie von Danthey et al. wurde selbst bei der höchsten Dosis von 100 mg/kg pro Körpergewicht keine signifikante Neurotoxizität festgestellt (96). Was Wechselwirkungen und pharmakokinetische Eigenschaften angeht, zeigt LEV gute Eigenschaften. Aufgrund der fehlenden Induktion von Cytochrom-P450 oder anderen Leberenzymen sowie einer schwachen Plasmaeiweißbindung zeigt LEV keine Wechselwirkungen mit anderen Antiepileptika, Marcumar oder oralen Kontrazeptiva. Es sollte jedoch bei schweren Leberfunktionsstörungen die Nierenfunktion überprüft und bei der Niereninsuffizienz die Dosis angepasst werden (97). Patsalos et al. zeigten in einer Meta-Analyse pharmakokinetischer Daten aus bisher durchgeführten Studien mit LEV bei Erwachsenen mit pharmakoresistenter Epilepsie, dass der Plasmaspiegel von LEV bei klinisch wirksamen Dosen 2 x 500 mg/d zwischen 35 und 100 µM und bei 2 x 1500 mg/d zwischen 94 und 265 µM variiert (98). Hinsichtlich der Pharmakokinetik wird LEV hauptsächlich über die Niere eliminiert, die durchschnittliche Eliminationshalbwertszeit beträgt zwischen 6 und 11 Stunden. Es wird nach perioraler Applikation fast vollständig resorbiert, und der maximale Plasmaspiegel wird circa 1,3 Stunden nach oraler Einnahme erreicht (98). Trotz hoher Wasserlöslichkeit kann es die Blut-Hirn-Schranke hinreichend überwinden, sodass die Konzentration im Liquor zwischen 90 und 97 % der Serumkonzentration entspricht (99). Außerdem wurde in derselben Studie dargestellt, dass die Liquor-Konzentration von LEV in Ratten bei einer Dosis von 20 mg pro kg Körpergewicht nach circa 60 Minuten die höchste

Konzentration von 106  $\mu\text{M}$ , bei einer Dosis von 40 mg pro kg Körpergewicht 160  $\mu\text{M}$  und bei einer Dosis von 80 mg pro kg Körpergewicht 513  $\mu\text{M}$  erreicht. Durch die beiden Studien können die Daten aus der vorliegenden Arbeit in einen direkten Bezug zur klinischen Situation gesetzt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Reduktion der Frequenz anfallsartiger Ereignisse *in vitro* lassen sich mit der klinischen Situation vergleichen. Die besten Ergebnisse wurden zwar in der 300 LEV-Gruppe erzielt, es ergibt sich jedoch die Frage, ob LEV beim Menschen eine Liquor-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  erreicht. Weniger gut waren die Ergebnisse in der 100 LEV-Gruppe, also 100  $\mu\text{M}$ , was wahrscheinlicher bei Menschen im Liquor erreicht wird. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von entsprechenden klinischen Studien. In fünf randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten Studien bei Erwachsenen und Kindern mit pharmakoresistenter Epilepsie wurde gezeigt, dass LEV als Zusatztherapie eine Responderrate (Reduktion der Anfallfrequenz um mehr als 50% im Vergleich zur Baseline) von 28 -45 % aufwies (100, 101, 102, 103, 104). Die Ergebnisse der optischen Messungen sind ebenfalls vereinbar mit der klinischen Situation. In den klinischen Studien wurde beobachtet, dass durch LEV die Anzahl der generalisierten tonisch-klonischen Anfälle deutlich gesunken ist, was die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinflusst (105, 106).

#### **6.4. Ausblick**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass LEV nicht nur ein bekanntermaßen klinisch gut wirksames Präparat ist, sondern auch im Tierexperiment ein wirksames Mittel gegen AEs unter *in vitro*- Bedingungen ist, obwohl LEV in den anfänglichen präklinischen Studien keine, beziehungsweise nur geringe Effekte auf die epileptischen Entladungen zeigte (24). Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sollten zukünftig weitere Untersuchungen mit anderen Antiepileptika erfolgen, um bestimmte Eigenschaften der Antiepileptika mit diesem Modell gezielt unter standardisierten Bedingungen zu testen und zu vergleichen. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass die Wirksamkeit eines Antiepileptikums eine klinische Größe ist, die nicht *in vitro*, sondern letztlich am Menschen getestet werden muss. *In vitro*-Studien können klinische Studien keinesfalls ersetzen. Das 4-AP-Modell könnte aber sehr gut als Screeningmodell für neue Substanzen dienen.

Obwohl seit den frühen 1990er Jahren verschiedene neue Antiepileptika entwickelt wurden, deuten die verfügbaren Daten darauf hin, dass sich zwar die Verträglichkeit der

Medikamente verbessert, die Wirksamkeit der medikamentösen Behandlung der Epilepsie jedoch nicht wesentlich verändert hat (107). Ein Grund dafür ist, dass – mit wenigen Ausnahmen - fast alle Antiepileptika durch die gleichen konventionellen Tiermodelle entdeckt wurden. Es wurden dadurch zwar neue Präparate entwickelt, aber offensichtlich haben diese nicht dazu beigetragen, den Anteil der Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie deutlich zu reduzieren. Daher sind neue Konzepte und ein Umdenken gefragt, um die Antiepileptika-Entdeckung und -Entwicklung zu verbessern und einen großen Schritt voranzubringen. Es müssten beispielweise Medikamente entwickelt werden, die spezifisch auf die zugrunde liegende Ursache wie z.B. genetische Veränderungen der spannungsabhängigen Membrankanäle abzielen. In Zukunft sollten darüber hinaus *in vitro*-Untersuchungen an menschlichem Gewebe, z.B. nach epilepsiechirurgischen Eingriffen, durchgeführt werden. Ziel ist ein besseres Verständnis der Pathophysiologie von Anfällen bzw. Epilepsien, speziell von Temporallappenepilepsien, um dadurch möglicherweise neue Therapieansätze für Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie zu entwickeln.

Abschließend sollte die Funktion des SV2A-Proteins weiter erforscht werden. Diesbezüglich wurde in den letzten Jahren ein Abkömmling von LEV, das Brivaracetam, entwickelt. Diese Substanz hat im Vergleich zu LEV eine höhere Affinität zum SV2A-Protein (108).



## 7. ANHANG

### 7.1. Literatur

1. [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/introduction\\_neuro\\_disorders\\_public\\_health\\_challenges.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/introduction_neuro_disorders_public_health_challenges.pdf) Abfrage 14.07.2018, World Health Organization: Neurological Disorders *public health challenges*
2. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, & Jetté N. Prevalence and incidence of epilepsy. A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017; 88.3: 296-303.
3. <http://www.izepilepsie.de/home/showdoc,id,387,aid,4163.html> Abfrage 01.07.2018, Pfäfflin Margarete: Epidemiologie der Epilepsien
4. Hesdorffer DC, Logroscino G, Benn EKT, Katri N, Cascino G, Hauser WA. Estimating risk for developing epilepsy. A population-based study in Rochester, Minnesota. *Neurology* 2011; 76.1: 23-27.
5. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Scheffer IE. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy. Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58.4: 522-530.
6. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Nordli DR. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58.4: 512-521.
7. Fisher RS. Redefining epilepsy. *Current opinion in neurology* 2015; 28.2: 130-135.
8. Téllez-Zenteno JF, Lizbeth HR. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment* 2012; Article ID 630853, 5 pages.
9. French JA. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 2007; 48. s1: 3-7.

10. Tatum IV WO. Mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology* 2012; 29.5: 356-365.
11. De Lanerolle NC, Tih-Shih L. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy." *Epilepsy & Behavior* 2005; 7.2: 190-203.
12. Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, Elger CE. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2007; 69.12: 1236-1244.
13. Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Cnaan A, Guerreiro C, Kälviäinen R, ILAE Subcommittee on AED Guidelines. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia* 2013; 54.3: 551-563.
14. Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 2011; 52.4: 657-678.
15. Hanaya R, Arita K. The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications. *Neurologia medico-chirurgica* 2016; 56.5 205.
16. Lee, SK. Old versus new: why do we need new antiepileptic drugs? *Journal of epilepsy research* 2014; 4.2: 39.
17. White, HS, Smith MD, Wilcox KS. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *International review of neurobiology* 2007; 81: 85-110.
18. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *New England Journal of Medicine* 2011; 365.10: 919-926.
19. Laxer KD, Trinka E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, Benbadis SR. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior* 2014; 37: 59-70.

20. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, French, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010; 51.6: 1069-1077.
21. Gollwitzer S, Kostev K, Hagge M, Lang J, Graf W, Hamer HM. Nonadherence to antiepileptic drugs in Germany A retrospective, population-based study. *Neurology* 2016; 87.5: 466-472.
22. <https://www.dgn.org/leitlinien/3410-030-041-erster-epileptischer-anfall-und-epilepsien-im-erwachsenenalter-2017> Abfrage 01.02.2018 Deutsche Gesellschaft für Neurologie *Leitlinien* für Diagnostik und Therapie in der Neurologie:
23. Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wülfert E. ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *European journal of pharmacology* 1992; 222.2-3: 193-203.
24. Löscher W, Hönack D. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *European journal of pharmacology* 1993; 232.2-3: 147-158.
25. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wülfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *European journal of pharmacology* 1998; 353.2: 191-206.
26. Klitgaard H. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia* 2001; 42. s4: 13-18.
27. Zona C, Niespodziany I, Marchetti C, Klitgaard H, Bernardi G, Margineanu DG. Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na<sup>+</sup> and T-type Ca<sup>2+</sup> currents. *Seizure* 2001; 10.4: 279-286.

28. Madeja M, Margineanu DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Klitgaard H, Speckmann, EJ. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 2003; 45.5: 661-671.
29. Margineanu DG, Klitgaard H. Inhibition of neuronal hypersynchrony in vitro differentiates levetiracetam from classical antiepileptic drugs. *Pharmacological Research* 2000; 42.4: 281-285.
30. Noyer M, Gillard M, Matagne A, Hénichart JP, Wülfert E. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *European journal of pharmacology* 1995; 286.2: 137-146.
31. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101.26: 9861-9866.
32. Kaminski RM, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel P, Kenda B, Klitgaard H. SV2A protein is a broad-spectrum anticonvulsant target: functional correlation between protein binding and seizure protection in models of both partial and generalized epilepsy. *Neuropharmacology* 2008; 54.4: 715-720.
33. Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993; 90.6: 2150-2154.
34. Vogl C, Tanifuji S, Danis B, Daniels V, Foerch P, Wolff C, Stephens GJ. Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release and calcium channel function at peripheral sympathetic synapses. *European Journal of Neuroscience* 2015; 41.4: 398-409.
35. Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. SV2A and SV2B function as redundant Ca<sup>2+</sup> regulators in neurotransmitter release. *Neuron* 1999; 24.4: 1003-1016.

36. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neuroscience letters* 2001; 306.1: 5-8.
37. Pisani A, Bonsi P, Martella G, De Persis C, Costa C, Pisani F, Calabresi P. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. *Epilepsia* 2004; 45.7: 719-728.
38. Lee CH, Lee CY, Tsai TS, Liou HH. PKA-mediated phosphorylation is a novel mechanism for levetiracetam, an antiepileptic drug, activating ROMK1 channels. *Biochemical pharmacology* 2008; 76.2: 225-235.
39. Rigo JM, Hans G, Nguyen L, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Klitgaard H. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *British journal of pharmacology* 2002; 136.5: 659-672.
40. Lee CY, Chen CC, Liou HH. Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. *British journal of pharmacology* 2009; 158.7: 1753-1762.
41. Gu J, Lynch BA, Anderson D, Klitgaard H, Lu S, Elashoff M, Löscher W. The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19.2: 334-345.
42. Hariri AR, Bookheimer SY, Mazziotta JC. Modulating emotional responses: effects of a neocortical network on the limbic system. *Neuroreport* 2000; 11.1: 43-48.
43. Johnston D, Amaral DG. Hippocampus. In G. M. Shepherd (Ed.), *the synaptic organization of the brain* 2004; 455-498.

44. Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie* 1934; 46: 113-177.
45. Eichenbaum H, Otto T, Cohen NC. The hippocampus—what does it do? *Behavioral and neural biology* 1992; 57.1: 2-36.
46. Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 911.1: 1-24.
47. Green JD. The hippocampus. *Physiological Reviews* 1964; 44.4: 561-608.
48. Spencer SS, Spencer DD. Entorhinal-Hippocampal Interactions in Medial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35.4: 721-727.
49. Barbarosie M, Avoli M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *The Journal of neuroscience* 1997; 17.23: 9308-9314.
50. Behr J, Gloveli T, Heinemann U. The perforant path projection from the medial entorhinal cortex layer III to the subiculum in the rat combined hippocampal–entorhinal cortex slice. *European Journal of Neuroscience* 1998; 10.3: 1011-1018.
51. Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Régis J, Ranjeva JP, Chauvel P. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 2005; 46.5: 677-687.
52. Dichter MA, Schwartzkroin PA, Heinemann U. The neurobiology of epilepsy. *Epilepsy: a comprehensive Textbook*; 1998: 126-278.
53. Avoli M, Jefferys JGR. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *Journal of neuroscience methods* 2016; 260: 26-32.

54. Polansky OE, Grassberger MA.  $\pi$ -Elektronenstruktur einiger Pyridine und Pyrimidine. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* 1963; 94.4: 662-671.
55. Stefoski D, Davis FA, Faut M, Schauf CL. 4-Aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 1987; 21.1: 71-77.
56. Galvan M, Grafe P, Bruggencate GT. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain research* 1982; 241.1: 75-86.
57. Buckle PJ, Haas HL. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *The Journal of Physiology* 1982; 326.1: 109-122.
58. Avoli M, Louvel J, Kurcewicz I, Pumain R, Barbarosie M. Extracellular free potassium and calcium during synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the juvenile rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 1996; 493.Pt 3: 707.
59. Morris ME, Obrocea GV, Avoli M. Extracellular K<sup>+</sup> accumulations and synchronous GABA-mediated potentials evoked by 4-aminopyridine in the adult rat hippocampus. *Experimental brain research* 1996; 109.1: 71-82.
60. Avoli M, Marco de Curtis. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Progress in neurobiology* 2011; 95.2: 104-132.
61. Fueta Y, Avoli M. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy research* 1992; 12.3: 207-215.
62. Brückner C, Heinemann U. Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex–hippocampal slices. *Brain research* 2000; 859.1: 15-20.

63. Sitges M, Aldana BI, Charles Reed R. Effect of the Anti-depressant Sertraline, the Novel Anti-seizure Drug Vinpocetine and Several Conventional Antiepileptic Drugs on the Epileptiform EEG Activity Induced by 4-Aminopyridine. *Neurochemical research* 2016; 41.6: 1365-1374.
64. Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 1986; 324.6095: 361-364.
65. Grinvald A, Frostig RD, Lieke EDMUND, Hildesheim RINA. Optical imaging of neuronal activity. *Physiological reviews* 1988; 68.4: 1285-1366.
66. D'Arcangelo G, Tancredi V, Avoli M. Intrinsic optical signals and electrographic seizures in the rat limbic system. *Neurobiology of disease* 2001; 8.6: 993-1005.
67. Holtkamp M, Buchheim K, Siegmund H, Meierkord H. Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro. *Neurobiology of aging* 2003; 24.2: 345-353.
68. Buchheim K, Wessel O, Siegmund H, Schuchmann S, Meierkord H. Processes and components participating in the generation of intrinsic optical signal changes in vitro. *European Journal of Neuroscience* 2005; 22.1: 125-132.
69. Stefan H, May TW, Pfäfflin M, Brandt C, Füratsch N, Schmitz B, Karakizlis C. Epilepsy in the elderly: comparing clinical characteristics with younger patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 2014; 129.5: 283-293.
70. Poonam N, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy—a review. *Epilepsy research* 2009; 85.1: 31-45.
71. Jetté N, Sander JW, Keezer MR. Surgical treatment for epilepsy: the potential gap between evidence and practice. *The Lancet Neurology* 2016; 15.9: 982-994.



72. Leniger T, Thöne J, Bonnet U, Hufnagel A, Bingmann D, Wiemann M. Levetiracetam inhibits Na<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange of adult hippocampal CA3 neurons from guinea-pigs. *British journal of pharmacology* 2004; 142.7: 1073-1080.
73. Meehan AL, Yang X, Yuan LL, Rothman SM. Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission." *Epilepsia* 2012; 53.3: 469-476.
74. Gorji A, Höhling JM, Madeja M, Straub H, Köhling R, Tuxhorn I, Lahl R. Effect of levetiracetam on epileptiform discharges in human neocortical slices. *Epilepsia* 2002; 43.12: 1480-1487.
75. Dreier JP, Heinemann U. Regional and time dependent variations of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Experimental brain research* 1991; 87.3: 581-596.
76. Berretta N, Ledonne A, Mango D, Bernardi G, Mercuri NB. Hippocampus versus entorhinal cortex decoupling by an NR2 subunit-specific block of NMDA receptors in a rat in vitro model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53.5: e80-e84.
77. Weissinger F, Buchheim K, Siegmund H, Heinemann U, Meierkord H. Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiology of disease* 2000; 7.4: 286-298.
78. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Bui A, Lew S, Oijala M, Soltesz I. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *The Journal of physiology* 2015; 593.10: 2379-2388.
79. Müller M, Somjen GG. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations, extra-and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology* 2000; 83.2: 735-745.

80. Ishimaru Y, Chiba S, Serikawa T, Sasa M, Inaba H, Tamura, Y, Yamaguchi K. Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats. *Brain research* 2010; 1309: 104-109.
81. D'arcangelo G, D'antuono M, Tancredi V, Avoli M. Neocortical hyperexcitability in a genetic model of absence seizures and its reduction by levetiracetam. *Epilepsia* 2006; 47.7: 1144-1152.
82. Walther H, Lambert JDC, Jones RSG, Heinemann U, Hamon B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neuroscience letters* 1986; 69.2: 156-161.
83. Barbarosie M, Avoli M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures." *Journal of Neuroscience* 1997; 17.23: 9308-9314.
84. Empson RM, Heinemann U. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *The Journal of physiology* 1995; 484.3: 707-720.
85. Avoli M, Jefferys JGR. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *Journal of neuroscience methods* 2016; 260: 26-32.
86. Buchheim K, Schuchmann S, Siegmund H, Weissinger F, Heinemann U, Meierkord, H. Comparison of Intrinsic Optical Signals Associated with Low Mg<sup>2+</sup>–and 4-Aminopyridine–Induced Seizure-Like Events Reveals Characteristic Features in Adult Rat Limbic System. *Epilepsia* 2000; 41.6: 635-641.
87. Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, Tancredi V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in neurobiology* 2002; 68.3: 167-207

88. Gonzalez-Sulser A, Wang J, Motamedi GK, Avoli M, Vicini S, Dzakpasu R. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array. *Neuropharmacology* 2011; 60.7: 1142-1153.
89. Mody I, Heinemann U. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature* 1987; 326.6114: 701-704.
90. Treiman, D. M. "Experimental models of status epilepticus." *Epilepsy: a comprehensive textbook* 1998; 443-455.
91. Löscher W. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48.7: 1245-1258.
92. Gloveli T, Albrecht D, Heinemann U. Properties of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Developmental brain research* 1995; 87.2: 145-152.
93. Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research* 1971; 13.2: 222-238.
94. Tan MJ, Appleton RE. Efficacy and tolerability of levetiracetam in children aged 10 years and younger: a clinical experience. *Seizure-European Journal of Epilepsy* 2004; 13.3: 142-145.
95. Khurana DS, Khurana DS, Kothare SV, Valencia I, Melvin JJ, Legido A. Levetiracetam monotherapy in children with epilepsy. *Pediatric neurology* 2007; 36.4: 227-230.
96. Manthey D, Asimiadou S, Stefovaska V, Kaindl AM, Fassbender J, Ikonomidou C, Bittigau P. Sulthiame but not levetiracetam exerts neurotoxic effect in the developing rat brain. *Experimental neurology* 2005; 193.2: 497-503.
97. UCB, S.A., Keppra - Fachinformation. Juli 2008.

98. Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clinical pharmacokinetics* 2004; 43.11: 707-724.
99. Doheny HC, Ratnaraj N, Whittington MA, Jefferys JGR, Patsalos PN. Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy research* 1999; 34.2: 161-168.
100. Ben-Menachem E, Falter U. Efficacy and Tolerability of Levetiracetam 3000 mg/d in Patients with Refractory Partial Seizures: A Multicenter, Double-Blind, Responder-Selected Study Evaluating Monotherapy. *Epilepsia* 2000; 41.10: 1276-1283.
101. Cereghino JJ, Biton V, Abou-Khalil B, Dreifuss F, Gauer LJ, Leppik I, United States Levetiracetam Study Group. Levetiracetam for partial seizures results of a double-blind, randomized clinical trial. *Neurology* 2000; 55.2: 236-242.
102. Shorvon SD, Löwenthal A, Janz D, Bielen E, Loiseau P. Multicenter Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Levetiracetam as Add-On Therapy in Patients with Refractory Partial Seizures. *Epilepsia* 2000; 41.9: 1179-1186.
103. Glauser TA, Ayala R, Elterman RD, Mitchell WG, Van Orman CB, Gauer LJ, N159 Study Group. Double-blind placebo-controlled trial of adjunctive levetiracetam in pediatric partial seizures. *Neurology* 2006; 66.11: 1654-1660.
104. Tsai JJ, Yen DJ, Hsieh MS, Chen SS, Hiersemenzel R, Edrich P, Lai CW. Efficacy and Safety of Levetiracetam (up to 2000 mg/day) in Taiwanese Patients with Refractory Partial Seizures: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. *Epilepsia* 2006; 47.1: 72-81.
105. Klitgaard H, Pitkänen A. Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. *Epileptic disorders* 2003; 5.1: 9-16.

106. Leppik IE, Biton V, Sander JW, Wieser HG. Levetiracetam and Partial Seizure Subtypes: Pooled Data from Three Randomized, Placebo-controlled Trials. *Epilepsia* 2003; 44.12: 1585-1587.
107. Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 2011; 52.4: 657-678.
108. Matagne A, Margineanu DG, Kenda B, Michel P, Klitgaard H. Anti-convulsive and anti-epileptic properties of brivaracetam (ucb 34714), a high-affinity ligand for the synaptic vesicle protein, SV2A. *British journal of pharmacology* 2008; 154.8: 1662-1671.

## 7.2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ramazan Dag, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Levetiracetam auf die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität im limbischen Cortex“ 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.“

Berlin, den 27.09.2018

Ramazan Dag

### **7.3. Lebenslauf**

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

#### 7.4. Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Martin Holtkamp für die Überlassung des Themas, seine kritischen Anmerkungen zum theoretischen Teil der Arbeit, Anregungen zur Gestaltung der Dissertation und die Beratung in klinischen Fragen.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Florian Weissinger für seine kompetente Betreuung während der experimentellen und theoretischen Arbeitsphasen, für die interessanten Diskussionen, für die Unterstützung bei der Bewerbung um finanzielle Förderung und die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. med. Pawel Fidzinski und Dr. med. Matthias Wawra für die Unterstützung in der Datenauswertung und in allen Fragen der Computertechnik. Allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische und experimentelle Epileptologie an der Charité - Universitätsmedizin Berlin möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung unterschiedlicher Fragen bzgl. meiner Dissertation danken. Außerdem danke ich Herrn Clemens Reiffurth für die Anleitung zu technischen Aspekten der elektrophysiologischen Messungen *in vitro*.

Weiterhin bedanke ich mich bei Hanno Heuzeroth für viele gemeinsame Stunden im Labor der AG Epileptologie, in denen wir uns immer wieder gegenseitig ermutigt haben, durchzuhalten.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Verlobten Duygu (Cerem) Celik und meiner Familie dafür, dass sie mir während meines gesamten Medizinstudiums und der Doktorarbeit in schwierigen Phasen seelisch und moralisch Beistand geleistet haben.

Ramazan Dag