

Aus dem Charité Centrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und
Psychiatrie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss neuer Antikonvulsiva auf epileptiforme Aktivität– eine *in vitro* Studie unter Einsatz elektrophysiologischer und intrinsisch optischer Methoden

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Hanno Lothar Heuzeroth
aus Paderborn

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ABSTRAKT.....	9
1.1 DEUTSCH	9
1.2 ENGLISCH.....	11
2 EINLEITUNG.....	13
2.1 EPILEPTISCHE ANFÄLLE UND EPILEPSIE	13
2.1.1 Überblick.....	13
2.1.2 Epileptischer Anfall	13
2.1.3 Epilepsie	14
2.1.4 Epidemiologie	14
2.1.5 Therapie.....	15
2.2 ANTIKONVULSIVA	15
2.2.1 Geschichte und Entwicklung.....	15
2.2.2 Tiermodelle in der Entwicklung von Antikonvulsiva.....	16
2.2.3 Neuartige Antikonvulsiva	18
2.2.4 Lacosamid (LAC).....	19
2.2.5 Zonisamid (ZNS).....	20
2.3 EXPERIMENTELLE EPILEPTOLOGIE.....	21
2.3.1 Kombinierte Hirnschnitte in vitro	21
2.3.2 4-Aminopyridin-Modell.....	22
2.4 DIE HIPPOCAMPUSFORMATION.....	24
2.4.1 Anatomie und Physiologie	24
2.4.2 Pathologie und Pathophysiologie	27
2.5 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	28
3 METHODIK.....	30
3.1 VERSUCHSTIERE.....	30
3.2 PRÄPARATION DER AKUTEN HIRNSCHNITTE	30
3.3 AUFBAU DER AUFBEWAHRUNGS- UND MESSKAMMER.....	32
3.4 PERFUSIONSLÖSUNGEN.....	34
3.5 VERSUCHSPROTOKOLL.....	35
3.6 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSINSTRUMENTE	36

3.6.1	Messelektrode	36
3.6.2	Stimulationselektrode	36
3.6.3	Viabilitätsprüfung	37
3.7	MESSUNG.....	38
3.7.1	Elektrophysiologische Messung	38
3.7.2	Intrinsisch optische Messung.....	39
3.8	DATENERFASSUNG UND ANALYSE	41
3.8.1	Elektrophysiologische Daten	41
3.8.1.1	Identifizierung anfallsartiger Ereignisse mit Matlab	41
3.8.1.2	Frequenz und Dauer des anfallartigen Ereignisses.....	42
3.8.1.3	Amplitude.....	42
3.8.1.4	Tonische Phase	42
3.8.2	Intrinsisch optische Daten.....	47
3.8.2.1	Ursprungsort.....	47
3.8.2.2	Maximale Transmissionsänderung	47
3.8.2.3	Ausbreitungsgrad.....	48
3.9	STATISTIK UND DATENPRÄSENTATION.....	49
3.10	EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	50
4	ERGEBNISSE.....	51
4.1	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE PARAMETER	53
4.1.1	Frequenz der anfallsartigen Ereignisse	53
4.1.2	Responder-Rate	57
4.1.3	Dauer der anfallsartigen Ereignisse.....	58
4.1.4	Amplitude der anfallsartigen Ereignisse	62
4.1.5	Absolute und relative Dauer der tonischen Phase der anfallsartigen Ereignisse.....	64
4.2	INTRINSISCH OPTISCHE PARAMETER.....	70
4.2.1	Ursprungsregion	70
4.2.2	Anzahl involvierter Regionen.....	71
4.2.3	Ausbreitungsgrad.....	72
4.2.4	Maximale Transmissionsänderung	77
5	DISKUSSION	84
5.1	KONTEXT DER VORLIEGENDEN ARBEIT AUS KLINISCHER SICHT - GRUNDSÄTZLICHE ÜBERLEGUNG	84
5.2	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	84
5.3	BEWERTUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN ERGEBNISSE	85

5.3.1	AE-Frequenz.....	85
5.3.2	Responder-Rate	87
5.3.3	AE-Dauer	89
5.3.4	AE-Amplitude.....	90
5.3.5	Absolute und relative Dauer der tonischen Phase.....	91
5.4	BEWERTUNG DER INTRINSISCH OPTISCHEN ERGEBNISSE.....	92
5.4.1	Ursprungsregion	92
5.4.2	Anzahl involvierter Regionen	93
5.4.3	Ausbreitungsgrad.....	94
5.4.4	Maximale Transmissionsänderung	94
5.5	LIMITATIONEN (BEWERTUNG DER MATERIALIEN UND METHODIK)	95
5.5.1	Versuchsprotokoll, Teststärke	95
5.5.2	4-Aminopyridin-Modell im Vergleich mit dem Niedrig-Magnesium-Modell	96
5.5.3	Kombinierte hippocampal-entorhinale Hirnschnitte	97
5.5.4	Interface-Bedingungen	98
5.5.5	Elektrophysiologische Messungen	99
5.5.6	Optische Messungen	100
5.6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	101
6	ANHANG.....	103
6.1	LITERATURVERZEICHNIS	103
6.2	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	118
6.3	ANTEILSERKLÄRUNG	119
6.4	LEBENS LAUF.....	120
6.5	WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	121
6.6	DANKSAGUNG	122

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNGEN EINES GEHIRNS UND HIPPOCAMPUS DER RATTE	25
ABBILDUNG 3-1: VERSUCHSAUFBAU	33
ABBILDUNG 3-2: VERSUCHSPROTOKOLL	36
ABBILDUNG 3-3: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUFNAHME EINER STIMULATION ZUR GÜTEKONTROLLE	38
ABBILDUNG 3-4: KOMBINIERTER HIPPOCAMPAL-ENTORHINALER HIRNSCHNITT.....	39
ABBILDUNG 3-5: UNTERTEILUNG EINES ELEKTROPHYSIOLOGISCH AUFGEZEICHNETEN AE	43
ABBILDUNG 3-6: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: GLÄTTUNG EINER 3-STÜNDIGEN AUFZEICHNUNG.....	43
ABBILDUNG 3-7: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: AE-DETEKTION.	44
ABBILDUNG 3-8: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: ISOLIERTES AE	44
ABBILDUNG 3-9: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: AE-START UND -AMPLITUDEN-DETEKTION	45
ABBILDUNG 3-10: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: AE-ENDPUNKT-DETEKTION	45
ABBILDUNG 3-11: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: SPIKE-DETEKTION	46
ABBILDUNG 3-12: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUSWERTUNG: DETEKTION DER TONISCHEN PHASE.....	46
ABBILDUNG 3-13: FARBKODIERTES, INTRINSISCH OPTISCHES SIGNAL WÄHREND EINES AE	48
ABBILDUNG 4-1: FLOWCHART DER EXPERIMENTE MIT EIN- UND AUSSCHLÜSSEN.....	52
ABBILDUNG 4-2: AE-FREQUENZ: KONTROLLGRUPPE	54
ABBILDUNG 4-3: AE-FREQUENZ: MEDIKAMENTENGRUPPEN.....	55
ABBILDUNG 4-4: BEISPIELHAFTE ELEKTROPHYSIOLOGISCHE AUFZEICHNUNG VON KONTROLL- UND MEDIKAMENTENGRUPPEN	56
ABBILDUNG 4-5: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: AE-FREQUENZ	57
ABBILDUNG 4-6: RESPONDER-RATE	58
ABBILDUNG 4-7: AE-DAUER: KONTROLL- UND MEDIKAMENTENGRUPPEN	60
ABBILDUNG 4-8: AE-DAUER: LAC 100 μ M, ZNS 300 μ M	61
ABBILDUNG 4-9: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: AE-DAUER	61
ABBILDUNG 4-10: AE-AMPLITUDE: KONTROLL- UND MEDIKAMENTENGRUPPEN	63
ABBILDUNG 4-11: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: AE-AMPLITUDE.....	64

ABBILDUNG 4-12: EFFEKT VON LACOSAMID AUF DIE TONISCHE PHASE ANHAND VON BEISPIEL- AE	66
ABBILDUNG 4-13: ABSOLUTE DAUER DER TONISCHEN PHASE: KONTROLL- UND MEDIKAMENTENGRUPPEN	67
ABBILDUNG 4-14: ABSOLUTE DAUER DER TONISCHEN PHASE: LAC 100 μ M, ZNS 300 μ M	68
ABBILDUNG 4-15: RELATIVE DAUER DER TONISCHEN PHASE: KONTROLLGRUPPE, LAC 33 μ M	68
ABBILDUNG 4-16: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: ABSOLUTE DAUER DER TONISCHEN PHASE	69
ABBILDUNG 4-17: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: RELATIVE DAUER DER TONISCHEN PHASE	69
ABBILDUNG 4-18: ZWEI FOTOSTRECKEN VON AE MIT DEN AM HÄUFIGSTEN BEOBACHTETEN URSPRUNGSREGIONEN	71
ABBILDUNG 4-19: AUSBREITUNGSGRAD DER GESAMTFLÄCHE: KONTROLLGRUPPE	73
ABBILDUNG 4-20: AUSBREITUNGSGRAD DER GESAMTFLÄCHE: MEDIKAMENTENGRUPPEN	74
ABBILDUNG 4-21: AUSBREITUNGSGRAD DER ANATOMISCHEN REGIONEN: LAC 33 μ M	75
ABBILDUNG 4-22: AUSBREITUNGSGRAD IM SUBICULUM: ZNS 33/100 μ M , LAC 10/33 μ M.....	76
ABBILDUNG 4-23: AUSBREITUNGSGRAD IM SUBICULUM: LAC 100 μ M, ZNS 300 μ M.....	76
ABBILDUNG 4-24: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: AUSBREITUNGSGRAD	77
ABBILDUNG 4-25: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG: KONTROLLGRUPPE	80
ABBILDUNG 4-26: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG IM SUB: LAC 10 μ M.....	80
ABBILDUNG 4-27: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG: LAC 33 μ M.....	81
ABBILDUNG 4-28: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG IM SUB: ZNS 100 μ M	81
ABBILDUNG 4-29: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG IM SUB: LAC 100 μ M, ZNS 300 μ M	82
ABBILDUNG 4-30: EFFEKTSTÄRKE IM INTERGRUPPENVERGLEICH: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG	82
ABBILDUNG 4-31: TRANSMISSIONSÄNDERUNG MITTELS FARBKODIERUNG FÜR LAC 33 μ M. ...	83
ABBILDUNG 4-32: VERLAUF DER TRANSMISSIONSÄNDERUNG: BASELINE UND INTERVENTION FÜR LAC 33 μ M	83

Tabellenverzeichnis

TABELLE 3-1: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN LÖSUNGEN	35
TABELLE 4-1: HÄUFIGKEITEN DER URSPRUNGSREGIONEN	71
TABELLE 4-2: ANZAHL DER INVOLVIERTEN REGIONEN	72
TABELLE 4-3: MAXIMALE TRANSMISSIONSÄNDERUNG DER ANATOMISCHEN REGIONEN FÜR DIE KONTROLLGRUPPE	79

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
ACSF	künstlicher Liquor (engl. artificial cerebrospinal fluid)
AE	anfallsartiges Ereignis
AED	Antikonvulsivum (engl. antiepileptic drug)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
CA	Cornu ammonis
EC	entorhinaler Cortex
EEG	Elektroenzephalogramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
IOS	intrinsisch optisches Signal
LAC	Lacosamid
max Δ T/T	maximale Transmissionsänderung
MES-Modell	Maximal-Elektroschock-Anfallsmodell
n.b.	nicht zu berechnen
oneANOVA	einfache Varianzanalyse (engl. one-way ANOVA)
p	p-Wert/Signifikanzwert
PRh	perirhinaler Cortex
PTZ-Modell	Pentylentetrazol-Modell
repANOVA	einfache Varianzanalyse für wiederholte Messungen (engl. one-way ANOVA for repeated measurements)
s.c.	subkutan
Sub	Subiculum
TC	temporaler Cortex
ZNS	Zonisamid

Teile dieser Arbeit mitsamt ihren Abbildungen und Tabellen wurden bereits vorab vom selben Autor in englischer Sprache im Journal „frontiers in Neuroscience“ publiziert: (Heuzeroth, H., Wawra, M., Fidzinski, P., Dag, R. and Holtkamp, M)

1 Abstrakt

1.1 Deutsch

Einleitung: In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Antikonvulsiva (antiepileptic drugs = AED) zugelassen. Ihre Anwendung nimmt durch eine hohe Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit stetig zu. Diese Eigenschaften der neuen Substanzen wurden größtenteils durch *in vivo* Modelle detektiert. Hingegen kam den *in vitro* Modellen zum präklinischen Screening nur wenig Aufmerksamkeit zu.

In vitro Modelle ermöglichen 1) weniger Leiden der Tiere durch ausschließlich postmortale Experimente und 2) eine größere N-Zahl durch die Nutzung von mehreren Hirnschnitten pro Tier.

Ein etabliertes *in vitro* Modell ist das 4-Aminopyridin-Modell (4-AP-Modell), welches anfallsartige Ereignisse (AE) in Hirnschnitten der Ratte durch die chemische Substanz 4-AP induziert und als akutes Epilepsie-Modell bereits antiepileptische Effekte von Valproat und Carbamazepin nachweisen konnte.

Bisher ist wenig über die Effekte neuartiger AED in diesem akuten *in vitro* Epilepsiemodell bekannt. In der Arbeit nutzten wir die kombinierte elektrophysiologische und intrinsisch optische Messung, um zwei neuartige Antikonvulsiva mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, Lacosamid (LAC) und Zonisamid (ZNS), hinsichtlich ihrer Effekte auf die AE im 4-Aminopyridin *in vitro* Modell der Ratte zu untersuchen.

Methodik: Epileptiforme Aktivität wurde in 400 µm dicken kombinierten entorhinal-hippocampalen Hirnschnitten von naiven Wistar Han Ratten mittels extrazellulärer Feldpotential-Aufnahmen und intrinsisch optischer Bildgebung erfasst und analysiert. ZNS und LAC wurden in je drei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. AE wurden mittels 4-Aminopyridin induziert, nach einer Stunde wurde eine stabile, rezidivierend auftretende Anfallsaktivität erzielt. Die Wirksamkeit der AED auf die AE wurde unter 60-minütiger Applikation der Substanzen untersucht. Anschließend folgte eine 60-minütige Wash out-Phase.

Ergebnisse: LAC und ZNS zeigten konzentrationsabhängige Effekte auf die AE-Frequenz. Die höchsten Konzentrationen von LAC und ZNS führten zu einer vollständigen Blockade der AE. LAC führte zu einer Reduktion der hochfrequenten, tonischen Phase der AE und zu einer Reduktion der AE-Dauer in mittlerer Konzentration. Die AE-Amplitude wurde nicht beeinflusst. Der Ausbreitungsgrad und die

Lichtdurchlässigkeit in Form der Transmissionsänderungen des Gewebes wurden signifikant durch LAC in mittlerer Konzentration im Subiculum beeinflusst. Alle Effekte waren im Wash out reversibel.

Schlussfolgerung: Das akute Rattenschnittmodell *in vitro* mit 4-Aminopyridin bildete erfolgreich Effekte neuartiger Antikonvulsiva auf epileptiforme Aktivität in kombinierten elektrophysiologischen und intrinsisch optischen Messungen ab. Es zeigt sich als geeignetes *in vitro* Modell zum Screening neuer Antikonvulsiva mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Dieses Modell hat das Potential, perspektivisch die Anzahl an belastenden Tierexperimenten *in vivo* zu reduzieren.

1.2 Englisch

Introduction: In the past decades, a plethora of new antiepileptic drugs (AED) was approved and licensed to the market. Their administration steadily increases due to the drugs' high efficacy and good tolerability. The anticonvulsant properties of the new substances were largely detected by *in vivo* models. On the other hand, less attention was paid to the *in vitro* models for preclinical screening of AED.

In vitro models allow 1) less suffering of the animals through exclusive post-mortem experiments and 2) a larger number by use of several brain slices per animal.

An established *in vitro* model is the 4-aminopyridine-model (4-AP-model), which induces seizure-like events (AE) in brain tissue and which – as an acute seizure model – already had reproduced anticonvulsant effects of valproate and carbamazepine.

So far, little is known about the effects of newer AED in this epilepsy model *in vitro*. In this work, we used combined electrophysiological and intrinsic optical measurements to investigate the effects on AE in the rat 4-aminopyridine model *in vitro* using two new-generation AED with different mechanisms of action, lacosamide (LAC) and zonisamide (ZNS).

Method: Epileptiform activity was recorded and analyzed in 400 μm thick combined entorhinal-hippocampal brain slices of naive Wistar Han rats using extracellular field potential imaging and intrinsic optical imaging. ZNS and LAC were examined in three different concentrations each. AE were induced by 4-aminopyridine. After one hour, stable recurrent seizure activity was reached and the drug was added for a further 60 minutes and tested for its effect on the AE. This was followed by a 60-minute wash out-phase.

Results: LAC and ZNS showed concentration-dependent effects on frequency of the AE. The highest concentrations of LAC and ZNS resulted in complete blockade of AE. LAC led to a reduction of the high-frequency, tonic phase of AE, and led to a reduction of the AE-duration at medium concentration. The AE-amplitude was not affected. The area of AE and translucency in terms of tissue transmission changes were significantly affected by LAC at medium concentration in the subiculum. All effects were reversible during wash out.

Conclusion: The 4-AP model *in vitro* successfully demonstrated the effects of newer anticonvulsants on epileptiform activity in combined electrophysiological and intrinsic optical measurements. It is a suitable *in vitro* model for the screening of new

anticonvulsants with different mechanisms of action, which perspective has the potential to reduce the number of burdening animal experiments *in vivo*.

2 Einleitung

2.1 Epileptische Anfälle und Epilepsie

2.1.1 Überblick

Ein epileptischer Anfall ist nach Definition der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE, engl. International League Against Epilepsy) durch ein paroxysmales Auftreten von objektiven klinischen Zeichen und/oder subjektiven Symptomen charakterisiert, das auf eine erhöhte exzitatorische und synchronisierte Entladung im zentralen Nervensystem zurückzuführen ist. Das Krankheitsbild der Epilepsie basiert auf einer beständigen Prädisposition für epileptische Anfälle und deren neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen. Um die Diagnose einer Epilepsie zu stellen, muss mindestens ein unprovoked epileptischer Anfall aufgetreten sein (Fisher et al., 2014).

2.1.2 Epileptischer Anfall

Die Entstehung eines epileptischen Anfalls beruht auf einem Missverhältnis von inhibitorischen und exzitatorischen Faktoren im zentralen Nervensystem, das zu einer abnorm erhöhten, paroxysmalen Synchronizität von Neuronen führt. Es resultiert ein zeitlich eingegrenztes Ereignis, welches klinisch und im Elektroenzephalogramm (EEG) einen klaren Anfang und ein klares Ende hat. Eine Sonderform stellt der Status epilepticus dar, welcher sich durch anhaltende oder rezidivierende Anfälle, von deutlich längerer Dauer präsentiert (Trinka et al., 2015).

Der epileptische Anfall als das entscheidende Symptom der Erkrankung Epilepsie kann je nach Ort von Ursprung und Ausbreitung im zentralen Nervensystem eine unterschiedliche klinische Manifestation aufweisen, mit einer Spannweite zwischen eindrücklichen, generalisierten, motorischen Phänomenen (Grand Mal-Anfälle) bis hin zu subtilen Symptomen mit autonomen, sensorischen oder psychischen Auffälligkeiten. Die Propagation der synchronisierten ictalen Entladungen im Gehirn kann auch zu einer Abfolge von Symptomen führen. Unterschiedliche Faktoren, wie die antiepileptische Medikation oder der Tag-Nacht-Rhythmus, beeinflussen als Ko-Faktoren das klinische Erscheinungsbild des epileptischen Anfalls. Epileptische Anfälle werden dichotom in fokale und generalisierte Anfälle klassifiziert. Fokale Anfälle begrenzen sich bei ihrem

Beginn auf Netzwerke innerhalb einer Hemisphäre und können mit oder ohne Merkmale einer Bewusstseinsstörung einhergehen (früher: einfach- bzw. komplex-fokale Anfälle). Eine Beteiligung der kontralateralen Hemisphäre im Verlauf ist möglich und wird als fokaler zu bilateraler Anfall bezeichnet (früher: fokaler Anfall mit sekundärer Generalisierung). Generalisierte Anfälle entstehen simultan in neuronalen Netzwerken beider Hemisphären. Sie lassen sich nach ihrer klinischen Erscheinungsform weiter unterteilen in: 1) nicht motorische Anfälle, entsprechend typische und atypische Absencen, 2) motorische Anfälle mit Unterteilung in tonisch-klonisch, klonisch, tonisch, myoklonisch und atonisch.

Neben eindeutig fokalen und generalisierten Anfällen gibt es nicht klassifizierbare Anfälle, wenn Klinik und interiktales sowie ggf. iktales EEG eine Zuordnung zu einer der beiden anderen Gruppen nicht erlauben (Fisher et al., 2017).

2.1.3 Epilepsie

Die Epilepsie stellt einen Überbegriff für Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems dar, welche mit einer erhöhten Neigung zu epileptischen Anfällen einhergehen. Folgende Kriterien müssen zur Diagnose der Epilepsie nach der aktuellen Klassifikation der ILAE gegeben sein: 1) mindestens zwei unprovozierte epileptische Anfälle in einem Abstand von mehr als 24 Stunden, 2) ein unprovozierter epileptischer Anfall, welcher mit einer deutlich erhöhten Neigung zu weiteren Anfällen einhergeht (mindestens 60 % Wahrscheinlichkeit für die nächsten 10 Jahre) oder 3) die Diagnose eines Epilepsiesyndroms (Fisher et al., 2014). Neben dem epileptischen Anfall als wesentlichem Symptom der Erkrankung Epilepsie gehen auch interiktale und postiktale kognitive Beschwerden mit dem Krankheitsbild Epilepsie einher. Epilepsie ist – wie epileptische Anfälle – fokal oder generalisiert. Die Ursache einer Epilepsie kann erworben oder angeboren sein (Scheffer et al., 2017).

2.1.4 Epidemiologie

Mit 50 Millionen betroffenen Menschen zählt die Epilepsie weltweit zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Bei einer angenommenen Prävalenz von 5,2-7/1.000 Einwohner in europäischen Ländern, leiden ca. 500.000 Menschen in Deutschland an Epilepsie (Forsgren et al., 2005, Hirtz et al., 2007). Der größte Anteil an Erkrankten wird

mit einer Prävalenz von 5,8-17,1/1.000 Einwohnern und ungefähr 40 Millionen Personen in Entwicklungsländern geschätzt, wo erworbene Formen der Epilepsie, insbesondere bedingt durch zerebrale Infektionen, häufiger auftreten (Cruz et al., 1985, Mendizabal und Salguero, 1996, Preux und Druet-Cabanac, 2005) .

Patienten mit eindeutiger oder vermuteter Epilepsie zeigten in einer Studie von Neligan et al. eine 2,2-fach (1,97 – 2,43) erhöhte Mortalität. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die meisten Patienten nicht an der Epilepsie, sondern an der zugrundeliegenden Erkrankung oder an Pneumonien und ischämischen Herzerkrankungen verstarben (Neligan et al., 2011).

2.1.5 Therapie

Das Ziel der antiepileptischen Therapie ist die Verhinderung von weiteren epileptischen Anfällen, somit handelt es sich hier eigentlich um eine sekundäre Prophylaxe. Zur Behandlung der Epilepsie stehen verschiedene Optionen zur Verfügung: Antikonvulsiva, resektive oder ablativ Epilepsiechirurgie, Verfahren der Neurostimulation (Vagus-Nerv- und tiefe Hirnstimulation) und diätetische Verfahren (ketogene Diät) (Morrell et al., 1989, Rutecki, 1990, Kerrigan et al., 2004, Morris et al., 2013, Kossoff et al., 2015). Die am häufigsten Anwendung findende Behandlung umfasst den Einsatz von Antikonvulsiva (AED, engl. antiepileptic drug).

2.2 Antikonvulsiva

2.2.1 Geschichte und Entwicklung

Seit der Einführung von Kalium-Bromid als erstes in der Literatur aufgeführtes Antikonvulsivum 1857 hat die Anzahl von antikonvulsiven Medikamenten vor allem in den letzten Dekaden deutlich zugenommen (Loscher, 2011). Die bis heute zugelassenen Medikamente werden zur besseren Übersichtlichkeit nach ihrer chronologischen Entdeckung und Zulassung in drei Generationen unterteilt. Die erste Generation erstreckt sich von der Entdeckung der antikonvulsiven Wirkung von Kalium-Bromid bis in das Jahr 1958 und enthält neben diesem beispielhaft Phenobarbital, Phenytoin, Primidon und Ethosuximid (Shorvon, 2009a).

Die zweite Generation von Antikonvulsiva ordnet sich in den Zeitraum zwischen 1959 und 1975 ein. Carbamazepin und Valproat als Hauptvertreter sowie die Benzodiazepine, wie Diazepam und Clonazepam, zählen zu den noch heute häufig eingesetzten Antikonvulsiva und sind von ihrer chemischen Struktur deutlich von der der Barbiturate zu unterscheiden (Shorvon, 2009b).

Mit der Gründung des „Anticonvulsant Drug Development Program“ (deutsch: Entwicklungsprogramm für Antikonvulsiva) 1975 durch das „National Institute of Neurological Disorders and Stroke“ in den USA begann die bis in die Gegenwart reichende Entdeckung der dritten Generation von Antikonvulsiva. Seitdem sind mehr als 28.000 Moleküle, größtenteils neu synthetisierte und Strukturverwandte schon bekannter AED, untersucht worden und haben die Liste der zugelassenen Antikonvulsiva und das Therapiespektrum deutlich erweitert. Weit über 15 Antikonvulsiva (Stand 12/2019) wurden so zugelassen, darunter Zonisamid (ZNS), Lamotrigin, Levetiracetam, Pregabalin und Lacosamid (LAC) (Brodie, 2010).

Neben einem teils günstigeren Nebenwirkungsprofil zeigen alle zugelassenen Antikonvulsiva der dritten Generation in der Kombinationstherapie der Epilepsie bei Therapierefraktärität wirksamere Ergebnisse als Placebo (Beyenburg et al., 2010).

Trotz der Vorteile der neuen AED in Bezug auf Verträglichkeit zeigte ein Großteil der in der Monotherapie eingesetzten Substanzen nur eine mit den alten AED vergleichbare Wirksamkeit (Brodie et al., 2007, Marson et al., 2007, Glauser et al., 2010). Eine Ursache ist, dass in den prä-klinischen *in vivo* Testbatterien seit Jahrzehnten die gleichen Modelle verwendet werden (Maximal-Elektroschock- und Pentylenetetrazol-Modell), die in einem ersten Schritt ausschließlich Substanzen identifizieren, die die gleichen Wirkmechanismen wie die bisherigen Antikonvulsiva haben (Holtkamp und Meierkord, 2007).

2.2.2 Tiermodelle in der Entwicklung von Antikonvulsiva

Wenn zwei Antikonvulsiva in ausreichend hoher Dosis parallel oder in Folge nicht zur Anfallsfreiheit geführt haben, spricht man von Therapierefraktärität bzw. Pharmakoresistenz (Kwan et al., 2010). Die Mehrheit der Patienten wird unter Behandlung mit einem Antikonvulsivum (Monotherapie) für mehr als 12 Monate anfallsfrei (Chen et al., 2018). Jedoch liegen die Raten an therapierefraktärer Epilepsie seit der

Einführung des Kaliumbromids vor mehr als 150 Jahren weiterhin und unverändert zwischen 35 und 40 % (Mohanraj und Brodie, 2005).

Ein Umstand wird in den Tiermodellen gesehen, welche validiert an den AED der zweiten Generation, schon seit fast 80 Jahren als erste Untersuchung auf antikonvulsive Eigenschaften nun auch für die dritte Generation der AED Verwendung finden. Bei Betrachtung der Tiermodelle muss zwischen *in vivo* Modellen, welche am lebendigen Organismus durchgeführt werden, und *in vitro* Modellen, welche an Hirngewebe von zuvor getöteten Tieren stattfinden, unterschieden werden. Zu den Modellen gehören in einem ersten Schritt des Antikonvulsiva-Screenings die beiden im Folgenden beschriebenen *in vivo* Tiermodelle:

Das Maximal-Elektroschock-Anfallsmodell (MES-Modell, engl.: maximal electroshock seizure model) wurde von Merritt und Putnam entwickelt und diente als erstes Tiermodell zur Entdeckung der antikonvulsiven Substanz Phenytoin (Putnam und Merritt, 1937). Mittels transaurikulär oder transcorneal applizierten Elektroschocks wurden epileptische Anfälle induziert. Diese zeigten eine tonische Komponente gefolgt von einer klonischen Komponente der Gliedmaßen. Die Tiere, die an drei Tagen die tonische Komponente nach Strominduktion zeigten, wurden für die weitere Substanztestung verwendet und bildeten ihre eigene Kontrollgruppe. Anschließend wurde den Tieren eine potentiell antikonvulsive Substanz verabreicht (oral oder intraperitoneal). Anschließend wurde untersucht, bei wie vielen Tieren bei gleicher Strominduktion keine Extensionen der hinteren Gliedmaßen mehr in der Folge nachzuweisen waren. Eine Erhöhung der Reizschwelle durch die Substanz wurde als ursächlich angesehen. Es wurden protektive Dosierungen ermittelt, welche mit einer 95 % Signifikanz zu einem Ausbleiben der Anfälle in 50 % der Tiere führte (Castel-Branco et al., 2009). Das MES-Modell dient somit zum Screening von Molekülen, die hemmend auf generalisierte tonisch-klonische Anfälle wirken und stellt sich sensitiv für die Gruppe der Natriumkanalblocker dar.

Das subkutane (s.c.) PTZ-Modell (vom engl.: pentylenetetrazole; deutsch: Pentetrazol und Metrazol) stellt neben dem MES-Modell den zweiten Goldstandard der *in vivo* Tiermodelle für die Entdeckung von Antikonvulsiva dar. An diesem konnten Everett und Richards 1946 an Mäusen die Effekte des AED Trimethadion nachweisen (Richards und Everett, 1946). Nach subkutaner Injektion von Pentetrazol an Mäusen oder Ratten kommt es für wenige Sekunden zu minimalen klonischen epileptischen Anfällen der Vibrissen und/oder der vorderen Gliedmaßen. Es erfolgt die Gabe der zu untersuchenden potentiell antikonvulsiven Substanz und zum Zeitpunkt der vermuteten maximalen antikonvulsiven

Wirkung die PTZ-Applikation. Nun erfolgt die Beobachtung des Erscheinens oder Ausbleibens der oben beschriebenen epileptischen Anfälle für 30 Minuten. Das Modell untersucht antikonvulsive Effekte auf generalisierte Anfälle, wie Myoklonien und Absencen.

Die meisten zugelassenen Antikonvulsiva zeigen bereits in mindestens einem der beiden zuvor beschriebenen Modelle (PTZ- oder MES-Modell) eine Wirksamkeit. Eine Ausnahme stellt das Antikonvulsivum Levetiracetam dar, welches keine Wirksamkeit in wiederholten Untersuchungen in dem MES- und s.c. PTZ-Modell zeigte. Levetiracetam wurde Ende der 1980er Jahre im „audiogenic seizure-prone mice“-Modell erstmals als antikonvulsiv wirksam beschrieben und ist heute das in Industrienationen wohl am häufigsten eingesetzte Antikonvulsivum der dritten Generation (Gower et al., 1992, Loscher und Honack, 1993, Klitgaard et al., 1998). Das 6-Hertz (Hz) Epilepsie-Modell der Maus, ein Modell für pharmakoresistente Epilepsie, konnte anders als das PTZ- oder MES-Modell die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam darstellen. In diesem Modell werden mittels niederfrequenter (eben 6 Hz) und langanhaltender (3 s) elektrischer Stimulation der Kornea in Mäusen fokale epileptische Anfälle induziert. Interessanterweise zeigt sich im 6-Hz Modell keine Wirksamkeit von Phenytoin und vielen weiteren Antikonvulsiva (White HS, 2006, Loscher und Schmidt, 2011). Dieser Umstand führte dazu, dass es nach seiner Beschreibung in den 1950er Jahren vorerst nicht weiter Verwendung fand. Dieses Modell ist somit als komplementär zum MES- oder PTZ-Modell zu betrachten. Daher wurde das 6-Hz Epilepsie-Modell als zusätzliches *in vivo* Tiermodell in viele Screening-Programme für antikonvulsive Substanzen integriert.

2.2.3 Neuartige Antikonvulsiva

Die seit 1975 entdeckten antikonvulsiven Substanzen werden als neuartige Antikonvulsiva oder auch als Antikonvulsiva der dritten Generation bezeichnet. Die Entdeckung gelang mittels MES- und s.c. PTZ-Modell, dem 6-Hz Epilepsie Modell der Maus und weiteren Screening-Batterien. Die Wirkmechanismen der Antikonvulsiva sind teilweise bekannt.

Für Lamotrigin, Oxcarbazepin und Eslicarbazepinacetat stellen spannungsabhängige Natriumkanäle einen Angriffspunkt dar. Sie stabilisieren diese im Zustand der schnellen Inaktivierung, um so zu einer spannungs- und frequenzabhängigen Reduktion der Leitfähigkeit zu führen. LAC wirkt ebenfalls an spannungsabhängigen Natriumkanälen,

beeinflusst im Gegensatz zu den anderen genannten Antikonvulsiva aber die langsame und nicht die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals (Beydoun et al., 2009).

Ethosuximid wirkt hauptsächlich über „T-type“ Calcium-Kanäle, Gabapentin und Pregabalin entfalten ihre Wirkung an Untereinheiten der „high-voltage“ aktivierten Calcium-Kanäle (Meldrum und Rogawski, 2007).

Der GABA_A-Rezeptor ist ein weiterer Ansatzpunkt, dessen Aktivierung führt zu einer Öffnung des Chlorid-Kanals. Die Erhöhung der intrazellulären Chlorid-Konzentration hyperpolarisiert die neuronale Membran. Eine Modifikation des GABA-Metabolismus (Vigabatrin) oder die Hemmung der Wiederaufnahme von GABA an der Synapse (Tiagabine) erhöht die Konzentration dieses inhibitorischen Neurotransmitters (Sills und Brodie, 2001).

Retigabin führt zu einer Öffnung des Kaliumkanals. Perampanel moduliert die AMPA-regulierte Neurotransmission (Meldrum und Rogawski, 2007).

Topiramat, Felbamat, ZNS, Levetiracetam und Brivaracetam haben ein breites Spektrum an Wirkmechanismen. Diese blocken neben den oben aufgeführten Rezeptoren zusätzlich Glutamat-Rezeptoren (Felbamat, Topiramat, Zonisamid) und beeinflussen die Wiederverwertung synaptischer Vesikel (Levetiracetam, Brivaracetam) (Brodie, 2010).

Im Folgenden sollen die in der Arbeit untersuchten Antikonvulsiva LAC und ZNS genauer dargestellt werden.

2.2.4 Lacosamid (LAC)

R-2-acetamido-N-benzyl-3-methoxypropionamid (LAC, früher auch Harkoserid, SPM 927) ist ein neuartiges Antikonvulsivum zur Behandlung fokaler Epilepsie und in Europa seit 2008 zugelassen als Medikament in Zusatztherapie (Perucca et al., 2008). Die Gabe in Monotherapie in einer Studie von Giraldez et al. für fokale Epilepsie zeigte zudem eine hohe Anfallsfreiheit von über 72 % über 12 Monate bei nur geringen und größtenteils milden Nebenwirkungen, die nur in 4,5 % der Fälle zu einem Therapieabbruch führten (Giraldez et al., 2015). Die Substanz ist seit 2014 in den USA und seit Anfang 2017 in Europa zur Monotherapie bei fokaler Epilepsie zugelassen.

LAC gehört einer Gruppe von Aminosäuren an, die als potentiell antikonvulsiv wirkende Substanzen in den 1990er Jahren präklinisch getestet wurden (Choi et al., 1996). Im MES-Modell inhibierte LAC tonische Anfälle bei Ratten und Mäusen (LeTiran et al., 2001). Hingegen konnten im sc. PTZ-Modell sowohl für Ratten als auch für Mäuse keine

Effekte von LAC auf klonische Anfälle gezeigt werden (Stohr et al., 2007). Bei intravenöser Applikation im PTZ-Modell konnte eine Anhebung der Anfallsschwelle nachgewiesen werden (Stohr et al., 2007).

LAC ist das R-Enantiomer eines Stereoisomers. Während sich im MES-Modell der Maus keine unterschiedliche Wirksamkeit zeigte, wirkte bei Ratten das R-Enantiomer 10-22 mal stärker als das S-Enantiomer (SPM 6953) (Andurkar et al., 1999).

Der genaue molekulare Wirkmechanismus ist bisher ungeklärt. Es ist bekannt, dass LAC die langsame Inaktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen verstärkt. Die Substanz unterscheidet sich hier von den anderen etablierten Natriumkanalblockern, wie Lamotrigin, Carbamazepin und Phenytoin (Errington et al., 2008, Sheets et al., 2008). Vermutete Effekte auf spannungsabhängige Calciumkanäle (Wang und Khanna, 2011) konnten nach aktuellem Stand (Oktober 2019) nicht reproduziert werden.

2.2.5 Zonisamid (ZNS)

1,2-Benzisoxazol-3-methansulfonamid (ZNS) ist ein neuartiges Antikonvulsivum für die Behandlung der fokalen Epilepsie in Zusatztherapie (Baulac, 2006). Zusätzlich ist die Substanz in Europa für die Monotherapie fokaler Epilepsie zugelassen (European Medicines Agency, 2008). Vorteile konnten auch in der Behandlung des Parkinson-Syndroms und neuropathischer Schmerzen gezeigt werden. ZNS besitzt weiterhin neuroprotektive Eigenschaften (Owen et al., 1997, Yoshida et al., 2005, Murata et al., 2007).

Zwischen 1983 und 1997 wurden mehrere klinische Studien durchgeführt und bildeten die Grundlage für die Einführung von ZNS als AED zuerst in Japan 1989, folgend in den USA 2000 und seit 2005 auch in der EU und in der Schweiz unter dem Handelsnamen Zonégren (Schmidt et al., 1993, Faught et al., 2001, Sackellares et al., 2004). ZNS zeigte antikonvulsive Wirkungen im MES- und sc. PTZ-Modell der Maus (Mandhane et al., 2007).

Als Benzisoxazol-Derivat ist ZNS nicht mit anderen chemischen AED verwandt und besitzt ein breites Spektrum verschiedener Wirkmechanismen, welche sich in unterschiedlichen Modellen darstellen: Es zeigt einen Natriumkanal-Antagonismus (Schauf, 1987, Rock et al., 1989) und einen Antagonismus an T-Typ Calciumkanälen (Suzuki et al., 1992), es führt zur Erhöhung der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität (Yano et al., 2009), erhöht den Dopamin-Turnover (Yabe et al., 2009) und hemmt die

Monoaminoxidase-B (Sonsalla et al., 2010). Zusätzlich konnte eine Reduktion der durch epileptische Anfälle und ischämische Ereignisse verursachten Apoptose aufgezeigt werden (Minato et al., 1997, Das et al., 2010). ZNS wird durch die Unterdrückung tonischer, tonisch-klonischer und myoklonischer Anfälle und die hohe Anzahl differenter Wirkmechanismen die Anwendung bei einem breiten Spektrum von Epilepsie zugeschrieben.

Im akuten Hirnschnittmodell mit 4-Aminopyridin (50 μ M) am Meerschweinchen konnten antikonvulsive Effekte von ZNS mittels intrazellulärer Messung in der hippocampalen Region dargestellt werden. Dieses *in vitro* Modell dient der Untersuchung vitaler neuronaler Netzwerke in Gewebeschnitten von zuvor dekapitierten Meerschweinchen. In 9 von 11 gemessenen Neuronen zeigte sich 3-8 Minuten nach dem Einwaschen von ZNS (50 μ M) ein Effekt, der nach ca. 15-20 Minuten eine stabile Phase erreichte (Thone et al., 2008). Im akuten Hirnschnittmodell der Ratte wurden nach unserer Literaturrecherche (Stand Oktober 2019) keine extrazellulären oder intrinsisch optischen Messungen zur Darstellung der Wirkung von ZNS durchgeführt.

2.3 Experimentelle Epileptologie

Die letzten Dekaden der Epilepsieforschung trugen zur Etablierung einer Reihe von experimentellen Modellen bei, welche methodische und naturgemäß ethische Limitationen der klinischen Epilepsieforschung umgingen und zur Detektion von antikonvulsiven Wirkmechanismen führten. Neben den MES- und sc. PTZ-Modell *in vivo* zum Screening neuer antikonvulsiver Substanzen, existieren zahlreiche Modelle, *in vivo* und *in vitro*, zur Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Grundlagen der Epilepsie. Zu den *in vitro* Modellen zählen unter anderem (u.a.) neuronale Kulturen, akute Hirnschnitte, akute Hirnschnittkulturen und der isolierte Hippocampus (Avoli und Jefferys, 2016). Das in dieser Arbeit verwendete akute Hirnschnittmodell *in vitro* wird im Folgenden ausführlich erläutert.

2.3.1 Kombinierte Hirnschnitte *in vitro*

Eine wichtige Voraussetzung zur Induktion, Manipulation und Observation epileptiformer Aktivität *in vitro* sind die intakten und über längere Zeit funktionell erhaltenen Neurone und ihre Verbindungen, die ein neuronales Netzwerk bilden. Voraussetzungen, die wir an

das *in vitro* Modell zur Untersuchung von Medikamenteneffekten gestellt hatten, sind: 1) eine ausreichende Vergleichbarkeit von dem genutzten *in vitro* Modell zu einem *in vivo* Modell, 2) ein erhaltenes (lokales) neuronales Netzwerk nach dem Schneideprozess, welches im Hirnschnitt ausreichende intakte physiologische Verbindungen beibehält, 3) eine erhaltene Viabilität über mehrere Stunden, um einen ausreichenden Untersuchungszeitraum an einem stabil-bleibendem System zu bieten und 4) ein Erfassungssystem mit ausreichender zeitlichen und örtlichen Auflösung.

Hirnschnitte können der Induktionslösung auf zwei verschiedene Varianten ausgesetzt werden. Entweder wird der Hirnschnitt vollständig in die Induktionslösung eingetaucht (Submerged-Bedingung) oder der Hirnschnitt wird zwischen flüssiger und gasförmiger Phase der Induktionslösung platziert (Interface-Bedingung). Mittels einer Liquor-ähnlichen Lösung, der artifiziellen Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF vom engl. artificial cerebrospinal fluid), können die Neurone für mehrere Stunden versorgt und viabel gehalten werden. Abhängig von der Schnittebene und den geplanten zu untersuchenden Strukturen bleiben die planar angelegten Verbindungen des Hippocampus innerhalb von Hirnschnitten zu einem Teil erhalten und lassen die Untersuchung des physiologisch vorliegenden Netzwerkes zu. Zur Induktion sogenannter anfallsartiger Ereignisse (AE) in hippocampalen Hirnschnitten gibt es gängige elektrische und chemische Stimuli (Stasheff et al., 1985, Voskuyl und Albus, 1985, Walther et al., 1986).

2.3.2 4-Aminopyridin-Modell

Ein etabliertes Modell für die Untersuchung epileptiformer Aktivität an Hirnschnitten ist das 4-Aminopyridin-Modell. 4-AP ist ein unspezifischer Kaliumkanalblocker (Mathie et al., 1998). Durch die Kaliumkanalblockade kommt es zur Depolarisation der Neurone mit resultierender erhöhter Freisetzung von Transmittern an sowohl glutamatergen als auch GABAergen „Nervenendigungen“ (Perreault und Avoli, 1991) und somit zur Herabsetzung der Anfallsschwelle und Induktion epileptiformer Aktivität. 4-Aminopyridin fungiert so als chemischer Stimulus zur Induktion von AE. Der erstmalige Nachweis der Induktion epileptiformer Aktivität gelang Galvan et al. im Jahr 1982 am olfaktorischen Cortex des Meerschweinchens (Galvan et al., 1982). Die Art der beobachteten Entladungen lässt sich nach elektrophysiologischen Gesichtspunkten in drei Typen unterteilen:

Die erste Form der Entladung hält viele Sekunden an und beinhaltet Muster hochfrequenter und niederfrequenter Oszillationen in Folge schneller Aktionspotentiale. Hierbei scheint eine gleichzeitige Erhöhung von exzitatorischen und inhibitorischen Transmittern eine Rolle zu spielen (Buckle und Haas, 1982). Aufgrund des in der klinischen Situation vergleichbaren Auftretens von tonischen und folgend klonischen epileptischen Anfällen und in Anlehnung an EEG-Muster, wird die Form der Entladungen als ictale Aktivität oder AE bezeichnet. Im entorhinalen Cortex zeigt sich die ictale Aktivität elektrophysiologisch mit einer initialen Potentialnegativierung, gefolgt von hochfrequenten Oszillationen niedriger Amplitude und schließlich niederfrequenten Oszillationen mit höherer Amplitude. Die ictale Aktivität dauert einige Sekunden bis wenige Minuten an und erscheint in regelmäßigen Abständen (Bruckner und Heinemann, 2000). Der Ursprung der ictalen Aktivität stellt sich als sehr heterogen dar und lässt sich nicht einer einzelnen anatomischen Struktur des Hirnschnittes zuordnen (Buchheim et al., 2000).

Die zweite Art von beobachtetem Entladungsmuster beschreibt kurz anhaltende, schnelle Entladungen, welche in dem Netzwerk des Ammonshorn (lat.: Cornu amonis: CA) des Hippocampus zu messen sind (Voskuyl und Albus, 1985). Sie wird der interiktalen Aktivität zugeordnet (Avoli et al., 2002).

Die dritte Form von Entladungsmuster sind kurze und langsamere Entladungen, welche über dem gesamten hippocampal-entorhinalen Schnitt auftreten. Die Ausbreitung dieser interiktalen Aktivität ist langsamer und sie lässt sich nicht durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten hemmen. Sie ist auf synchrone Entladungen von Interneuronen zurückzuführen (Morris et al., 1996).

Bei früheren Untersuchungen im 4-AP-Modell ließ sich die ictale Aktivität durch Substanzapplikation von klassischen AED der 2. Generation, wie Carbamazepin oder Valproat, unterdrücken. Eine Reduktion der interiktalen Aktivität wurde hingegen erst bei sehr hohen Konzentrationen der Substanzen erreicht (Fueta und Avoli, 1992). Weitere Experimente konnten zeigen, dass AED die langsame interiktale Aktivität unterdrücken, ohne die schnelle interiktale Aktivität in Hirnschnitten zu beeinflussen (Bruckner und Heinemann, 2000, D'Antuono et al., 2010). Dies entspricht auch klinischen Daten, bei denen Antikonvulsiva bei einigen Patienten mit Epilepsie keine Effekte auf interiktale Spikes zeigten (Spencer et al., 2008). Aufgrund der deutlicheren Effekte von klassischen AED auf die ictale Aktivität fokussierten wir in dieser Arbeit auf die Auswertung dieser.

Eine zweite Form der Erfassung der durch 4-AP induzierten AE ist durch das intrinsisch optische Signal (IOS) möglich. Als IOS wird die aktivitätsabhängige Änderung optischer Eigenschaften des Gewebes bezeichnet. Mithilfe des Signals lassen sich durch die Aufzeichnung des gesamten Hirnschnitts mittels einer Kamera nicht-invasiv u.a. der Anfallsursprung, die Ausbreitung und Größe der betroffenen Fläche der AE mithilfe der Analyse der Zunahme der Lichttransmission erfassen und quantifizieren (Borbely et al., 2014). Anwendung findet die Analyse intrinsisch optischer Signale - neben den akuten Hirnschnittmodellen mit 4-AP und Niedrig-Magnesium - in isolierten Gehirnen des Meerschweinchens und *in vivo* zum Verständnis des funktionellen Aufbaus des somatosensorischen und visuellen Cortex (Grinvald et al., 1988, MacVicar und Hochman, 1991, Federico et al., 1994, Meierkord et al., 1997).

2.4 Die Hippocampusformation

2.4.1 Anatomie und Physiologie

Die paarig angelegte Hippocampusformation ist in der klinischen und in der experimentellen Epileptologie von besonderer Bedeutung, da der Hippocampus aufgrund seiner besonderen anatomischen Netzwerkeigenschaften, wie mit dem dreischichtigen Aufbau, und der hippocampalen Schleife eine leicht erregbare Struktur darstellt und somit der häufigste Anfallsursprung bei fokalen Epilepsien ist. Hippocampale Hirnschnitte, neuronale Zellkulturen hippocampaler Netzwerke und auch ganze, isolierte Hippocampi sind häufig eingesetzte *in vitro* Modelle mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen zur Untersuchung epileptiformer Synchronizität (Avoli und Jefferys, 2016). Im Rahmen der von uns untersuchten AED an kombinierten hippocampal-entorhinalen Hirnschnitten der Ratte beschränkt sich die Beschreibung auf die Hippocampusformation in dieser Spezies.

Die Einteilung und Definition über die Zugehörigkeit einzelner Strukturen zu der hippocampalen Formation ist in der Literatur heterogen. Die hier beschriebene Einteilung entspricht der von Amaral und Witter (Witter, 2004) (Abbildung 2-1).

Die Hippocampusformation wird nach entwicklungsgeschichtlichen Aspekten in eine hippocampale Formation und eine parahippocampale (auch retrohippocampale) Region unterteilt. Der Hauptunterschied liegt in der Anzahl an Schichten und der daraus folgenden unterschiedlichen Konnektivität.

Die hippocampale Formation ist dreischichtig organisiert und unterteilt sich in drei morphologische Strukturen: Gyrus dentatus, Hippocampus proper und Subiculum (Neligan et al.). Der Hippocampus proper wird in drei Felder nach seiner Form als Ammonshorn unterteilt: CA1, CA2, CA3.

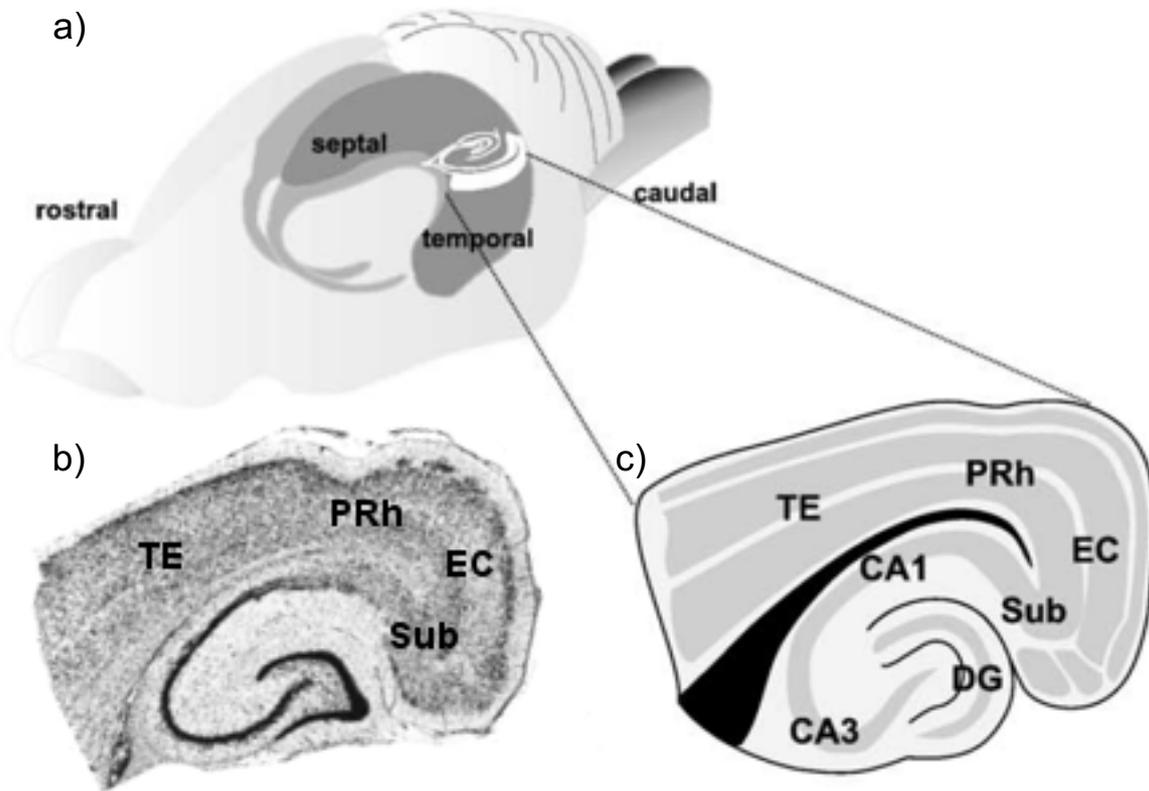


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Gehirns der Ratte (a) mit Skizzierung eines horizontalen hippocampalen Hirnschnitts in der ursprünglichen Lage. Fotomikroskopische Darstellung (b) eines horizontal geschnittenen Hippocampus in Nissl-Färbung (schwarz-weiß Darstellung). Ein Schnitt gleicher Ebene ist schematisch dargestellt (c). Der Schnitt enthält die Strukturen Cornu ammonis 1 und 3 (CA1, CA3), Gyrus dentatus (DG), Subiculum (Sub), entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PRh) und temporaler Cortex (hier: TE). (Abbildung modifiziert nach Witter und Amaral (Witter, 2004))

Die hippocampale Formation gehört mit ihrem dreischichtigen Aufbau zum Allocortex und steht über das Subiculum mit dem 6-schichtigen entorhinalen Cortex als parahippocampale Struktur in Verbindung, welche dem Isocortex zugerechnet wird.

Die dreidimensionale Lage der Hippocampusformation im Gehirn der Ratte ist komplex. Als längliche, grob C-förmige Struktur erstreckt sich die lange Achse (septotemporale Achse) von rostradorsal nach kaudoventral und liegt im medialen Temporallappen. Auf der dem Ventrikel zugewandten Seite wird der Hippocampus vom Alveus hippocampi bedeckt, einer Faserschicht aus hauptsächlich myelinisierten Afferenzen und Efferenzen von Hippocampus proper und Subiculum, welche sich in die Fimbria hippocampi und den

Fornix fortsetzen. Diese erstreckt sich vom kaudalen Ende des Balkens über den dritten Ventrikel nach rostral und ventral bis zu den Corpora mamillaria.

Die Pyramidenzellschicht des Ammonshorns und die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus bilden zwei in sich greifende c-förmige Figuren. Der Gyrus dentatus unterteilt sich in ein suprapyramidales Blatt, welches den medialen Anteil des Cornu ammonis kappenartig umschließt und ein darauffolgendes infrapyramidales Blatt. Der dreischichtige Aufbau der hippocampalen Formation vom Alveus ausgehend setzt sich zusammen aus:

- Stratum oriens (Korbzellschicht)
- Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht)
- Stratum moleculare (Molekularzellschicht)

Das Stratum oriens stellt eine Somata-arme Zellschicht dar, bei der lediglich Somata von Interneuronen zu finden sind. Den Hauptanteil bilden Axone, basale Dendriten von Pyramidenzellen und Synapsen.

Das Stratum pyramidale beinhaltet mit den Somata der Pyramidenzellen die Hauptvertreter der neuronalen Zellen des Hippocampus. Anhand der Pyramidenzellgröße und -dichte erfolgt die Unterteilung des Cornu ammonis in die Region CA1 mit vielen kleinen Pyramidenzellen, CA2 mit besonders großen, dicht liegenden Pyramidenzellen, welche in der Region CA3 lockerer angeordnet sind. Die basalen Dendriten der Pyramidenzellen ziehen in das Stratum oriens und die apikalen Dendriten in das Stratum moleculare. Im DG werden die Pyramidenzellen als Körnerzellen und analog hierzu das Stratum pyramidale als Stratum granulosum (Körnerzellschicht) bezeichnet.

Eine weitere, erwähnenswerte Zellgruppe im Stratum pyramidale sind Korbzellen. Sie bilden korbartige Verflechtungen um die Somata der Pyramidenzellen und inhibieren deren Aktivität.

Im Stratum moleculare verlaufen und enden Fasern des Tractus perforans („perforant path“), welche u.a. Verbindungen aus dem EC und Afferenzen aus den Kernen des Thalamus beinhalten. Eine Zellgruppe des Stratum moleculare stellen die Chandelierzellen dar, welche inhibitorische Neurone mit axo-axonalen Verbindungen zu den Pyramidenzellen des Stratum pyramidale sind.

In CA3 wird durch Axone von Pyramidenzellen des DG, welche als Moosfasern bezeichnet werden, eine schmale, zellfreie Schicht gebildet, das Stratum lucidum. Diese verdickt sich hin zum CA2, welche visuell die Grenze zwischen CA2 und CA3 bildet.

Eine wichtige Struktur ist auch der EC, welcher den Hauptinput und -output des Hippocampus bildet. Der sechs-schichtige EC besitzt oberflächliche (Schichten I-III) und tiefe Schichten (Schichten IV-VI). Im medialen EC bildet die Lamina dissecans die Trennlinie zwischen den tiefen und oberflächlichen Schichten.

Die Schichten II, III, V und VI stellen die zellreichen, die Schichten I und IV die zellarmen Schichten des EC dar. Die wichtigsten Efferenzen des EC zum Hippocampus ziehen von den Schichten II und III des entorhinalen Cortex als Tractus perforans durch das Subiculum hindurch zur Molekularschicht des Gyrus dentatus und zum Cornu ammonis (CA1). Der wohl bekannteste exzitatorische, trisynaptische Kreislauf des Hippocampus nimmt so seinen Ausgang: EC → Tractus perforans → DG → Moosfasern → CA3 Pyramidenzellen → Schaffer'sche Kollaterale → CA1 Pyramidenzellen → Subiculum → EC.

Die Projektion der hippocampalen Verbindungen erfolgt meist unidirektional, was eher untypisch für die meist reziprok verlaufenden corticocorticalen Verbindungen ist. Die Verbindungen zwischen den Pyramidenzellen des CA1 und dem Subiculum sind hingegen reziprok. Der entorhinale Cortex projiziert ebenfalls unidirektional auf den DG über den sogenannten „perforant pathway“. Durch seine reziproken Projektionen auf den perirhinalen und postrhinalen Cortex werden diese Areale den perihippocampalen Regionen zugerechnet. Zu diesen zählen auch die zwischen entorhinalem Cortex und Subiculum liegenden Prä- und Parasubiculum, welche mit mehr als drei Schichten und gegenseitigen Verbindungen zum Subiculum nicht der hippocampalen Region zuzurechnen sind (Scharfman et al., 2000).

2.4.2 Pathologie und Pathophysiologie

Eine Funktion des Hippocampus besteht in der Überführung neu erworbener Informationen ins Langzeitgedächtnis über die Kommunikation mit dem entorhinalen Cortex sowie subcortikalen und frontocorticalen Strukturen. Die ihm zukommende zentrale Rolle für die Bildung des Gedächtnisses, macht ihn zu der vermutlich am intensivsten untersuchten Struktur des gesamten zentralen Nervensystems. Zusätzlich weist der Hippocampus von allen Hirnregionen die niedrigste Schwelle für epileptische

Aktivität auf und bringt ihn so in den Fokus für die Erforschung der Pathophysiologie im Rahmen der experimentellen Epileptologie (Green, 1964).

Die Temporallappenepilepsie ist mit einem Anteil von 60-75 % die häufigste Form der fokalen Epilepsie und zeigt sich in 30 – 40 % therapierefraktär (S. Spencer und Huh, 2008). Der Ursprung der epileptischen Anfälle ist in der Mehrheit der Fälle die Hippocampusregion (S. S. Spencer et al., 1990), weshalb die Temporallappen-Teilresektion mit Amygdalahippocampektomie eine effektive Behandlungsmöglichkeit bei ausbleibendem medikamentösen Erfolg darstellt (Wiebe et al., 2001, Engel et al., 2003). Die Resektate weisen in über 80 % neuropathologische Veränderungen in den folgenden Regionen der hippocampalen Formation auf: CA1, CA3 und die Hilus-Region des Gyrus dentatus (Williamson et al., 1993).

2.5 Fragestellung der Arbeit

Bestehende *in vivo* Modelle bilden weiterhin das Fundament für die Entdeckung potentiell antikonvulsiver Substanzen, während *in vitro* Modelle als sich anschließende Modelle zur Erforschung von Wirkmechanismen dienen. Bisher ist nur wenig über die Effekte von Antikonvulsiva der dritten Generation in etablierten akuten Epilepsiemodellen *in vitro* bekannt. Die Untersuchung von Levetiracetam wurde von meinem Mit-Doktoranden Ramazan Dag im Rahmen seines Dissertationsprojektes in der AG Klinische und experimentelle Epileptologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Mit LAC und ZNS sollen in diesem Dissertationsvorhaben zwei weitere für fokale Epilepsie zugelassene Antikonvulsiva der dritten Generation mit unterschiedlichen Wirkmechanismen im akuten Rattenschnittmodell auf elektrophysiologische und intrinsisch optische Effekte untersucht werden.

Folgende Hypothesen sollen untersucht werden:

1. LAC und ZNS reduzieren konzentrationsabhängig die durch 4-Aminopyridin induzierte epileptiforme Aktivität.
2. Die Effekte der beiden Antikonvulsiva sind nach dem Auswaschen der jeweiligen Substanz reversibel.
3. Aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen von ZNS und LAC zeigen sich differente qualitative Effekte auf die untersuchten Parameter (bestimmt durch Elektrophysiologie und optisches Signalverhalten).

4. Die Inhibition spannungsabhängiger Natriumkanäle durch LAC führt im Gegensatz zu ZNS zu einer deutlichen Reduktion des tonischen Anteils der epileptiformen Aktivität.

3 Methodik

3.1 Versuchstiere

Für die *in vitro* Experimente wurden adulte, männliche Wistar Han Ratten (Janvier; Rennes, *Frankreich*) mit einem Gewicht zwischen 230 und 360 g ($298 \pm 38,6$ g; n=45 Tiere, Gewicht von drei Tieren nicht ermittelt) und einem Alter zwischen 6 und 11 Wochen verwendet. Die Aufzucht und Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen unserer zentralen Tierzuchthaltung der Experimentellen Neurologie der Charité. Im Verlauf der Haltung wurde an den Tieren weder eine elektrophysiologische noch mechanische Manipulation vorgenommen. Die Tötung der Ratten und Präparation der Hirnschnitte fanden im Zeitraum zwischen 8 und 13 Uhr statt. Die anschließende *in vitro* Messung schloss sich für weitere 8 bis 12 Stunden an.

Da es sich bei den Experimenten um eine Tötung mit Organentnahme handelte, bestand eine Anzeigepflicht an das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin. Die Tötungsanzeige mit Kopie an den Tierschutzbund bei der Behörde erfolgte unter den Anzeigenummern T0336/12 und T0158/14. Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte gemäß dem in Deutschland geltenden Tierschutzgesetz (TierSchG, 5. Abschnitt, §7-§9 Tierversuche).

3.2 Präparation der akuten Hirnschnitte

Das für die Anfertigung der Hirnschnitte verwendete Präparier-Besteck wurde zuvor für einige Minuten im Gefrierfach gekühlt und direkt vor Beginn der Präparation bereitgelegt. Ein Becherglas diente zur kurzzeitigen Lagerung des separierten Gehirns mit 150 ml teils gefrorenem, teils flüssigem ACSF (ca. 4°C). Das ACSF wurde über ein Schlauchsystem mit einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Stickstoff (Carbogen) aufgesättigt. Die Ratten wurden in eine tiefe Isofluran-Narkose (Isofluran; Abbott Arzneimittel GmbH; Hannover, *Deutschland*) versetzt und nach Kontrolle ausbleibender Reaktionen auf Schmerzreize mittels einer Guillotine für Nagetiere (Kent Scientific, Torrington, *USA*) dekapitiert. Anschließend wurde die Haut und Unterhaut von rostral nach okzipital mit einem Skalpell entlang der Mittellinie durchtrennt. Die temporale Kaumuskulatur wurde durch zwei sagittale Schnitte durchtrennt. Nach Einschnitt des Foramen magnum mit Hilfe einer Knochenzange folgte die Mobilisierung und Entfernung der okzipitalen

Knochenschuppe. Durch vorsichtiges Durchschneiden der Sagittalnaht wurden die Parietalschuppen voneinander getrennt und nach lateral aufgeklappt. Mit einer gebogenen Präzisionspinzette wurde die Dura mater vorsichtig entfernt. Nun wurden die Frontalpole in Projektion auf die Koronarnaht mittels eines spitzen Skalpells abgesetzt. Während ein gebogener Spatel zum Herauslösen des verbleibenden Gehirns aus der Schädelgrube diente, wurden verbleibende Gefäße und Nerven der Hirnbasis mit einer feinen Schere durchtrennt. Die Präparationszeit von der Dekapitation bis zur vollständigen Separierung des Gehirns betrug für die in die Auswertung eingeschlossenen Tiere $103 \pm 16,1$ Sekunden (n=45 Tiere).

Das separierte Gehirn wurde für einige Minuten in dem Becherglas mit dem gekühltem ACSF (ca. 4°C) zur Versorgung des Gewebes und Senkung des Metabolismus aufbewahrt. Die anschließenden Schneidvorgänge waren durch das gekühlte Gewebe mit geringerer Verformbarkeit leichter durchführbar.

Währenddessen wurden die nächsten Schritte der Präparation vorbereitet. Den Untergrund der Präparation bildete eine mit Wasser gefüllte, anschließend eingefrorene und umgedrehte Petrischale, auf die ein Filterpapier positioniert wurde. Anschließend wurde das Gehirn mit der Hirnbasis nach unten zeigend vorsichtig auf das Filterpapier abgelegt und mit einer Pipette mit ACSF beträufelt.

Eine gekühlte Rasierklinge diente zum Absetzen des Kleinhirns und dem Durchtrennen der beiden Hemisphären. Beide Hemisphären wurden auf die mediane Schnittseite gedreht und mit einem Transversalschnitt der hochparietale Anteil beider Hemisphären abgetrennt. Die neu entstandene Fläche diente zur Fixierung der beiden Hemisphären-Anteile auf einen zuvor mit Klebstoff (Cyanacrylat, UHU GmbH & Co. Kg; Bühl, *Deutschland*) benetzten Sockel in der Schneidekammer.

Umgehend wurde die Schneidekammer mit eisgekühltem, Carbogen-gesättigtem ACSF (ca. 4°C) aufgefüllt, bis beide Hemisphären vollständig bedeckt waren. Während des Schneidvorgangs erfolgte die kontinuierliche Oxygenierung des ACSF mit Carbogen mittels eines Schlauchsystems.

Mit einem Präzisionsschneidegerät (Vibroslicer; World Precision Instruments; Sarasota, Florida, *USA*) wurde horizontal eine ungefähr 2 mm messende Gewebeschicht, ausgehend von der oberliegenden Hirnbasis, abgetragen. Anschließend erfolgte die Anfertigung von 400 µm dicken Hirnschnitten, in denen der Hippocampus transversal zur Darstellung kam. Mit einem kleinen Pinsel und Löffel wurden die angefertigten Schnitte von der Schneidekammer in die Interfacekammer transferiert. Als Ablage dienten mit 0,4

µm dicken, transparenten Membranen (Milicell-CM, Milipore, Bedford; UK) beklebte Platinrahmen.

3.3 Aufbau der Aufbewahrungs- und Messkammer

Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Interfacebedingungen. Die Schnitte befanden sich in den Kammern auf den Membranen zwischen flüssiger und gasförmiger Phase. Der Versuchsaufbau inklusive der Messvorrichtung ist in Abbildung 3-1 skizziert. Die beiden Perfusionskammern befanden sich als Hohlraum eingelassen in einem Plexiglaszylinder. Ein weiterer den Zylinder ausfüllender Hohlraum unterhalb der Kammern wurde zur Hälfte mit destilliertem Wasser, welches kontinuierlich mit Carbogen aufgesättigt wurde, aufgefüllt. Eine Heizspirale an der inneren Wand des Hohlraumes erwärmte das Wasser auf $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Ein Temperaturfühler diente der Kontrolle. Das aufsteigende wasserdampfgesättigte Gas stieg über in der Seite der Kammer befindliche Belüftungsschlitze in diese auf und bildete die gasförmige Phase.

Die flüssige Phase wurde durch ACSF gebildet, welches über eine Perfusionspumpe kontinuierlich (1,5 - 2 ml/min) in die Kammern floss. Zwei separate Schlauchsysteme ermöglichten die voneinander unabhängige Perfusion der Kammern mit verschiedenen Lösungen.

Ein Wasserbad wärmte das ACSF auf ca. $36,5^\circ\text{C}$. Der Wärmeverlust entlang des Schlauchsystems wurde durch den Verlauf innerhalb des gewärmten, destillierten Wassers des Plexiglaszylinders kompensiert. Regelmäßige Kontrollen mit einem Messfühler in den Kammern bestätigten Temperaturen der flüssigen Phase von $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Ein Ablaufsystem am anderen Ende der Kammer garantierte einen kontinuierlichen und annähernd gleichmäßigen Durchfluss. Die verbrauchte Lösung wurde in einem Auffangbehälter gesammelt und entsorgt.

Die beiden Kammern lassen sich in eine Aufbewahrungs- und eine Messinterfacekammer unterteilen. Die Aufbewahrungskammer kann bis zu vier Schnitte, auf Membranen liegend, beinhalten und wurde über das gesamte Experiment mit ACSF versorgt. Für die Reduktion von Temperaturschwankungen, eine hohe Carbogengassättigung und zum Schutz vor Austrocknung wurde die Aufbewahrungskammer mit einem Kissen aus Zellstoff abgedeckt.

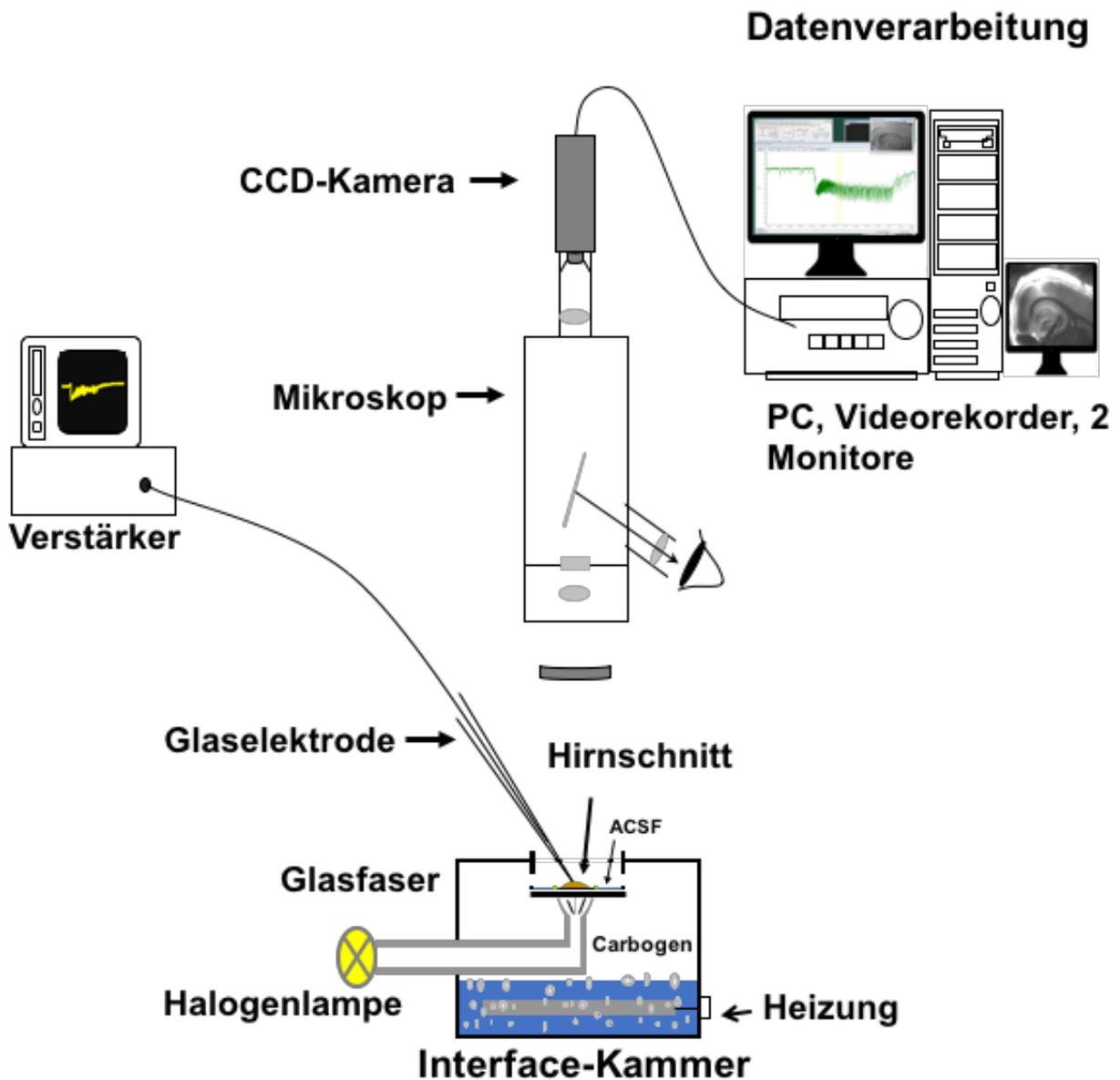


Abbildung 3-1: Versuchsaufbau skizziert: In der Interfacekammer liegt auf einer Biomembran und perfundiert von Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) der zu untersuchende Hirnschnitt. Unter diesem befindet sich Wasser, welches mit Carbogen gesättigt und durch eine Heizung auf ca. 36° C erwärmt wird. Eine Halogenlampe erzeugt das Licht, welches mittels Glasfaserkabel und durch ein Prisma zur horizontalen Durchleuchtung den Hirnschnitt erreicht. Der Hirnschnitt wird durch ein Mikroskop mittels CCD-Kamera für das intrinsisch optische Signal untersucht. Eine Glaselektrode dient im entorhinalen Cortex zur extrazellulären Summenpotentialmessung. Das elektrophysiologische Signal wird anschließend über einen Verstärker empfangen und an den Rechner zur Digitalisierung weitergeleitet. Mittels Spike2 lassen sich so im Verlauf die AE auf einem Monitor beobachten. Ein weiterer Monitor gibt ein vergrößertes Bild des durchleuchteten Schnittes wieder. (modifiziert nach Dr. med. Katharina Buchheim † und Dr. med. Florian Weissinger, frühere Mitarbeiter der AG Klinische und experimentelle Epileptologie an der Charité.)

Die Messkammer diente im Anschluss der Präparation ebenfalls für die Inkubationszeit als Aufbewahrungskammer und wurde mit Beginn der Messungen mit dem Zusatz von 4-AP zu dem ACSF perfundiert. Die Messkammer beinhaltete zu jeder Zeit nur einen Schnitt und war während der Messungen nicht abgedeckt.

3.4 Perfusionslösungen

Je drei verschiedene Perfusionslösungen wurden in den Experimenten im 4-AP Modell genutzt: eine Lösung zur Aufrechterhaltung der Viabilität (Inkubationslösung), eine Lösung zum Auslösen der AE (Induktionslösung) und eine Lösung zur Untersuchung der Medikamentenwirkungen (Medikamentenlösung).

Die Grundlage jeder Lösung war das ACSF, welche als künstliche Nährlösung und Liquor-Ersatz den Schnitt mit ausreichenden Metaboliten versorgt. Die Herstellung erfolgte in unserem Labor und orientierte sich an der Zusammensetzung des Liquors der Ratte. Folgende Inhaltsstoffe und Konzentrationen wurden verwendet (Angaben in mM): NaCl 129,0; 3,0 KCl; MgSO₂ 1,8; NaH₂PO₄ 1,25; NaHCO₃ 21,0; (alle Chemikalien Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, *Deutschland*) CaCl₂ 1,6 (Merck KGaA; Darmstadt, *Deutschland*) und Glucose 10,0 (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, *USA*).

Die Osmolalität lag im physiologischen Bereich mit $300,2 \pm 2,5$ mosmol/kg für ACSF und $300,4 \pm 2,6$ mosmol/kg für 4-AP (n=45 Experimente). Ein Osmometer (Osmomat 3000; Gonotec, Berlin, *Deutschland*) diente der Bestimmung. Stichprobenartige pH-Kontrollen mit einem pH-Meter (Mettler-Toledo; Columbus, Ohio, *USA*) zeigten pH-Werte von $7,40 \pm 0,3$ (n=6 Experimente).

Für die Induktion epileptiformer Aktivität über die 3-stündige Messung wurde das ACSF mit 4-AP (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, *USA*) in einer Konzentration von 100 µM angereichert (Induktionslösung) und dem Schnitt in der Messkammer zugesetzt. Um die Wirkung von LAC (Toronto Research Chemicals; Toronto, *Kanada*) und ZNS (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, *USA*) zu untersuchen, wurde eines der beiden Medikamente während der zweiten Stunde des Experiments der Induktionslösung hinzugefügt. Methanol (0,1-0,3 ‰) diente als Lösungsmittel für LAC. Um Effekte von Methanol auszuschließen, wurden die Messungen der Kontrollgruppe (n=9) mit Messungen mit Methanol 1 ‰ (Merck KGaA; Darmstadt, *Deutschland*) (n=3) bei sonst gleichen Bedingungen verglichen. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Inkubationslösung	ACSF
Induktionslösung	ACSF + 100 μ M 4-AP
Medikamentenlösung	ACSF + 100 μ M 4-AP + Medikament

Tabelle 3-1: Darstellung der Zusammensetzung der 3 genutzten Lösungen. Die Inkubationslösung dient zur Inkubation für mindestens 1 Stunde. Die Induktionslösung wird in der Kontrollgruppe über 3 Stunden, in den Medikamentengruppen in Stunde 1 und 3 eingesetzt. Während der Intervention wird die Medikamentenlösung in die Messkammer eingebracht.

3.5 Versuchsprotokoll

Die Effekte von LAC und ZNS auf AE *in vitro* wurden im akuten Rattenhirnschnittmodell elektrophysiologisch und optisch erfasst. Es wurden kombinierte hippocampal-entorhinale Hirnschnitte in einer horizontalen Ebene von Wistar Han Ratten angefertigt. Die Induktion epileptiformer Aktivität erfolgte durch 4-AP (Kito et al., 1996). Anschließend erfasste eine kontinuierliche elektrophysiologische Messung des entorhinalen Cortex die epileptiforme Aktivität. Die intrinsisch optische Messung zeichnete den Anfallsursprung und die Ausbreitung der Erregung auf. Um konzentrationsabhängige Effekte der Medikamente zu untersuchen, wurden je drei verschiedene Konzentrationen für LAC (10 μ M, 33 μ M, 100 μ M) und ZNS (33 μ M, 100 μ M, 300 μ M) eingesetzt und mit einer Kontrollgruppe ohne Medikament verglichen. Die Konzentrationen wurden nach Literaturrecherchen von klinischen und experimentellen Studien ausgewählt (Kumagai et al., 1993, Lees et al., 2006, Thone et al., 2008). Die Messdauer pro untersuchtem Hirnschnitt betrug 180 Minuten und teilte sich in drei gleich große Abschnitte zu je 60 Minuten (Abbildung 3-2). Innerhalb der ersten Stunde wurden Anfälle durch 4-AP induziert, die ungefähr 40 Minuten nach Messbeginn eine stabile Phase erreichten. Anschließend wurde für 60 Minuten das Medikament dem Hirnschnitt hinzugegeben. In der letzten Stunde wurde durch den Entzug des Medikaments die Reversibilität der Wirksamkeit untersucht.

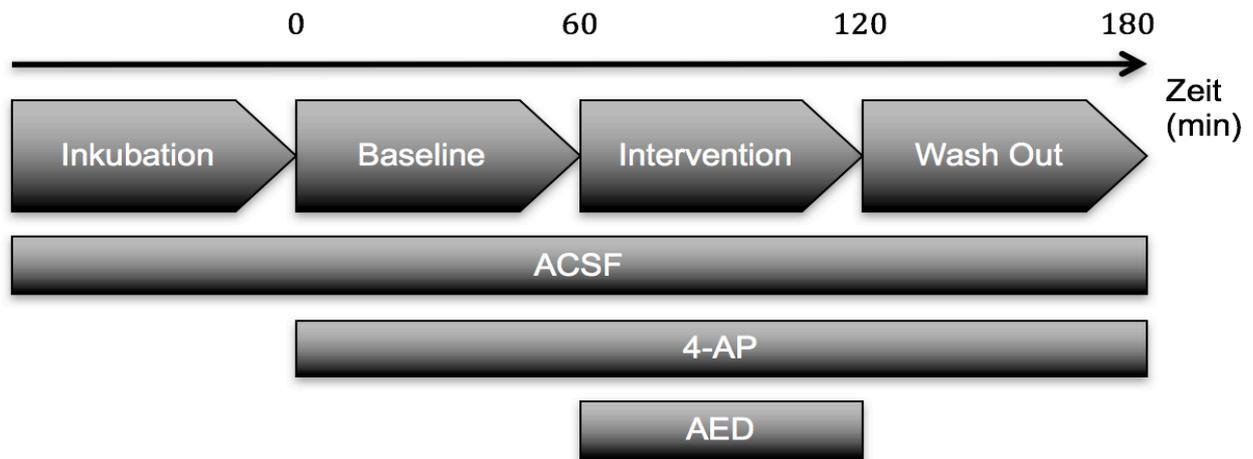


Abbildung 3-2: Versuchsprotokoll mit der Inkubation von mindestens 60 Minuten und der anschließenden 180-minütigen Messung mit den drei je 60 Minuten dauernden aufeinanderfolgenden Phasen: Baseline, Intervention und Wash out. Während der gesamten drei Stunden ist der Schnitt unter Interfacebedingungen ACSF und 4-AP ausgesetzt. Hinzu kommt für die 2. Stunde zusätzlich das AED (LAC oder ZNS) in einer von drei möglichen Konzentrationen. In der Kontrollgruppe entfiel das AED, in der Methanolgruppe wurde der Induktionslösung 1‰ Methanol für die Zeit der Intervention hinzugefügt.

3.6 Elektrophysiologische Messinstrumente

3.6.1 Messelektrode

Zur Messung der elektrophysiologischen Aktivität wurde eine Glaselektrode genutzt. Mittels eines Elektrodenziehgeräts (PC-10; Narishige-group; London, UK) wurde diese aus einem einlumigen Borosilikatglas (GB150F – 8P; Science products GmbH, Hofheim, Deutschland) ausgezogen. Mit einer feinen Pipette wurde das Kapillarlumen mit 150 mM NaCl-Lösung zur Hälfte aufgefüllt. Ein chlorierter Silberdraht diente als Verbindung zwischen dem NaCl-haltigen Wasser der Glaselektrode und einem Verstärker. Zur Fixierung des Silbernitratdrahtes verschlossen wir das Kapillarlumen mit erwärmten Dentalwachs.

3.6.2 Stimulationselektrode

Eine doppellumige Thetaglas-Kapillare wurde zur Herstellung einer bipolaren Reizelektrode verwendet. Sie wurde mittels Elektrodenziehgerät ausgezogen und auf einen breiten Durchmesser von ca. 0,1 mm zurückgebrochen. Zwei Silberdrähte wurden mit je einem Platin-Iridium-Draht verlötet (Goodfellow; Cambridge, UK) und in die beiden Lumen eingebracht. Die so separierten Platindrähte ragten in einem Abstand von maximal 0,1 mm voneinander an der Kapillarspitze heraus. Dentalwachs diente der

Fixierung der Drähte an beiden Enden der Elektrode. Die herausragenden Platindrähte wurden mittels Schere auf 3 mm gekürzt.

3.6.3 Viabilitätsprüfung

Die Viabilitätsprüfung erfolgte direkt vor der Messung an dem in der Messkammer liegenden Schnitt. Die Stimulationselektrode und Messelektrode wurden an magnetisch am Labortisch fixierten Mikromanipulatoren eingebracht. Die Stimulationselektrode wurde im Bereich der Schaffer-Kollateralen in der Region CA3 in den Schnitt eingebracht und die Messelektrode in die Pyramidenzellschicht der hippocampalen Region CA1. Die Überprüfung der Viabilität erfolgte durch die Stimulation der Schaffer-Kollateralen durch einen Stimulusisolator. Die Reizdauer, Art und Frequenz des Stimulus konnte über ein programmierbares Reizgerät (Master-8; A.M.P.I.; Jerusalem, *Israel*) angesteuert werden. Die anschließende Ableitung des Feldpotentials mit der Messelektrode im Bereich CA1 wurde über eine Verstärkung des Signals (Differenzverstärker, Zwischenverstärker, Eigenbau des Instituts) auf einem Speicheroszilloskop (HM305; HAMEG; Frankfurt a. M., *Deutschland*) dargestellt. Ein Digitalwandler (Micro 1401 analog digital converter, Cambridge Electronic Design Limited; Cambridge, *UK*) ermöglichte die Speicherung der Daten mittels der Computersoftware (Signal3, Cambridge Electronic Design Limited; Cambridge, *UK*).

Die Stimulation wurde aufsteigend mit einer Spannung von 2V bis 10V appliziert. Bei fehlender Antwort folgte die Kontrolle und gegebenenfalls Korrektur der Elektrodenpositionen. Ein messbarer Populationsspike von 2 mV oder mehr diente als Kriterium für die Viabilität des Schnittes, welches zweimalig nach je 10 Sekunden zu reproduzieren war (Abbildung 3-3). Die Stimulationsantwort wurde auf unserem Laufwerk gesichert und der Schnitt zur Messung verwendet. Wurde keine oder eine Antwort mit zu kleiner Amplitude gemessen, wurde der Schnitt verworfen und ein anderer Schnitt aus der Aufbewahrungskammer in die Messkammer transferiert.

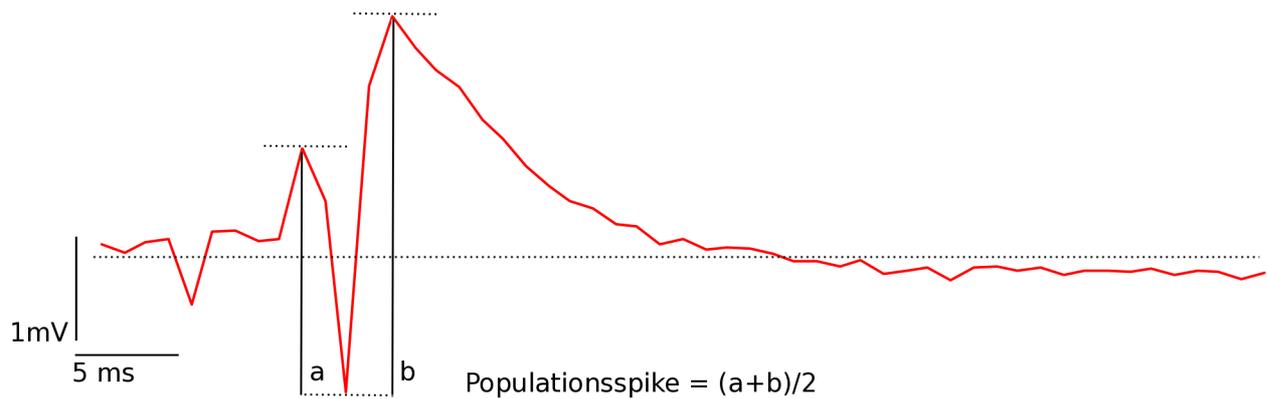


Abbildung 3-3: Elektrophysiologische Aufnahme einer Stimulation mit 7 V im Bereich CA3 mit Ableitung in der Pyramidenzellschicht im Bereich CA1. Die Aufzeichnung erfolgte mittels der Software „Signal“. In diesem Beispiel wurde eine ausreichende Reizantwort von mehr als 2 mV erzeugt, so dass der Schnitt in die anschließende Messung einbezogen wurde (Abtastrate 1000 Hz).

3.7 Messung

3.7.1 Elektrophysiologische Messung

Nach bestandener Viabilitätskontrolle wurde die Stimulationselektrode aus dem Schnitt entfernt und die Messelektrode in die tiefen Schichten (IV/V) des lateralen entorhinalen Cortex in einem Winkel von 30° zur Senkrechten ungefähr 100 µm tief eingebracht (Abbildung 3-4). Die Glaselektrode registrierte Änderungen des extrazellulären Feldpotentials in Form von Potentialschwankungen durch die Depolarisation von Neuronen, vergleichbar mit denen eines Elektroenzephalogramms (EEG). Ein Differenzverstärker zwischen Elektrode und Speicheroszilloskop verstärkte das Signal um das 1000-fache. Anschließend wurde das analoge Signal mit einem A/D-Wandler digitalisiert und über die Software Spike2 Version 7.0 auf dem Computer gespeichert. So ließen sich Spikes und Bursts von Beginn der Aufzeichnung an beobachten, welche auf eine erhaltene Viabilität hinwiesen. Nach 10 bis 40 Minuten setzten AE ein, die sich im Verlauf in Dauer und Frequenz stabilisierten.

Die Software Spike2 (Cambridge Electronic Design Limited; Cambridge, UK) zeichnete kontinuierlich die Aktivität auf. Nach Einbringen der Induktionslösung wurde die Aufnahme mit Spike2 gestartet. Erste AE traten nach 25 ± 10 Minuten ($n=49$ Hirnschnitte) auf. Diese konnten in drei Phasen, Phase der Potentialnegativierung – tonische Phase – klonische Phase, unterteilt werden (Abbildung 3-5). Die Messung an einem Hirnschnitt wurde nur fortgesetzt, wenn folgende elektrophysiologische Kriterien erfüllt wurden: 1) Feldpotentialabfall von mindestens 0,1 mV, 2) hochfrequente Potentialschwankungen nach Potentialabfall (tonische Phase) 3) Dauer von mindestens 15 Sekunden 4)

Erreichen einer stabilen Phase mit regelmäßiger Inzidenz und Dauer der AE 5) Abwesenheit von AE-beeinflussende Spreading depressions.

Spreading depressions (SD, auch Spreading depolarization), erstmals von Leão 1944 beschrieben, beschreiben das Phänomen einer sich ausbreitenden Abnahme elektrischer Aktivität (engl. Depression), welche unter pathologischen Konditionen, z.B. Traumata, Epilepsie, Hypoglykämie, entstehen kann. SD führen zum Verlust der Ionen-Homöostase, Veränderung der vaskulären Reaktion und der synaptischen Struktur (Leao, 1947). Es kommt zu einer massiven Umverteilung von extrazellulären Ionen und Wasser (Hansen und Zeuthen, 1981). Auch *in vitro* führen die Ischämie während der Präparation, das Niedrig-Magnesium-Modell und das 4-AP-Modell in hippocampalen Strukturen zu SD (Avoli et al., 1991, Psarropoulou und Avoli, 1993). Diese lassen sich durch extrazelluläre Feldpotentialmessungen und durch intrinsisch optische Messungen erfassen. Durch die zahlreichen zellulären Veränderungen resultiert eine verlängerte Refraktärzeit, die die Untersuchung von Medikamenteneffekten bei Auftreten von SD erschwert.

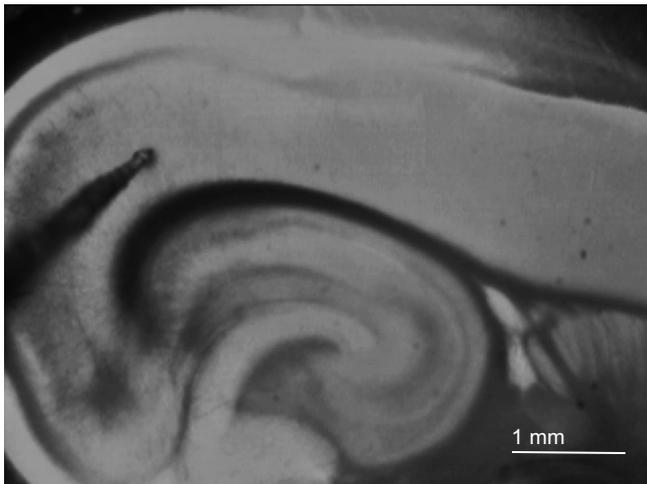


Abbildung 3-4: Bild eines Hirnschnittes mit einer im lateralen entorhinalen Cortex positionierten Elektrode. Der kombinierte hippocampal-entorhinale Hirnschnitt stammt aus der rechten Hirnhemisphäre.

3.7.2 Intrinsisch optische Messung

Als intrinsisch optisches Signal (IOS) wird die aktivitätsabhängige Änderung optischer Eigenschaften des Gewebes bezeichnet. Im Gegensatz zu extrinsischen optischen Signalen wird hier auf den Einsatz von Hilfsmitteln wie Farbstoffen zum Einfärben verzichtet. Durch die Aufzeichnung des gesamten Hirnschnittes kann die epileptische Aktivität detektiert und so auf den Einsatz multipler Elektroden verzichtet werden. Durch

diese Form der nicht-invasiven Bildgebung können Anfallsursprung, Ausbreitung, Änderung der Lichttransmission und Größe der betroffenen Fläche exakt bestimmt werden.

Für die Messung des intrinsisch optischen Signals wurde eine CCD Kamera (8 bit, Sanyo, Osaka, Japan) verwendet (engl.: charged coupled device (CCD)). Ein Fototubus (Leica Camera AG; Wetzlar, *Deutschland*) hielt die Kamera und ermöglichte die Aufnahme im senkrechten Winkel von oben. Ein binokulares Objektiv diente der Beobachtung des Schnittes und ermöglichte je nach Wahl eine 1,6-, 2,5- und 4,0-fache Vergrößerung des Schnittes. Für die Aufnahmen des IOS-Signales wurde die 2,5-fache Vergrößerung genutzt. Um dem Schnitt ausreichend Licht zuzuführen, wurde dieser von unten mittels stabilisierter und spannungsregulierter Halogenlampe als Kaltlichtquelle durchleuchtet (KL 1500 electronic; Scott, Wiesbaden, *Deutschland*). Ein direkt unter dem Schnitt in der Messkammer eingelassener gebogener Glasstab (\varnothing 8 mm) gewährleistete eine homogene Durchleuchtung des Schnittes. Das Licht wurde ungefiltert über Glasfasern bis zum Boden der Messkammer geleitet. Der Lichtstrahl verlief anschließend durch das Plexiglas, die transparente Biomembran und den Schnitt. Ein Videomonitor zeigte kontinuierlich das durch die CCD-Kamera aufgenommene Bild. Aufgrund der anfallenden großen Datenmengen erfolgte die Aufzeichnung der Bildsequenzen nicht kontinuierlich. Sie wurde manuell gestartet, sobald in der elektrophysiologischen Messung ein AE auftrat. Die Bildsequenzen wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Grabvarcal auf der Festplatte des Computers gespeichert. Eine Video-Digitalisierungskarte (Video-Grabber Karte PCI Grabber 4+, Phytec GmbH, *Deutschland*) diente der Umwandlung des analogen in ein digitales Videosignal. Die Transmissionsänderung beginnt dabei kurz nach dem Einsetzen der elektrophysiologisch gemessenen Aktivität (Meierkord et al., 1997, Weissinger et al., 2000). Eine von uns auf 100 Bilder festgelegte Sequenz für die vollständige zeitliche Erfassung speicherte und löschte die Software in einem „first in – first out“-Puffer. Sobald eine Aufnahme gestartet wurde, wurden die zuletzt gesicherten 100 Bilder vor die folgende Aufnahme angefügt. Bei einer ungefähren Bildfrequenz von 10 Bildern pro Sekunde ermöglichte dies eine retrospektive Aufnahme von 10 Sekunden vor dem Start. So konnten auch AE mit dem Ursprungsort außerhalb des entorhinalen Cortex, die erst mit der Ausbreitung zum entorhinalen Cortex elektrophysiologisch erfasst wurden, ausreichend früh durch das optische Signal entdeckt werden.

Die Auflösung der Bilder beträgt 320 x 240 Pixel, dabei entsprachen 57 Pixel einem Millimeter. Jedem Pixel wurde eine von 256 verschiedenen Graustufen pro Bild

zugeordnet. Die Aufnahmen enthielten zwischen 500 und 1.800 Bilder, entsprechend 50 bis 180 Sekunden, und wurden entsprechend der Dauer vorheriger Anfälle gewählt.

3.8 Datenerfassung und Analyse

Die elektrophysiologische Datenerfassung erfolgte kontinuierlich mit Hilfe des Programms Spike2. Die optischen Signale der AE wurden initial durch ein hauseigenes Programm (Grabvarcal) aufgezeichnet. Für die Analyse aller Daten wurde Matlab verwendet (Version 8.6, The MathWorks; Natick, Massachusetts, USA), für die optischen Daten zusätzlich ImageJ/FIJI (Schindelin et al., 2012).

3.8.1 Elektrophysiologische Daten

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Daten wurden die erfassten Datensätze in MAT-Dateien konvertiert. Die weitere Auswertung wurde mittels der Software Matlab und einem hauseigenen Skript zur Standardisierung der Auswertung durchgeführt. Die Funktionsweise des Programms wird im Folgenden beschrieben und so die auszuwertenden Parameter näher erläutert. Elektrophysiologisch wurde die Gesamtheit aller AE für alle 180-Minuten dauernden Messungen ausgewertet.

3.8.1.1 Identifizierung anfallsartiger Ereignisse mit Matlab

In einem ersten Schritt wurde die Nulllinie der Aktivität geglättet. Während einer 180-minütigen Aufnahme konnte es zu langsamen Drifts des Feldpotentials kommen, die die Grundlinie im Verlauf um mehrere mV verschoben. Die Glättung erfolgte durch das Setzen von Punkten innerhalb des 180-minütigen Aufzeichnung, die als Nullpunkt definiert waren (Abbildung 3-6). Im nächsten Schritt wurden Ausschläge über eine gewählte Standardabweichung registriert und dienten dem Identifizieren von AE (Abbildung 3-7). Eine optische Plausibilitätskontrolle folgte. Schließlich wurden die AE aus der ursprünglichen Aufzeichnung isoliert (Abbildung 3-8).

3.8.1.2 Frequenz und Dauer des anfallartigen Ereignisses

Der Startpunkt wurde nach Highpass-Filterung des AE durch die Negativabweichung der Baseline um mehr als das 1,5-fache der Standardabweichung festgelegt und optisch auf Plausibilität geprüft (Abbildung 3-9). Der Endpunkt wurde gesetzt als letzter Punkt der einfachen Standardabweichung des AE und optisch auf Plausibilität kontrolliert (Abbildung 3-10). So konnten der Startpunkt in Bezug auf die gesamte Aufzeichnung erfasst und die Inzidenz und damit die Auftretshäufigkeit und die Frequenz der epileptiformen Ereignisse ermittelt werden. Eine AE-Frequenz wird jedem ausgewerteten AE zugeordnet. Sie ist definiert als der Kehrwert der Periodendauer des betrachteten AE zu dem Vorangegangenen in Minuten und wurde in der Einheit min^{-1} angegeben. Bei einer vollständigen Blockade der AE während der Intervention wurde die Frequenz für die Intervention mit 0 min^{-1} festgelegt.

Die AE-Dauer ließ sich in Kombination mit dem Endpunkt des Ereignisses ermitteln:

$$\text{Dauer} = t_{\text{Endpunkt}} - t_{\text{Startpunkt}}.$$

3.8.1.3 Amplitude

Der maximale Abfall von der Nulllinie zum Beginn des AE beschreibt die Amplitude. Durch Setzen eines Markers im Bereich des niedrigsten Punktes wird die Differenz zum vorher gewählten Startpunkt auf der Nulllinie gebildet und als Betrag in mV ausgegeben (Abbildung 3-9). Die Amplitude hängt direkt von der Anzahl synchron involvierter Neuronen ab und fällt im Verlauf längerer Aufnahmen am ehesten durch die abnehmende Anzahl an vitalen Neuronen aufgrund der nicht physiologischen Bedingungen.

3.8.1.4 Tonische Phase

Im AE folgt auf die initiale Potentialnegativierung eine auftretende hochfrequente Oszillation (um 10-25 Hz). Diese hält einige Sekunden an und geht in eine Oszillation niedrigerer Frequenz ($<10 \text{ Hz}$) mit größeren Ausschlägen über (Abbildung 3-5). In Verknüpfung mit den motorischen Komponenten bei epileptischen generalisierten tonisch-klonischen Anfällen *in vivo* wird die hochfrequente Phase als tonische und die niederfrequente als klonische Phase bezeichnet (Matsumoto und Marsan, 1964).

Nach der initialen Potentialnegativierung wurde der Beginn der tonischen Phase mit dem Überschreiten einer Spikefrequenz von 10 Hz definiert (Abbildung 3-12). Die Spikes

innerhalb der AE wurden mittels Highpass-Filter und einer Schwellenwertdetektion (Standardabweichung) erkannt (Abbildung 3-11). Die Standardabweichung wurde nach optischer Plausibilitätskontrolle manuell angepasst. Das Ende der tonischen Phase wurde beim folgenden erstmaligen Unterschreiten einer Frequenz von 5 Hz festgelegt. Die festgelegten Grenzwerte für die Beschreibung der Phasen beruhen auf einer optischen Plausibilitätskontrolle. Die tonische Phase wurde absolut in Sekunden und als relative tonische Phase im Verhältnis zu der Dauer des AE beschrieben.

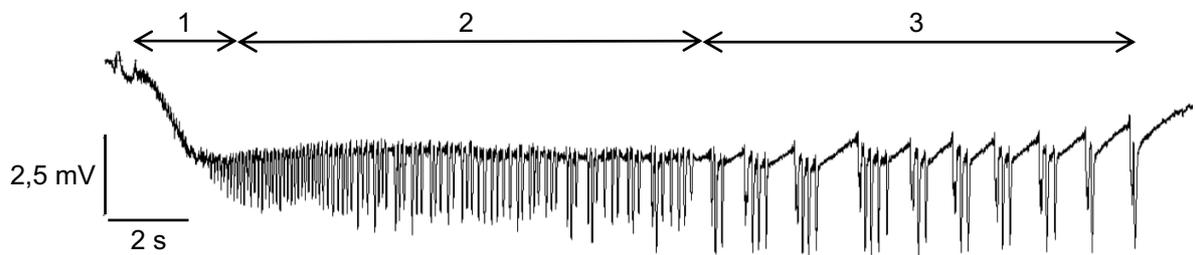


Abbildung 3-5: Die Unterteilung eines elektrographisch aufgezeichneten AE in drei Phasen: 1) Initiale Potentialnegativierung, 2) Tonische Phase, 3) Klonische Phase.

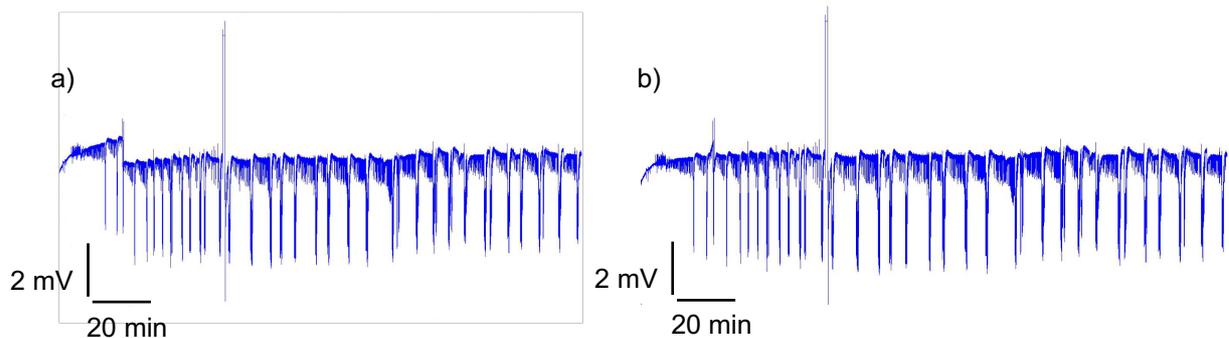


Abbildung 3-6: Die elektrographische Aufnahme über 180 Minuten mit wiederholten AE. Vor Glättung der Drifts (a) und nach erfolgter Glättung (b)). Durch die Glättung lassen sich mittels der Standardabweichung der Spannung die AE registrieren.

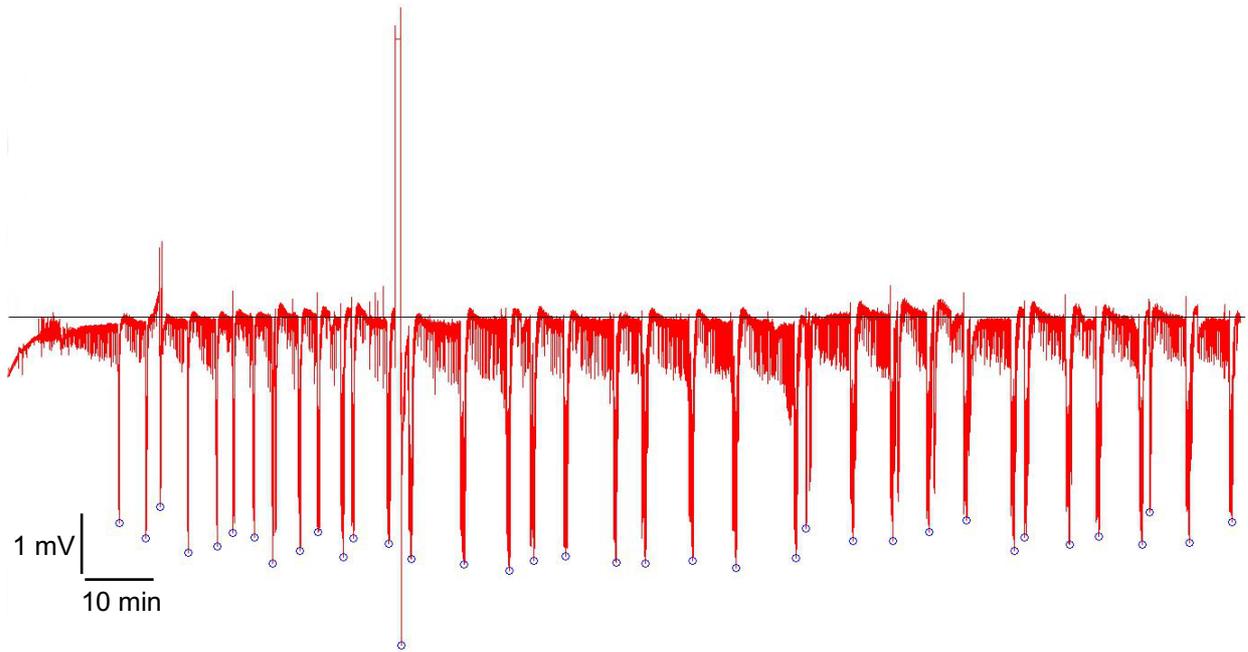


Abbildung 3-7: Die Registrierung der AE mittels der zweiten Standardabweichung der Spannung. Die so registrierten AE wurden mittels blauen Kreisen markiert. In diesem Beispiel wurden 37 AE registriert, von denen 36 tatsächlichen AE entsprachen und ein Artefakt initial eingeschlossen wurde.

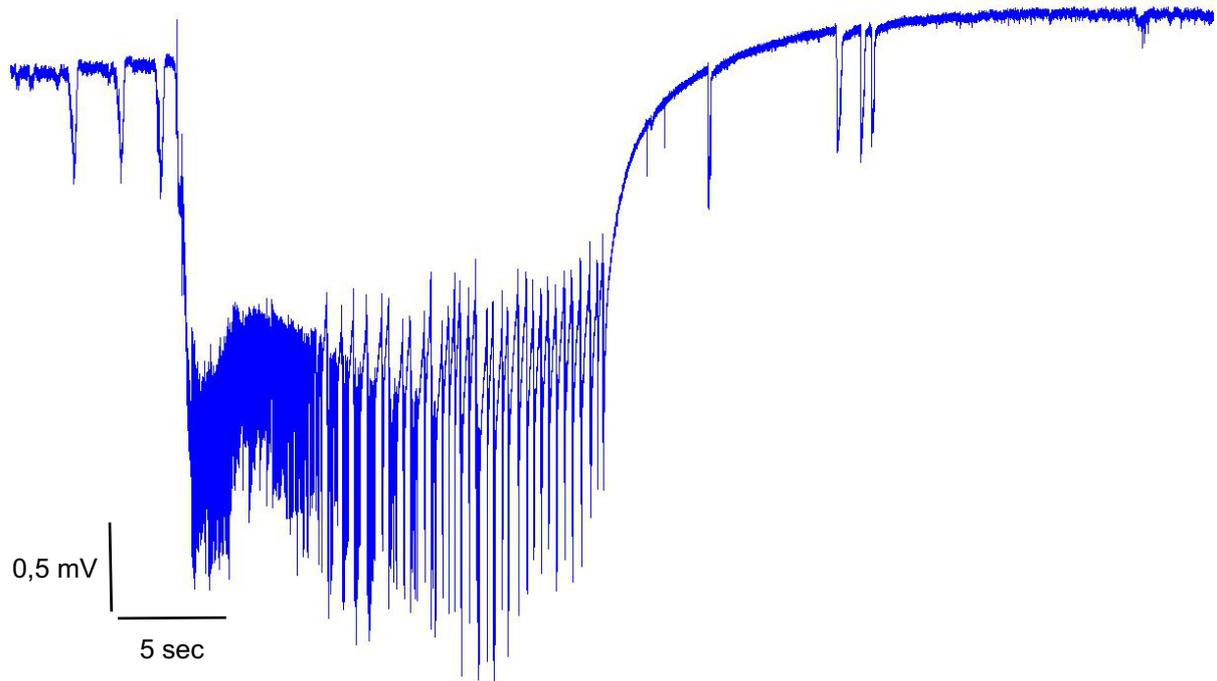


Abbildung 3-8: Ein einzelnes isoliertes AE aus dem zuvor (Abbildung 3-7) dargestellten Experiment. Jedes einzelne der AE wurde nach initialer Registrierung optisch kontrolliert und nur im Falle der Erfüllung der gesetzten Kriterien für ein AE eingeschlossen. Dieses AE wurde in die weitere Auswertung einbezogen.

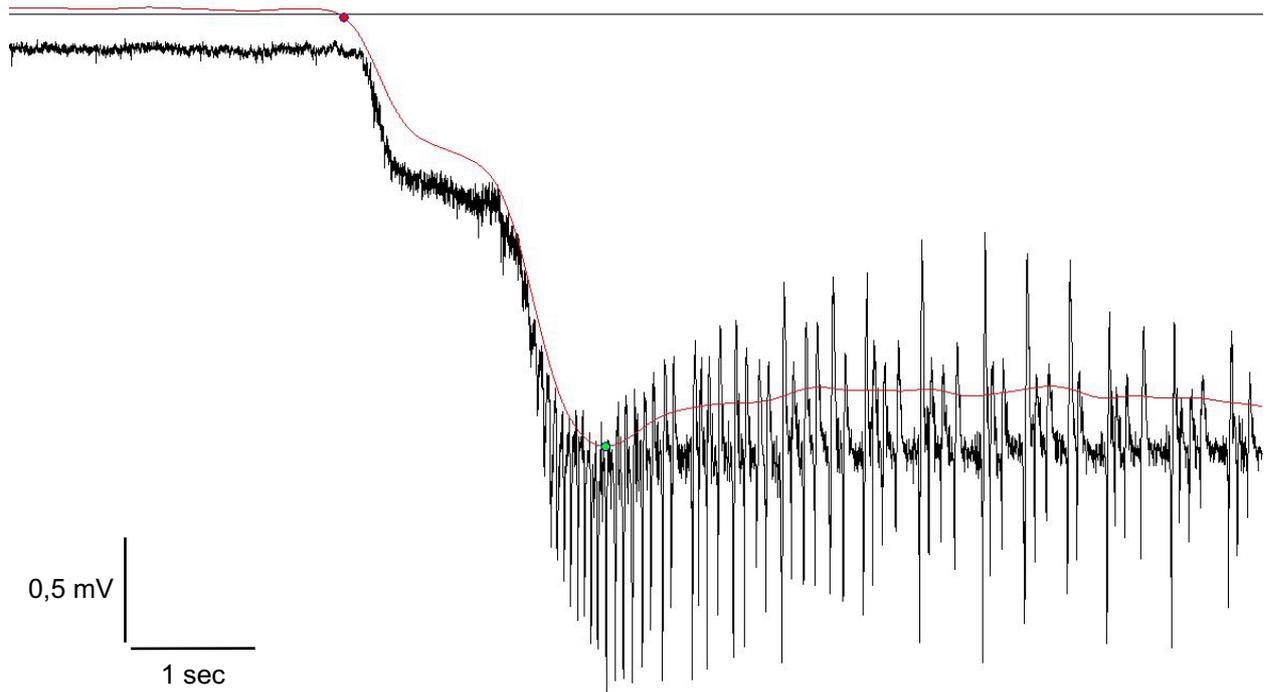


Abbildung 3-9: Die Festlegung des Beginns des AE mit dem Beginn der initialen Potentialnegativierung mittels Matlab. Gleichzeitig setzt der Computer nach einem Lowpass-Filter zusätzlich den negativsten Punkt nach initialer Potentialnegativierung. Durch diesen und den Startpunkt lassen sich sowohl die Höhe der Amplitude in mV als auch der Beginn des AE in Bezug auf das Experiment und in Bezug auf die Dauer des AE berechnen.

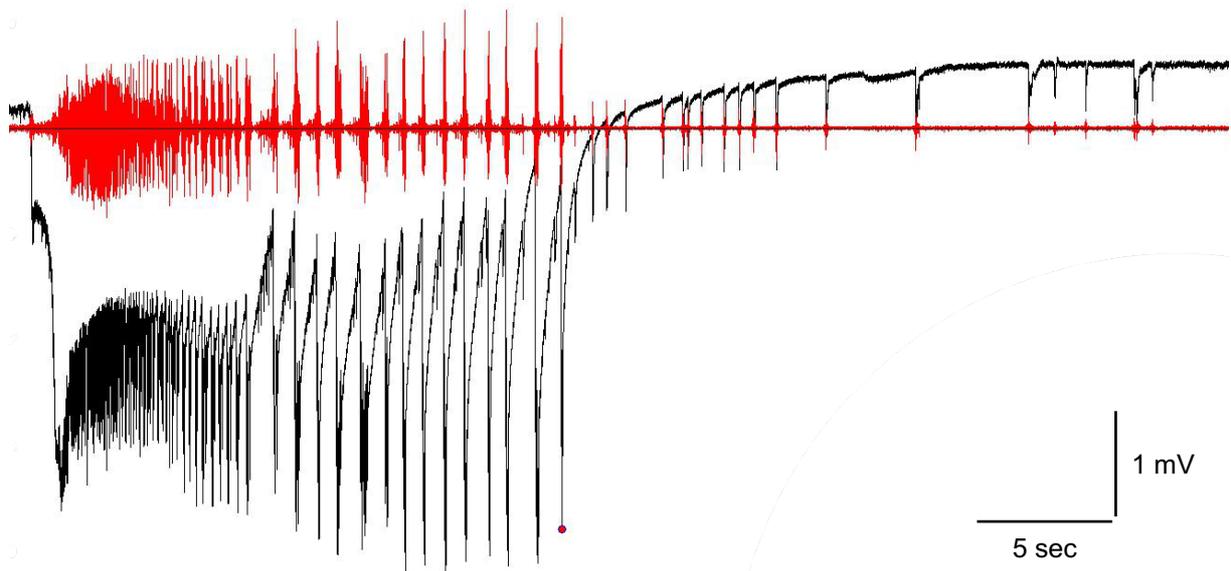


Abbildung 3-10: Die Festlegung des AE-Endes erfolgt semiautomatisch anhand des dargestellten AE (schwarz) nach Highpass-Filterung (rot). Mittels Standardabweichung bestimmt Matlab den letzten Spike des AE (roter Punkt). Mittels optischer Kontrolle war bei falscher Festlegung des Endpunkts eine manuelle Einstellung möglich. Der Endpunkt dient mit dem zuvor ermittelten Startpunkt zur Berechnung der Dauer des einzelnen AE.

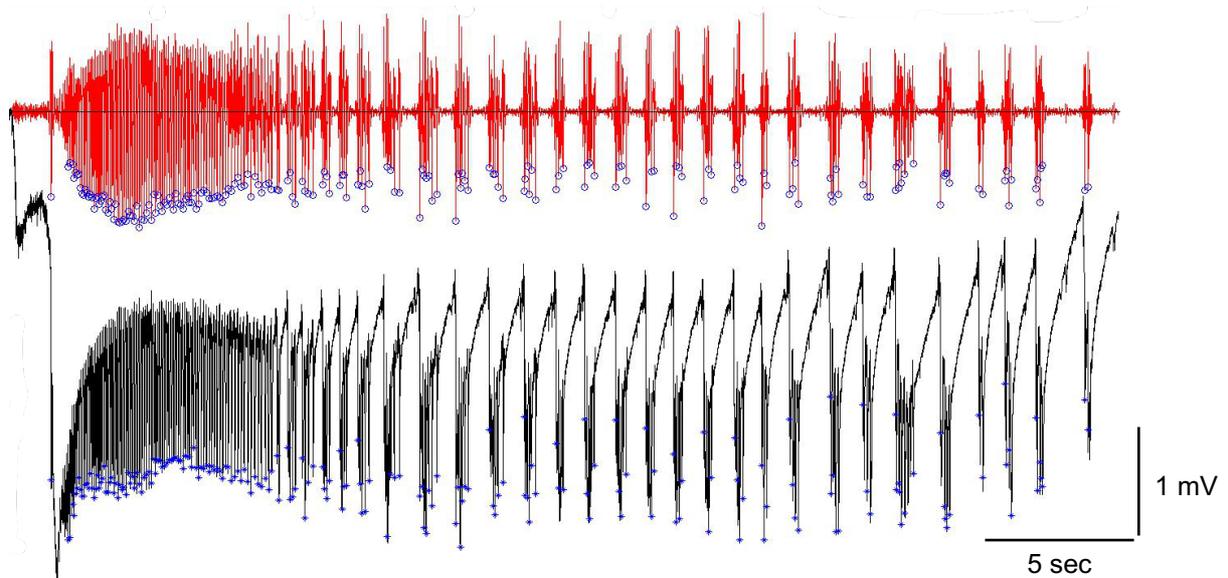


Abbildung 3-11: Ein isoliertes AE vor (schwarz) und nach Highpass-Filterung (rot). Mittels der Standardabweichung nach Highpass-Filterung konnten so die einzelnen Spikes (blaue Punkte/Kreuze) registriert werden. Über die Spikes ließ sich in einem folgenden Schritt die Frequenz der Oszillation bestimmen.

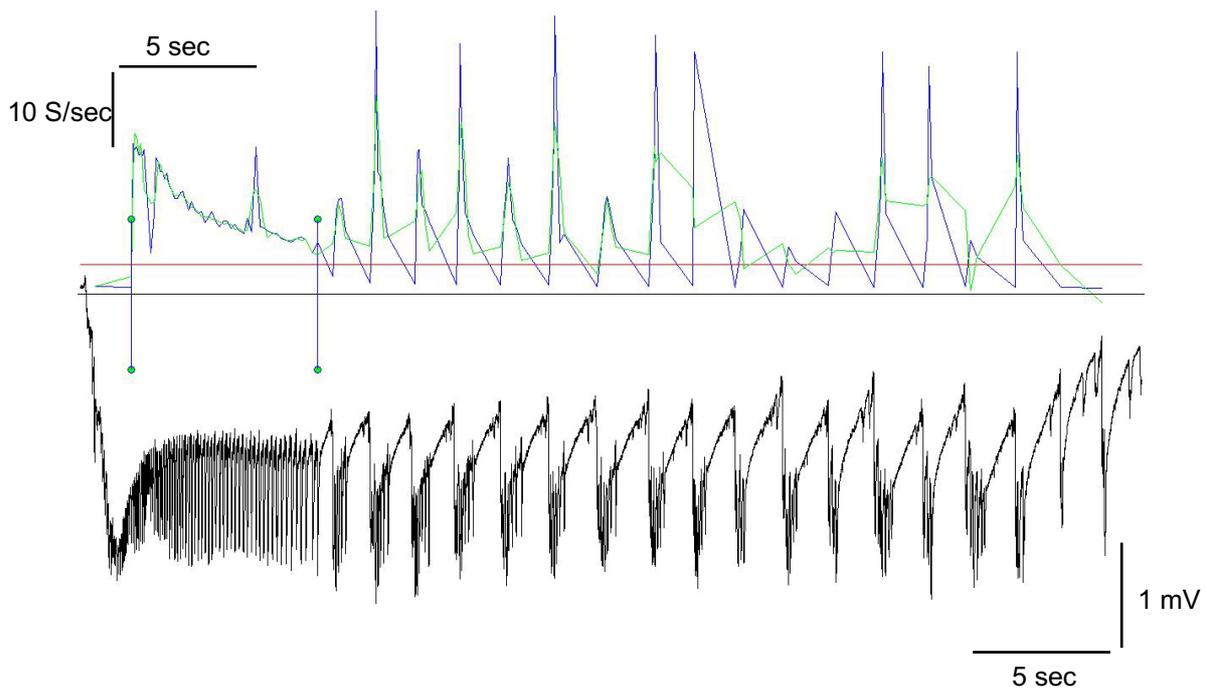


Abbildung 3-12: Berechnung der Frequenz eines AE über die Zeit. Im unteren Bildabschnitt ist das ursprüngliche AE nach Lowpass-Filter in schwarz zu erkennen. Oben wird die jeweilige Frequenz der Spikes (S) über die Zeit angezeigt. Die rote Horizontale entspricht der Spikefrequenz von 4 S/sec. Die Frequenz ist nach initialer Potentialnegativierung im Bereich von 20 Hz und fällt im Verlauf auf unter 5 Hz, welcher als der Bereich der tonischen Phase festgelegt wurde (siehe die zwei grünen Punkte mit den schwarzen vertikalen Strichen). Die folgende Phase zeigte ebenfalls in der Frequenz eine Oszillation und wird als nicht-tonische bzw. als klonische definiert.

3.8.2 Intrinsisch optische Daten

Die Datenauswertung der optischen Daten erfolgte für die Ursprungsregion mit dem speziellen Bildverarbeitungsprogramm Grabvarcal, welches zur Datenerhebung diente. Die Transmissionsänderung und der Ausbreitungsgrad wurden mit Matlab und ImageJ/FIJI ausgewertet. Die Auswertung der Daten erfolgte ausschließlich für die schon zuvor elektrophysiologisch betrachteten AE der stabilen Phase.

3.8.2.1 Ursprungsort

Die gespeicherten Bildsequenzen wurden während des Experiments auf Ursprung und Ausbreitung untersucht. Durch die farbliche Kodierung der Graustufen konnte der Beginn der Transmissionsänderung nachvollzogen werden. Die erste Änderung von mindestens einem Prozentpunkt in einem Pixel in Bezug zur Transmission wurde als Aktivitätsbeginn festgelegt. So konnte topografisch ein Ursprung der AE registriert werden. Eine Identifikation der von diesem Punkt weiter ausgehenden räumlichen Ausdehnung der Aktivität wurde ebenfalls deskriptiv ausgewertet. Bei Unklarheit der Ursprungsregion wurde zusätzlich die im Programm Matlab ausgewertete Information des Ursprungs mit der zuvor deskriptiven Variante abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert.

3.8.2.2 Maximale Transmissionsänderung

Die Transmission wurde in 256 Graustufen kodiert. Zur Beurteilung der Transmissionsänderung wurde für jeden Pixel eine Referenztransmission (arithmetisches Mittel der Transmission der ersten 20 Bilder jeder Aufnahmesequenz vor Beginn eines AE) gebildet. Die Transmissionsänderung (ΔT) eines Pixels während der Bildsequenz wurde als Differenz der Transmission zur Referenztransmission berechnet. Anschließend wurde der Quotient aus Transmissionsänderung und der Referenztransmission errechnet ($\Delta T/T$). $\Delta T/T$ betrug im Maximum $3 \pm 4 \%$ ($n=100$ Pixel). Die Informationen aus den Pixeln wurden in Raster aus quadratischen Feldern (engl.: Region of Interest (ROI)) mit einer Kantenlänge von 20 Pixeln zusammengefasst. Die ROI wurden entsprechend der Markierung der zu untersuchenden anatomischen Regionen durch das Programm Matlab gesetzt. Es wurde das arithmetische Mittel der Transmissionsänderung ($\Delta T/T$) aller Pixel eines ROI bestimmt. Das den vier anatomischen Regionen zugehörige Feld mit der maximalen Transmissionsänderung

($\max\Delta T/T$) wird in den Ergebnissen auf Medikamenteneffekte untersucht. Die maximale Transmissionsänderung lag bei sämtlichen AE bei $2,17 \pm 1,36 \%$ ($n = 525$). Eine farblich kodierte Bildsequenz aus einer über 500 Bilder umfassenden Aufnahme ist in Abbildung 3-13 dargestellt.

Das optische Hintergrundrauschen, definiert als maximale Transmissionsänderung in nicht involvierten ROI, betrug im Durchschnitt weniger als $0,1 \%$ ($0,06 \% \pm 0,04 \%$) ($n=20$ ROIs) und das Signal-Rausch-Verhältnis lag zwischen $8,1$ und $176,5$ ($n=20$).

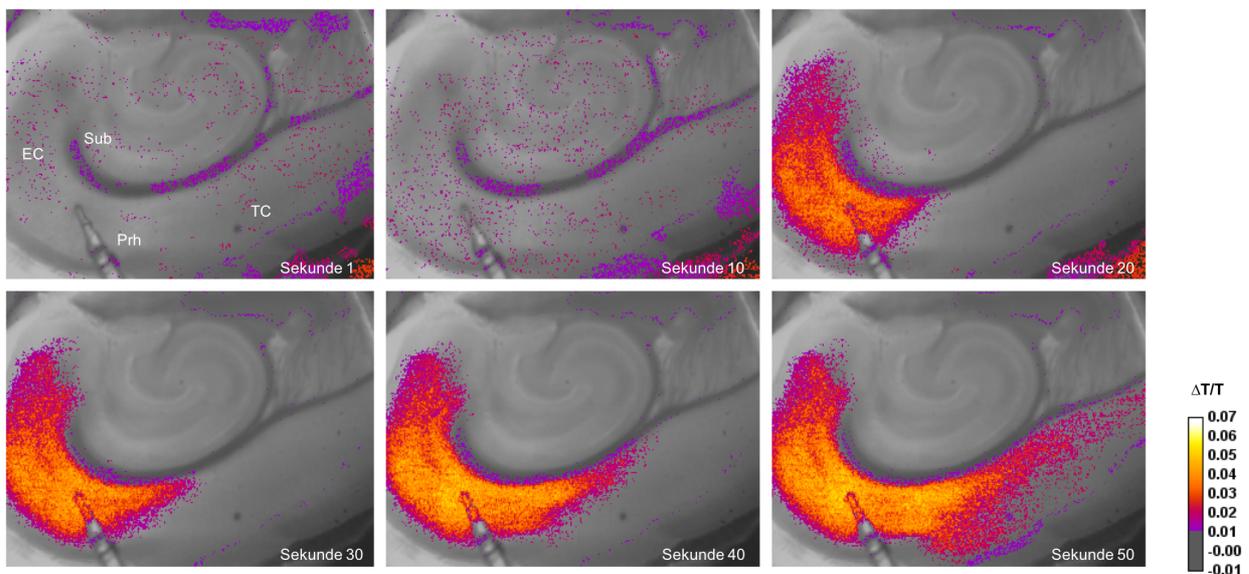


Abbildung 3-13: Darstellung einer sechs Bilder umfassenden Sequenz eines AE, beginnend im entorhinalen Cortex (EC). Die ersten zwei Bilder sind mit Beginn der Aufnahme in Sekunde 1, sowie nach 10 Sekunden, gemacht worden und zeigen noch keine signifikante optische Veränderung auf. Die Ausbreitung bezieht im Folgenden den perirhinalen Cortex (PRh) und temporalen Cortex (TC) mit ein. Das Subiculum (Sub) ist in diesem Beispiel nicht betroffen. Rechts ist die Legende mit der farblich kodierten Transmissionsänderung ($\Delta T/T$) dargestellt von -1 bis 7% ($-0,01$ bis $0,07$). Die maximale Transmissionsänderung befindet sich optisch um die Elektrodenspitze im entorhinalen und perirhinalen Cortex.

3.8.2.3 Ausbreitungsgrad

Der Ausbreitungsgrad beschreibt den Anteil der erregten Fläche der einzelnen Regionen. Nach der manuellen Festlegung der anatomischen Regionen wurde ihre jeweilige Pixelzahl berechnet. Im Verlauf der optischen Signale überschritten zu keinem Zeitpunkt alle Pixel einer Region den Grenzwert für ein AE. Deshalb wurde für jeden Pixel der Region eine Transmissionsänderung von mindestens 1 Prozentpunkt zum Referenzwert für mindestens 20 Bilder über die gesamte Aufnahmezeit als positive Erregung definiert. Anschließend wurde der Anteil von erregten Pixeln an allen Pixeln der definierten

anatomischen Region für die Dauer des gesamten AE berechnet und als prozentualer Anteil der Erregung dieser Region angegeben.

3.9 Statistik und Datenpräsentation

Zur statistischen Auswertung wurden acht unterschiedliche Gruppen gebildet. Eine Kontrollgruppe, bei der kein Medikament eingewaschen wurde (n=9 Hirnschnitte), drei LAC-Gruppen mit den Konzentrationen 10 μM (n=13 Hirnschnitte), 33 μM (n=10 Hirnschnitte), 100 μM (n=5 Hirnschnitte) und drei ZNS-Gruppen mit den Konzentrationen 33 μM (n=10 Hirnschnitte), 100 μM (n=13 Hirnschnitte), 300 μM (n=5 Hirnschnitte). LAC musste konzentrationsabhängig über den Zusatz von Methanol 0,01 - 0,03 % in Lösung gehalten werden. Deshalb wurde eine weitere Gruppe mit einem noch höheren Gehalt von 0,1 % Methanol (n=3 Hirnschnitte) gegen die Kontrollgruppe getestet, um der Frage nach einem toxischen Effekt dieser Substanz nachzugehen. Die Methanolgruppe wurde in den folgenden Analysen, bei nicht signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe, dieser zugeordnet (n=12 Hirnschnitte).

Für sämtliche elektrophysiologisch erhobene Parameter (Dauer, Frequenz, Amplitude, Dauer der tonischen Phase) wurde der Medikamenteneffekt untersucht. Die 180-minütige Aufnahme wurde nach Bedingungen in drei Abschnitten zu je 60 Minuten eingeteilt. In der ersten Stunde wurde die Anfallsauslösung mittels 4-Aminopyridin, in der zweiten Stunde die Medikamentenwirkung und in der dritten Stunde die Reversibilität untersucht. Um die maximalen Effekte auf die Dauer, Amplitude und Dauer der tonischen Phase beurteilen zu können, wurde die stabile Phase am Ende jeder Bedingung betrachtet. Diese wurde in die Auswertung einbezogen, wenn mindestens zwei AE in der jeweiligen Phase auftraten. Maximal fünf AE wurden pro Bedingung in die Analyse einbezogen. Für die ausgewählten AE wurde das arithmetische Mittel gebildet und mit der Standardabweichung angegeben. Bei den optischen Daten wurde für die maximale Transmissionsänderung und den Ausbreitungsgrad ebenfalls so vorgegangen. Die Beschreibung der Ursprungsregion erfolgte durch die Berechnung der prozentualen Verteilung innerhalb der Gruppen.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism7 (Graphpad Software; La Jolla, USA). Vergleiche innerhalb eines Experimentes, zwischen Baseline, Intervention und Wash out, wurden mittels ANOVA für wiederholte Messungen und Bonferroni-korrigiertem posthoc Test untersucht (repANOVA). Bei vollständiger Blockade

von AE in der Intervention, erfolgte die Untersuchung von Baseline zu Wash out mit dem gepaarten t-test und anschließendem Bonferroni-korrigiertem posthoc Test (t-test). Hingegen erfolgten Intergruppenvergleiche, z.B. zwischen Veränderungen von Intervention zu Baseline der Kontrollgruppe und Veränderungen von Intervention zu Baseline in der Medikamentengruppe einer bestimmten Konzentration, mittels „one-way“ ANOVA mit anschließendem Bonferroni-korrigiertem posthoc Test (oneANOVA). Die entsprechenden statistischen Tests sind bei den jeweiligen Ergebnissen mit angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem Niveau von $p < 0,05$ wurden als signifikant, mit einem Niveau von $p < 0,001$ als hochsignifikant bezeichnet. In folgenden Grafiken wird auf die Kennzeichnung nichtsignifikanter p-Werte zur besseren Übersichtlichkeit verzichtet. Grafiken wurden überwiegend mit der Statistiksoftware Prism, Bilder mit GIMP Version 2.8 (GIMP engl.: GNU Image Manipulation Program; open source, verfügbar unter <https://www.gimp.org/downloads/>, Stand 01.10.2019) erstellt.

3.10 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Hirnschnitte, die über 3 Stunden elektrophysiologisch untersucht wurden und die innerhalb der ersten 40 Minuten AE zeigten.

Vor den Experimenten wurden Hirnschnitte ausgeschlossen, deren Präparation bis zur Separierung des Gehirns über 3 Minuten gedauert hatte. Während der Experimente wurden Hirnschnitte ohne Auftreten von AE mit ausreichender Dauer und Frequenz innerhalb der ersten Stunde ausgeschlossen (siehe 3.7.1 Elektrophysiologische Messung, Abschnitt 2). Ein weiterer Ausschlussgrund war das Auftreten von SD als Zeichen einer stattgefundenen Gewebhypoxie. Bei der Auswertung wurden zudem Hirnschnitte ausgeschlossen, welche keine stabile Phase innerhalb der Bedingungen mit mindestens zwei AE pro Bedingung zeigten.

4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 55 Tiere präpariert und so 255 Hirnschnitte gewonnen. Davon wurde ein Tier aufgrund einer zu langen Präparationsdauer (>3 Minuten) ausgeschlossen. Bei sechs weiteren Tieren konnten bei keinem der gewonnenen Hirnschnitte innerhalb der ersten Stunde AE mit ausreichender Dauer und Frequenz beobachtet werden. Bei den übrigen 48 von 55 präparierten Tieren wurde mindestens ein Hirnschnitt über 3 Stunden gemessen (87,3 % aller präparierten Tiere). Aufgrund des langen Versuchsprotokolls über mindestens 3 Stunden, einer vorangehenden mindestens einstündigen Inkubationszeit und der Abnahme der Viabilität über die Zeit konnten in den meisten Fällen nicht mehr als zwei Messungen/Hirnschnitte pro Tier eingeschlossen werden. Zusammengefasst konnten bei insgesamt 72 Hirnschnitten von 48 Tieren (\emptyset 1,5 Hirnschnitte pro Tier) vollständige Messungen über 3 Stunden erfolgen, weitere 155 Hirnschnitte wurden ausgeschlossen. Während der Auswertung wurden weitere 4 Hirnschnitte aufgrund von Hinweisen für Gewebshypoxie bei Auftreten von SD aus der Analyse genommen, so dass schließlich 68 Messungen in die statistische Auswertung einfließen.

Diese verteilen sich wie folgt:

Die Kontrollgruppe, die Gruppe ohne Intervention mit einer antikonvulsiven Substanz, zählte 12 Messungen. Neun Messungen wurden mit ACSF und 4-AP über 180 Minuten durchgeführt und drei weitere Messungen mit dem Zusatz von Methanol 1‰, welche bei nicht-signifikanter Differenz zur Kontrollgruppe folgend dieser hinzugerechnet wurden. Je 28 Hirnschnitte dienten den Gruppen LAC und ZNS, wobei 13 Hirnschnitte in die Gruppen LAC 10 μ M und ZNS 100 μ M, 10 Hirnschnitte in die Gruppen LAC 33 μ M und ZNS 33 μ M, sowie je fünf Hirnschnitte in die Gruppen mit den höchsten Konzentrationen, LAC 100 μ M und ZNS 300 μ M, eingeteilt wurden. Die Aufteilung von Tieren und Hirnschnitten kann in Abbildung 4-1 nachvollzogen werden. Da sich die Anzahl der Hirnschnitte innerhalb der Gruppen während der Auswertung nicht veränderte, werden die n-Zahlen in den weiteren Ergebnissen nicht explizit aufgeführt.

Für den Vergleich der Parameter (z.B. Amplitude) zwischen den einzelnen Bedingungen (Baseline, Intervention, Wash out) innerhalb der Kontroll- und Medikamentengruppen wurde für mindestens zwei und maximal fünf AE innerhalb der stabilen Phase das arithmetische Mittel gebildet. Folgend bestehen für jedes Experiment und jeden Parameter je drei Mittelwerte: Einer je für Baseline, Intervention und Wash out.

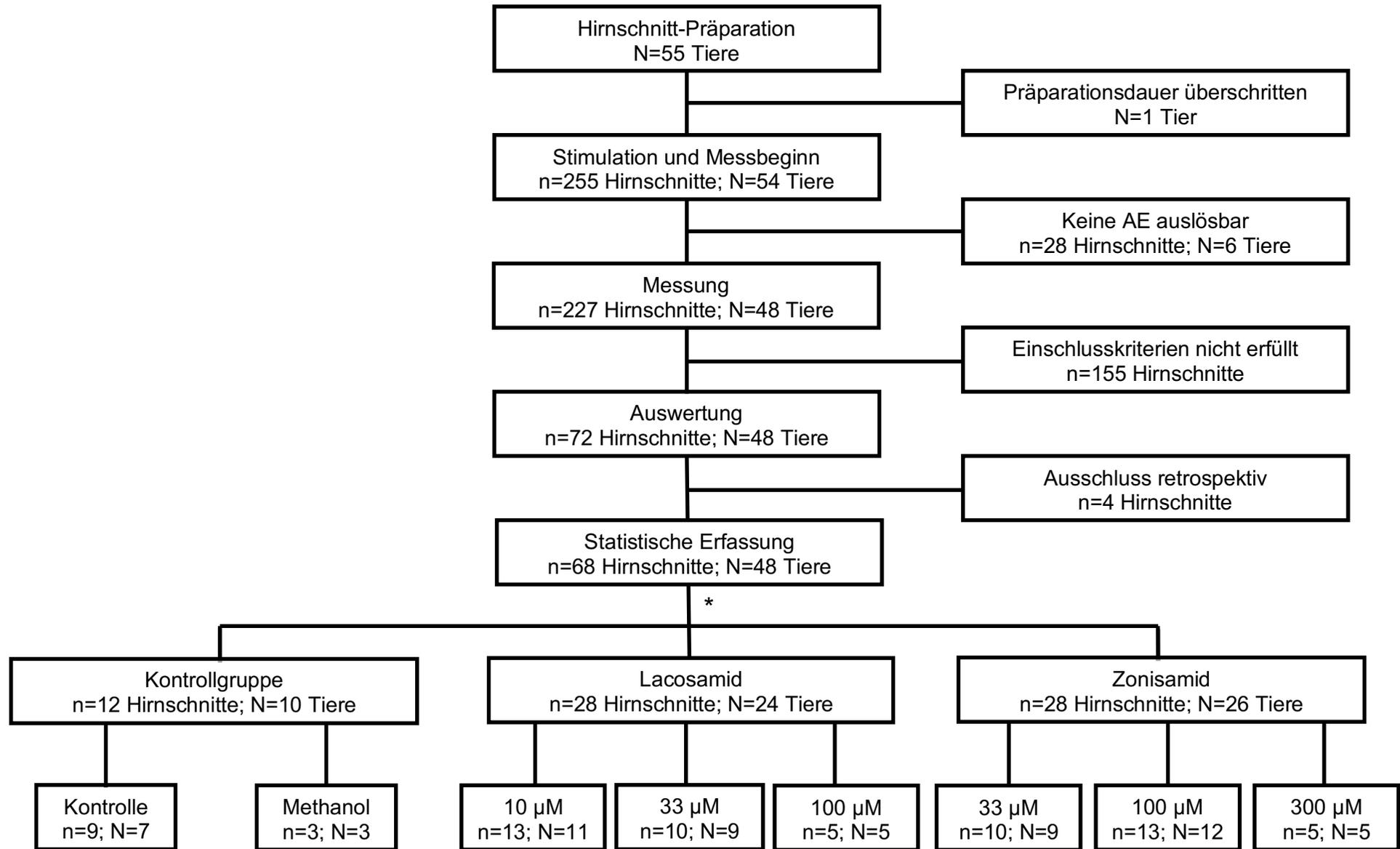


Abbildung 4-1: Übersicht über die Anzahl präparierter Tiere und Hirnschnitte und Ausschlüsse, und der anschließenden Verteilung der gemessenen Hirnschnitte in die Kontroll- und Medikamentengruppen. n = Anzahl an Hirnschnitten; N = Anzahl der Tiere;

* mehrere Hirnschnitte, von je einem Tier stammend, wurden in unterschiedliche Medikamentengruppen oder Kontrollgruppe eingeschlossen, weshalb die Summe der unten angegebenen Tieranzahl, die in der statischen Erfassung angegebenen Tieranzahl von 48 Tieren überschreitet.

Zur besseren Vergleichbarkeit werden im Folgenden die Messungen der Kontrollgruppe äquivalent als Baseline, Intervention und Wash out bezeichnet.

4.1 Elektrophysiologische Parameter

4.1.1 Frequenz der anfallsartigen Ereignisse

In der Kontrollgruppe betrug die Frequenz der AE in der ersten Stunde (Baseline) der Messung $0,19 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$. In der zweiten Stunde (Intervention) nahm diese im Vergleich zur ersten Stunde signifikant auf $0,15 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ ab ($p=0,0027$, repANOVA). In der dritten Stunde (Wash out) betrug sie $0,15 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ und war signifikant kleiner im Vergleich zur ersten Stunde ($p=0,0029$, repANOVA) (Abbildung 4-2).

Die Applikation von LAC bewirkte in der niedrigsten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ einen signifikanten Abfall der Frequenz der AE von $0,20 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ in der Baseline auf $0,15 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ in der Intervention ($p=0,0439$, repANOVA). Im Wash out stieg die Frequenz auf $0,19 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ an ($p=0,0234$ im Vergleich zur Intervention, repANOVA) (Abbildung 4-3).

LAC in mittlerer Konzentration ($33 \mu\text{M}$) führte von der Baseline mit einer Frequenz von $0,17 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ zu einer signifikanten Reduktion auf $0,10 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$ ($p=0,0458$, repANOVA). Ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Intervention resultierte nach dem Wash out des AED auf $0,15 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ ($p=0,0054$, repANOVA) (Abbildung 4-3).

LAC in höchster Konzentration ($100 \mu\text{M}$) führte, ausgehend von einer Baseline-Frequenz von $0,16 \pm 0,23 \text{ min}^{-1}$, zu einer vollständigen Blockade der AE in der Intervention. Vier Minuten nach Einwaschen des Medikaments waren in keinem der Hirnschnitte AE zu beobachten ($p=0,0005$, repANOVA) (Abbildung 4-3). In einem von fünf Schnitten wurden in der Interventionsphase kurze Entladungen beobachtet, welche vor allem aufgrund der sehr kurzen Dauer die Einschlusskriterien für ein AE nicht erfüllten. Nach dem Entzug von LAC konnten im Wash out in allen Schnitten AE mit einer durchschnittlichen Frequenz von $0,13 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ beobachtet werden ($p<0,0001$ im Vergleich zu Intervention, repANOVA) (Abbildung 4-3). Diese setzten durchschnittlich mit einer Latenz von $596 \pm 196 \text{ s}$ ($n=5$) nach Beginn des Medikamentenentzugs ein.

Bei ZNS $33 \mu\text{M}$ betrug die Frequenz während der Baseline $0,19 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ und während der Intervention $0,13 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$, was einem signifikanten Abfall in der Intervention entsprach ($p=0,0048$, repANOVA). Während des Wash out stellte sich ein signifikanter Anstieg auf $0,16 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ dar ($p=0,0075$ im Vergleich zur Intervention, repANOVA)

(Abbildung 4-3).

In der mittleren Konzentration (100 μM) führte ZNS zu einem Abfall der Frequenz von $0,21 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ während der Baseline auf $0,14 \pm 0,11 \text{ min}^{-1}$ während der Intervention ($p=0,0007$, repANOVA). Dabei zeigte sich in Einem von 13 Experimenten eine vollständige Blockade der AE in der Intervention. In einem weiteren Experiment wurde ausschließlich am Ende der Interventionsphase ein AE beobachtet. Während des Wash out betrug die Frequenz $0,16 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ und war signifikant unterschiedlich zur Baseline ($p = 0,046$, repANOVA) (Abbildung 4-3).

ZNS in der höchsten Konzentration (300 μM) führte von einer Frequenz von $0,17 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ in der Baseline in allen untersuchten Schnitten ($n=5$) zu einer vollständigen Blockade der AE in der Intervention ($p=0,0013$, repANOVA). Im Wash out traten AE mit einer Frequenz von $0,10 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ auf und waren damit signifikant niedriger als in der Baseline ($p=0,0049$, repANOVA) und signifikant höher als in der Intervention ($p=0,0016$, repANOVA) (Abbildung 4-3). Das Wiederauftreten der AE begann im Durchschnitt mit einer Latenz von $834 \pm 316 \text{ s}$ ($n=5$).

Die Effektstärken der einzelnen Konzentrationen wurden im Intergruppenvergleich untersucht (Abbildung 4-5). Für beide Substanzen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Frequenz. Während diese für die niedrigste Konzentration der beiden Substanzen nicht signifikant war, zeigten die mittleren Konzentrationen, LAC 33 μM ($p=0,0480$, oneANOVA) und ZNS 100 μM ($p=0,0207$, oneANOVA), eine signifikante Reduktion und für die höchsten Konzentrationen, LAC 100 μM und ZNS 300 μM , eine hochsignifikante Reduktion in Bezug zur Kontrollgruppe (je $p<0,0001$, oneANOVA).

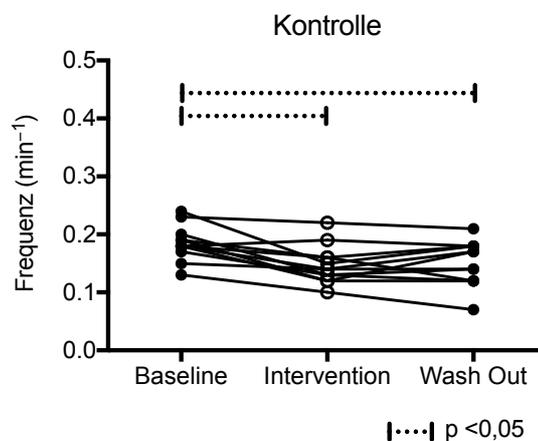


Abbildung 4-2: AE-Frequenz im Verlauf der elektrophysiologischen Messungen für die Kontrollgruppe (ohne Medikamente), gemittelt für die Bedingungen für die drei Zeiträume von jeweils 60 min (Baseline, Intervention und Wash out). Über die Zeit nimmt die Frequenz ab. * $p<0,05$.

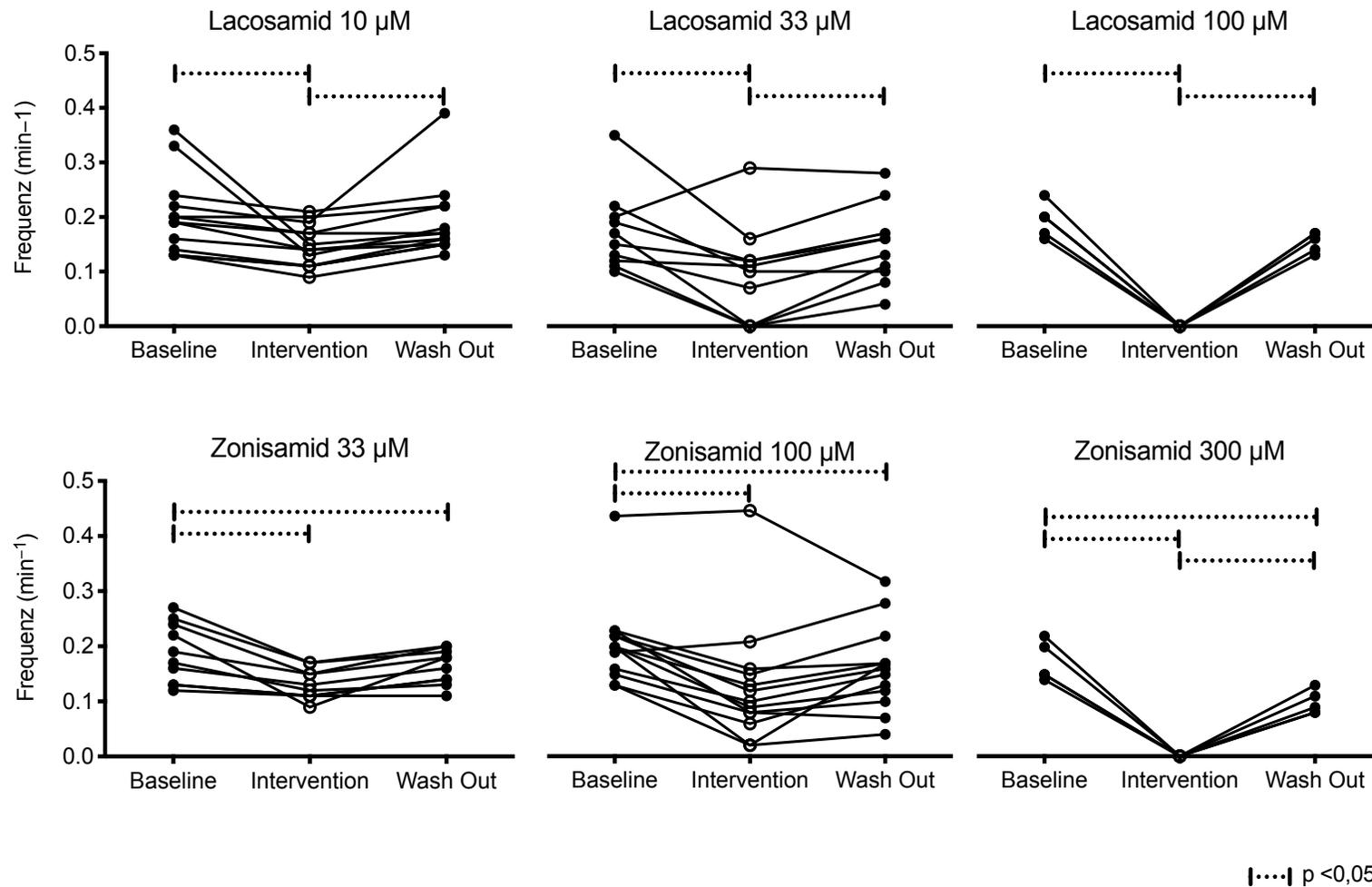


Abbildung 4-3: AE-Frequenz im Verlauf der elektrophysiologischen Messung, gemittelt für die Bedingungen Baseline, Intervention und Wash out: Die Frequenz nimmt während der Intervention im Vergleich zur Baseline für alle Medikamentengruppen signifikant ab. Unter Lacosamid und Zonisamid kommt es in der höchsten gemessenen Konzentration zu einer vollständigen Blockade der AE.

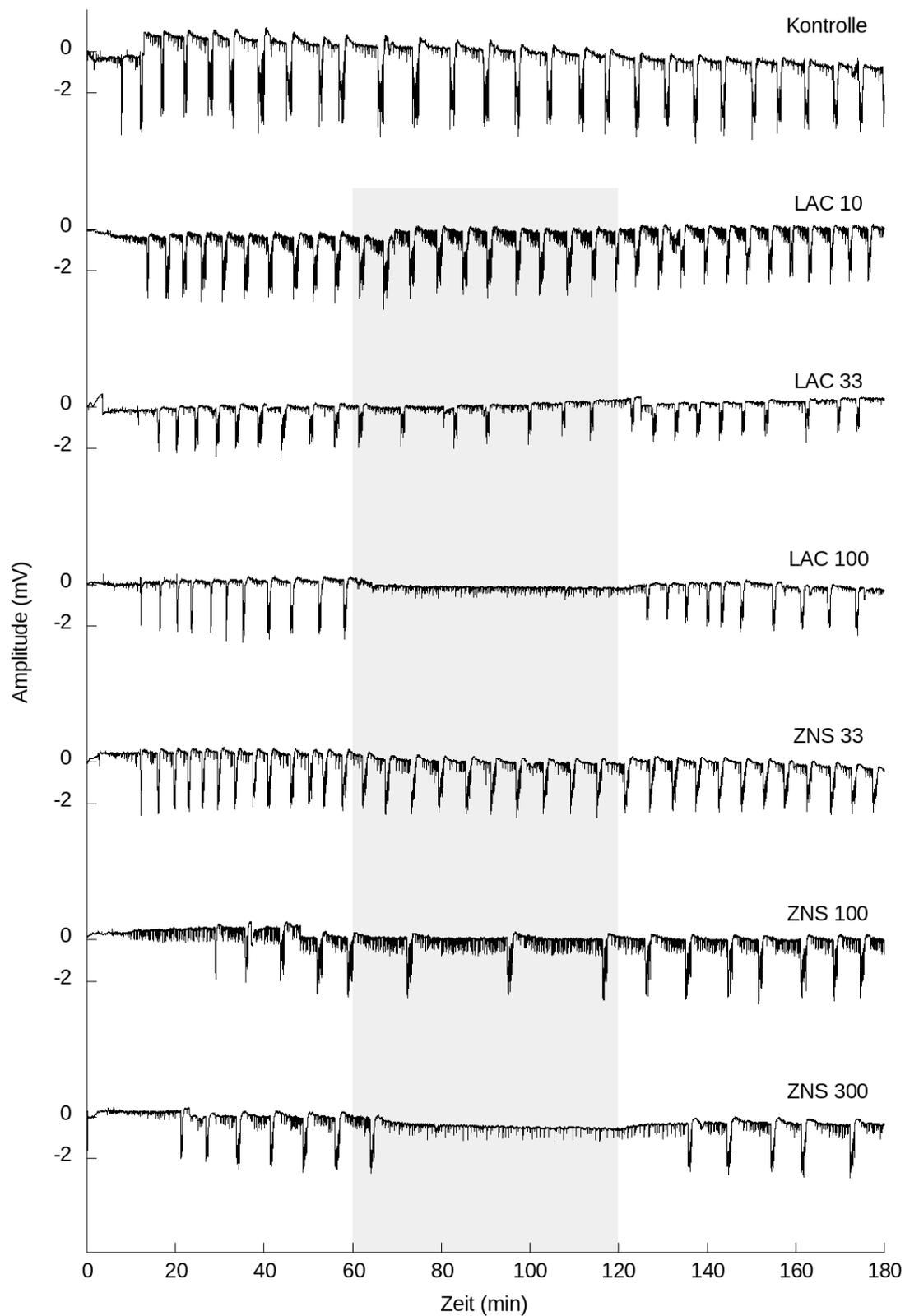


Abbildung 4-4: Dreistündige Messung von sieben Hirnschnitten unter den verschiedenen Konditionen (es fehlt Methanol 1%). Im Vergleich zu der Kontrolle fallen mit zunehmender Konzentration der Antikonvulsiva eine Abnahme der AE während der Intervention (grau unterlegt zwischen Minute 60 und 120) auf, welche bei den höchsten Konzentrationen von Lacosamid und Zonisamid zu einer Blockade führt. Diese ist im Wash out reversibel.

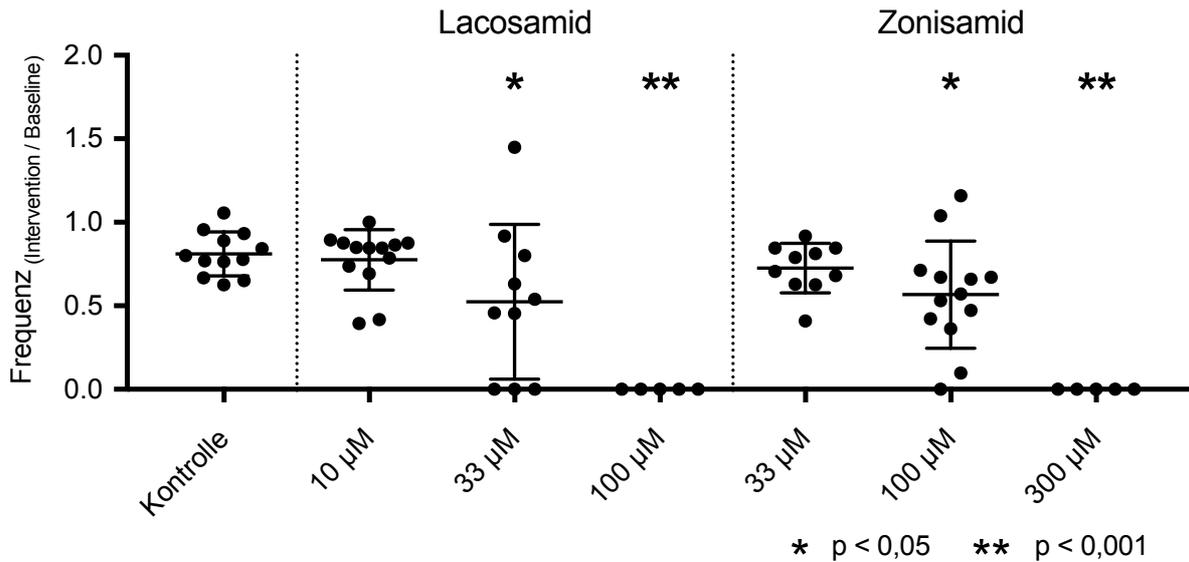


Abbildung 4-5: Relative Reduktion der AE-Frequenz während der Intervention im Intergruppenvergleich: Lacosamid 33 µM und Zonisamid 100 µM führen zu einer signifikanten, Lacosamid 100 µM und Zonisamid 300 µM zu einer hochsignifikanten Reduktion der Frequenz während der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.1.2 Responder-Rate

In klinischen Studien zu Antikonvulsiva ist es üblich, die Wirksamkeit von AED anhand der Responder-Rate darzustellen (Chung et al., 2010, Guerrini et al., 2014). Die Responder-Rate ist definiert als eine Reduktion der Anfallsfrequenz um mehr als 50 % innerhalb eines definierten Zeitraumes mit therapeutischer Intervention im Vergleich zur Ausgangsfrequenz vor der Intervention. Die Darstellung der Anfallsreduktion der *in vitro* Experimente erfolgte mit der Responder-Rate (Abbildung 4-6). Angewandt auf die hier gezeigten Ergebnisse wurden die gemittelten AE-Frequenzen der Baseline mit der Intervention verglichen. Bei einer Frequenzreduktion von mehr als 50 % in der Intervention wurde von einem Responder gesprochen. Für die Kontrollgruppe lag die Responder-Rate bei 0 %. In den LAC-Gruppen zeigte sich ein Anstieg der Responder-Rate mit zunehmender Konzentration von LAC 10 µM mit 15,4 % (n=2 aus 13 Experimenten), LAC 33 µM mit 50 % (n=5 aus 10 Experimenten) und LAC 100 µM mit 100 % (n=5 aus 5 Experimenten). Eine ähnliche Beobachtung ließ sich in der ZNS-Gruppe machen mit ZNS 33 µM mit 10 % (n=1 aus 10 Experimenten), ZNS 100 µM mit 38,5 % (n=5 aus 13 Experimenten) und ZNS 100 µM mit einer Responder-Rate von 100 % (n=5 aus 5 Experimenten).

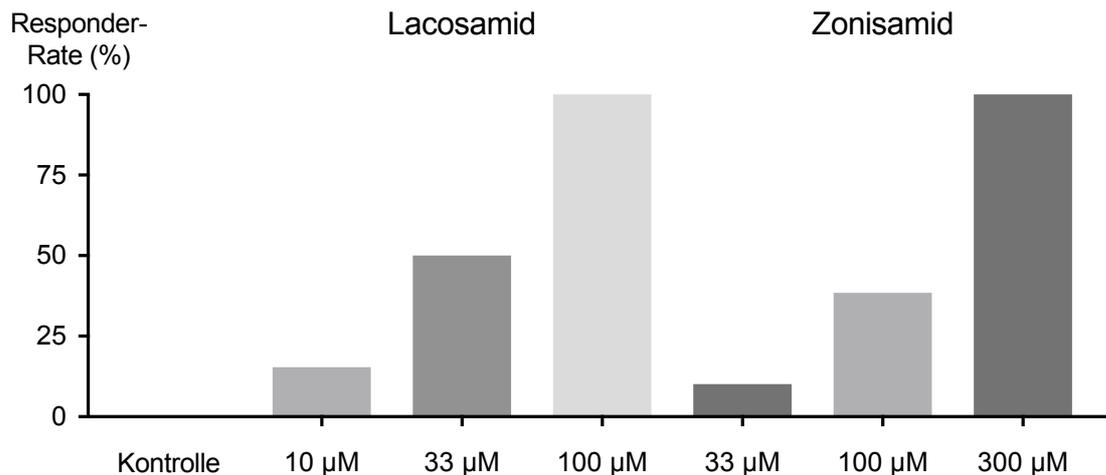


Abbildung 4-6: Responder-Rate der untersuchten Gruppen. Die Kontrolle zeigten in allen untersuchten Hirnschnitten keine Reduktion der gemessenen AE-Frequenz über 50 %. Mit zunehmender Konzentration der Antikonvulsiva, stieg die Responder-Rate. Lacosamid 10 µM führte in 15,4 % und Lacosamid 33 µM in 50 % der Hirnschnitte zu Respondern. Bei Zonisamid 33 µM lag die Responder-Rate bei 10 % und bei Zonisamid 100 µM bei 38,5 %. Bei den höchsten Konzentrationen lagen bei vollständiger AE-Blockade Responder-Raten bei Lacosamid und Zonisamid von 100 % vor.

4.1.3 Dauer der anfallsartigen Ereignisse

Die durchschnittliche AE-Dauer wurde elektrophysiologisch registriert und beinhaltete die Phase der initialen Potentialnegativierung sowie die tonische und die klonische Phase. Die sich der klonischen Phase anschließenden Nachentladungen wurden nicht zu den AE gerechnet.

Die Kontrollgruppe zeigte eine AE-Dauer von $56,9 \pm 15,7$ s während der Baseline, $64,4 \pm 13,9$ s während der Intervention und $58,3 \pm 10,3$ s während des Wash out. Die Dauer stieg signifikant im zeitlichen Verlauf zwischen Baseline und Intervention an ($p=0,0368$, repANOVA) und war auch während des Wash out im Vergleich zur Baseline signifikant länger ($p=0,0125$, repANOVA) (Abbildung 4-7).

LAC beeinflusste im Intragruppenvergleich die AE-Dauer nicht signifikant für die Konzentrationen von 10 und 33 µM. So ergab sich während der Baseline für LAC 10 µM eine AE-Dauer von $54,7 \pm 15,5$ s, für die Intervention $58,5 \pm 14,6$ s und für den Wash out $52,1 \pm 11,6$ s. Für LAC 33 µM entsprach die Dauer für die Baseline $52,3 \pm 16,1$ s, für die Intervention $41,7 \pm 16,0$ s und für den Wash out $48,7 \pm 6,3$ s (Abbildung 4-7).

Für ZNS in niedrigster Konzentration (33 µM) zeigte sich, wie bei der Kontrollgruppe, von Baseline zu Intervention ein signifikanter Anstieg der Dauer von $60,1 \pm 16,5$ s auf $68,1 \pm$

17,3 s ($p=0,0429$, repANOVA). Für ZNS 100 μM bestand zwischen Baseline $53,2 \pm 15,4$ s und Intervention $53,4 \pm 16,5$ s kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4-7).

Für die höchsten ZNS- und LAC-Konzentration lässt sich aufgrund der vollständigen Blockade der AE während der Intervention keine Anfallsdauer bestimmen. Die Dauer betrug bei ZNS 300 μM während der Baseline $51,0 \pm 11,4$ s, während des Wash out $48,9 \pm 13,2$ s und bei LAC 100 μM $49,4 \pm 29,7$ s während der Baseline und $52,6 \pm 20,3$ s während des Wash out. Die Dauer der AE zwischen Baseline und Wash out war nicht signifikant unterschiedlich (t-test) (Abbildung 4-8).

Das Fehlen eines Anstiegs der AE-Dauer in den Gruppen LAC 10 μM und 33 μM sowie ZNS 100 μM während der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ einen möglichen Medikamenteneffekt auf die AE-Dauer vermuten. Daher wurde für das Verhältnis von Intervention zu Baseline ein Intergruppenvergleich für die Gruppen LAC und ZNS im Vergleich zur Kontrollgruppe durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der AE-Dauer in der Gruppe LAC 33 μM mit $0,85 \pm 0,37$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $1,17 \pm 0,22$ ($p=0,0258$, oneANOVA) (Abbildung 4-9).

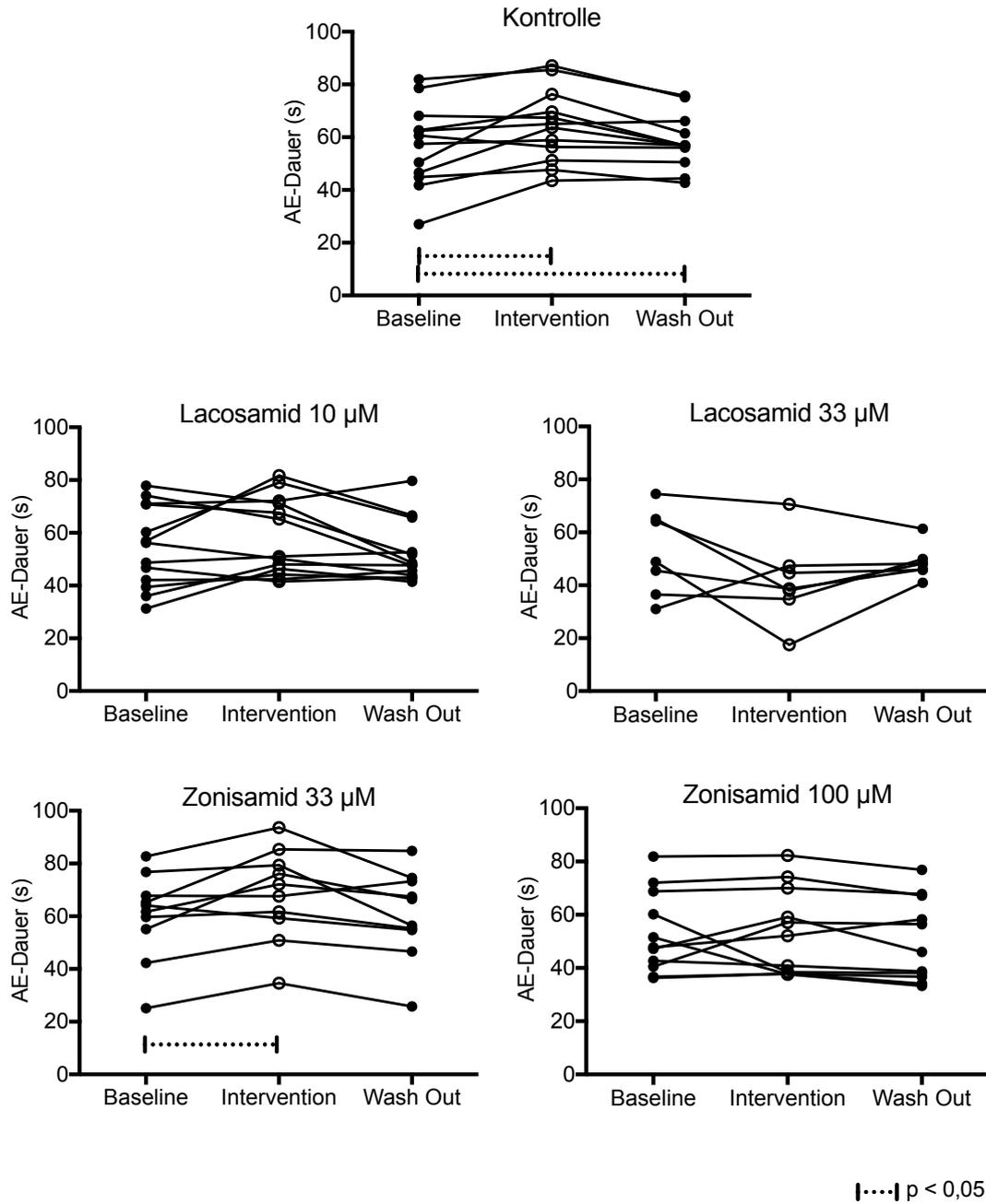


Abbildung 4-7: AE-Dauer im Verlauf der elektrophysiologischen Messung, gemittelt für die Bedingungen Baseline, Intervention und Wash out: Die AE-Dauer verlängerte sich signifikant während der Intervention im Vergleich zur Baseline in der Kontrollgruppe und unter Zonisamid 33 µM. Für die Kontrollgruppe war die AE-Dauer signifikant höher in der Bedingung Wash out im Vergleich zur Baseline. $p < 0,05$

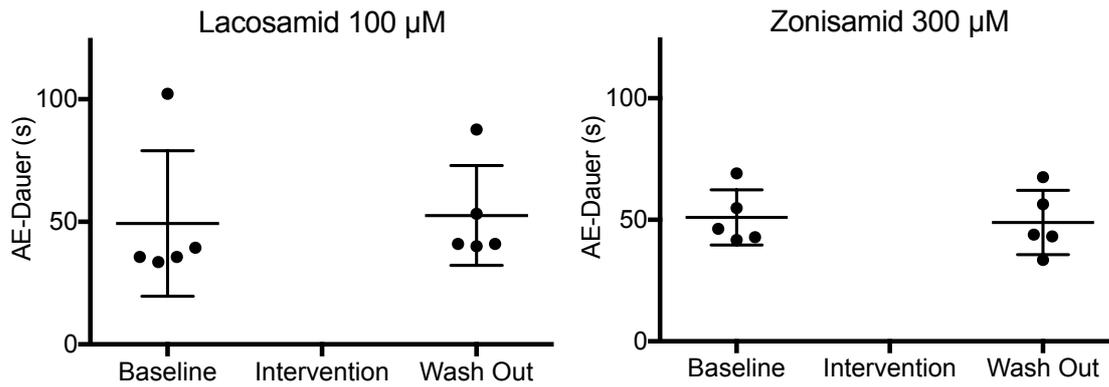


Abbildung 4-8: AE-Dauer im Verlauf der elektrophysiologischen Messung, gemittelt für die Bedingungen Baseline und Wash out: Während der Intervention wurde bei vollständiger Unterdrückung der AE keine Dauer gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anfallsdauer zwischen Baseline und Wash out.

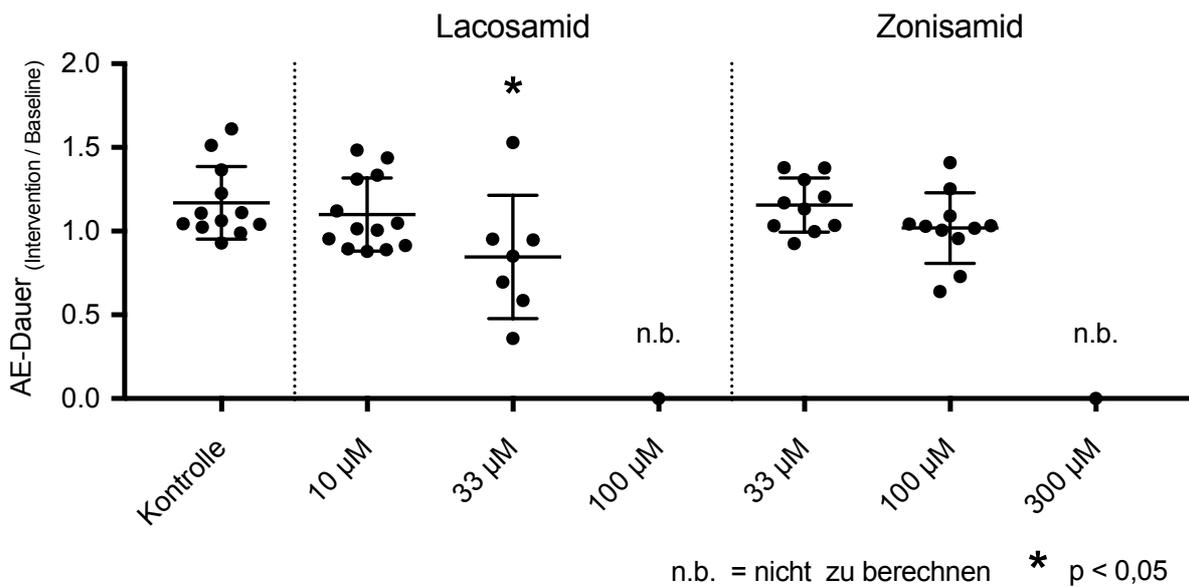


Abbildung 4-9: Die elektrophysiologisch gemessene AE-Dauer im Verhältnis von Intervention zur Baseline der sieben untersuchten Gruppen: Für die höchsten Konzentrationen ließen sich bei vollständiger Unterdrückung der AE keine Verhältnisse bilden (n.b.). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der AE-Dauer für Lacosamid 33 µM im Intergruppenvergleich zur Kontrolle. Für Lacosamid 10 µM und Zonisamid ließen sich keine signifikanten Unterschiede aufzeigen.
n.b. = nicht zu berechnen

4.1.4 Amplitude der anfallsartigen Ereignisse

Die Ergebnisse für die AE-Amplitude sind in den folgenden Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 dargestellt.

In der Kontrollgruppe fiel die AE-Amplitude signifikant zwischen Baseline mit $2,23 \pm 0,77$ mV und Intervention mit $2,03 \pm 0,83$ mV ab ($p=0,0325$, repANOVA). Im Wash out kam es zu einem weiteren Abfall der Amplitude auf $1,86 \pm 0,84$ mV ($p=0,0065$ im Vergleich zur Intervention, repANOVA).

Die durchschnittliche Amplitude für LAC $10 \mu\text{M}$ betrug während der Baseline $2,70 \pm 0,93$ mV, während der Intervention $2,59 \pm 1,01$ mV und während des Wash out $2,46 \pm 1,13$ mV. Die Werte waren nicht signifikant unterschiedlich (repANOVA). Für LAC $33 \mu\text{M}$ zeigte sich während der Baseline eine Amplitude von $2,30 \pm 0,76$ mV, während der Intervention $2,22 \pm 0,90$ mV und während des Wash out $1,97 \pm 0,79$ mV. Für LAC $33 \mu\text{M}$ zeigte sich ein signifikanter Abfall der Amplitude zwischen Baseline und Wash out ($p=0,0426$, repANOVA).

ZNS $33 \mu\text{M}$ führte zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude von $2,15 \pm 0,61$ mV in der Baseline auf $1,82 \pm 0,79$ mV in der Intervention ($p=0,0201$, repANOVA). Im Wash out zeigte sich eine zur Intervention weiter fallende Amplitude auf $1,63 \pm 0,71$ mV ($p=0,0136$, repANOVA). Bei ZNS $100 \mu\text{M}$ fiel die Amplitude von $1,93 \pm 0,47$ mV in der Baseline auf $1,80 \pm 0,50$ mV in der Intervention, was als Trend gewertet wurde ($p = 0,0903$, repANOVA). Im Wash out blieb diese ähnlich zur Intervention bei $1,74 \pm 0,46$ mV.

Nach vollständiger Blockade der AE durch LAC $100 \mu\text{M}$ und ZNS $300 \mu\text{M}$, kam es nach Wiedereinsetzen der AE im Wash out zu keinem signifikanten Unterschied der Amplitude im Vergleich zur Baseline (t-test). Unter ZNS $300 \mu\text{M}$ betrug die Amplitude während der Baseline $1,98 \pm 0,51$ mV und während des Wash out $1,60 \pm 0,70$ mV. In der LAC-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ belief sich die Amplitude während der Baseline auf $2,61 \pm 0,08$ mV und während des Wash out auf $2,16 \pm 1,07$ mV.

Ein Intergruppenvergleich zeigte keine signifikante Reduktion der Amplitude unter ZNS und LAC während der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe (oneANOVA). Es ließen sich keine Effekte der Medikamente auf die Amplitude verifizieren.

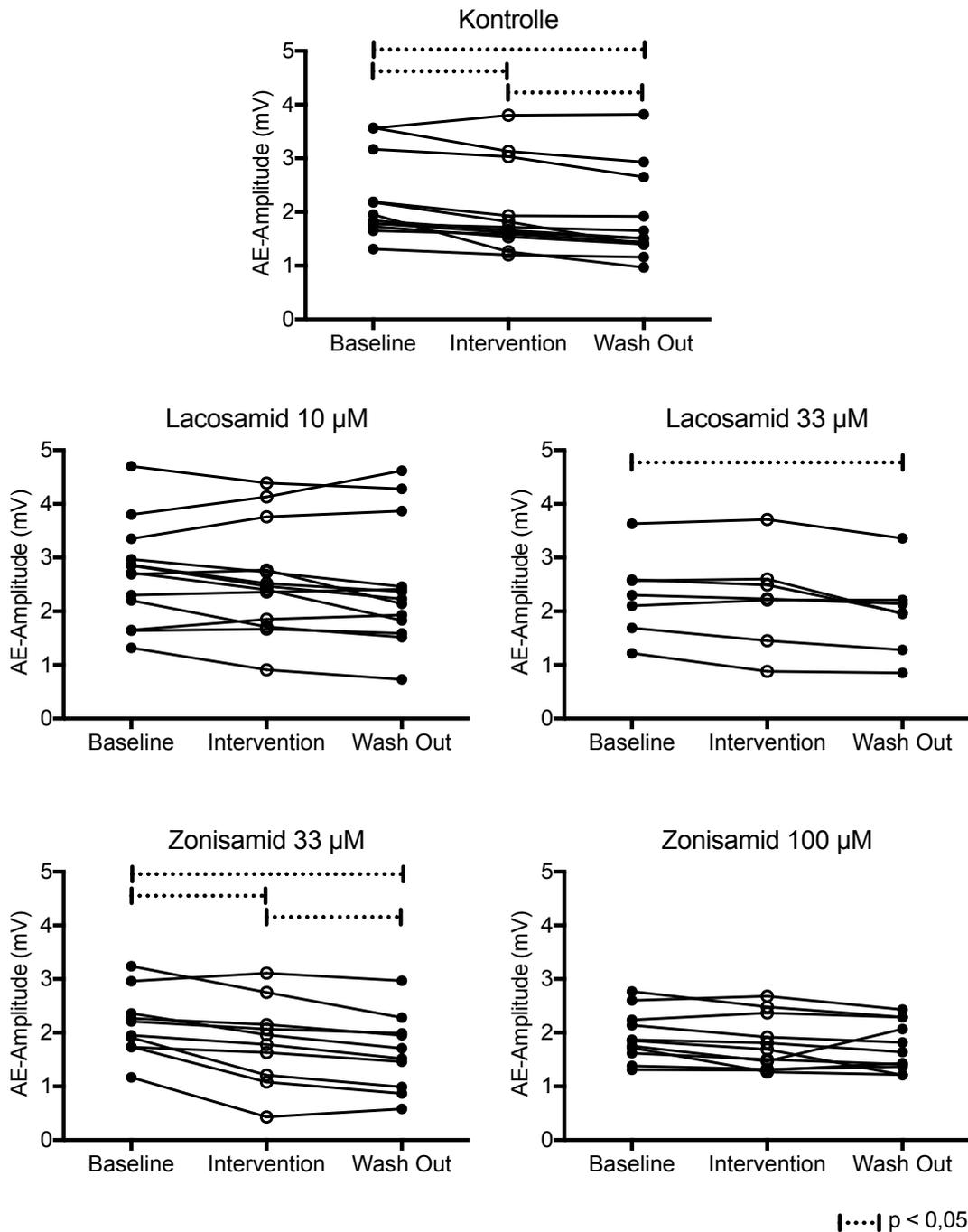


Abbildung 4-10: AE-Amplitude im Verlauf der elektrophysiologischen Messung: Eine signifikante Abnahme der Amplitude über die Zeit ließ sich in der Kontrollgruppe sowohl zwischen Intervention und Baseline als auch zwischen Wash out und Intervention aufzeigen. Für Lacosamid 33 µM stellte sich ein signifikanter Abfall zwischen Wash out und Baseline dar. Bei Zonisamid 33 µM war der Abfall signifikant zwischen Intervention und Baseline, Wash out und Baseline, und Wash out und Intervention. $p < 0,05$

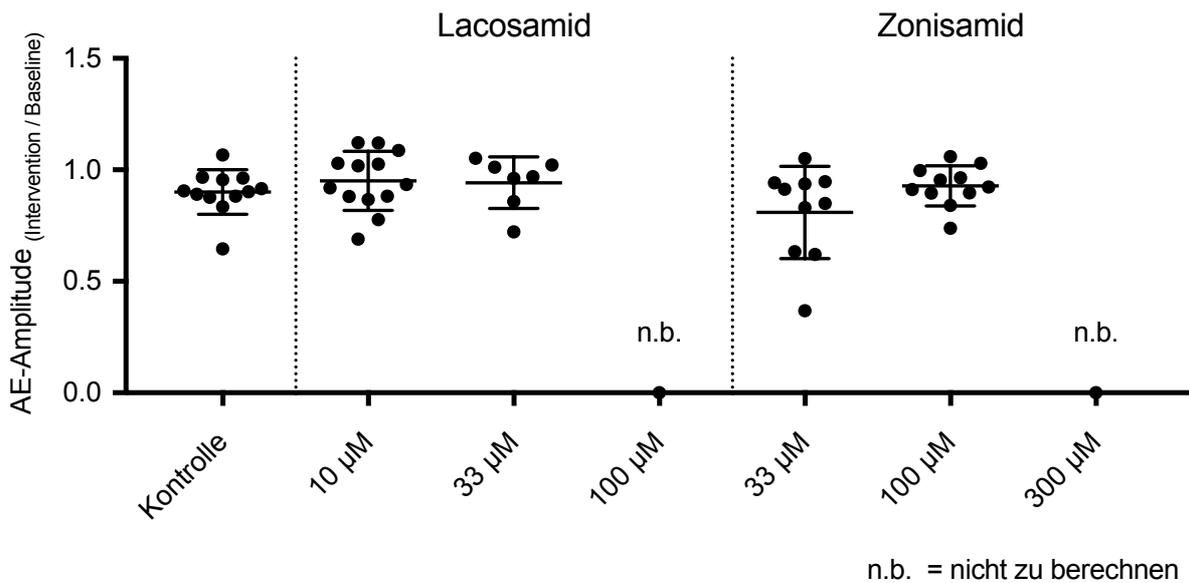


Abbildung 4-11: Die elektrophysiologisch gemessene Amplitude der AE im Verhältnis von Intervention zur Baseline der 7 untersuchten Gruppen: Für die höchsten Konzentrationen der Medikamente ließen sich bei vollständiger AE-Unterdrückung keine Verhältnisse bilden (n.b.). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medikamentengruppen im Intergruppenvergleich zur Kontrollgruppe. n.b. = nicht zu berechnen

4.1.5 Absolute und relative Dauer der tonischen Phase der anfallsartigen Ereignisse

Die Dauer der tonischen Phase war direkt von der Gesamtdauer der AE abhängig. Ein Anstieg der AE-Dauer in der Kontrollgruppe und ZNS-Gruppe wurde in der zweiten Stunde der Messung bereits beschrieben (Abbildung 4-7). Um den mit der Gesamtdauer einhergehenden Anstieg der tonischen Phase zu berücksichtigen, wurde zusätzlich zur absoluten tonischen Dauer (in Sekunden) die relative tonische Phase (in Prozent) als Anteil der absoluten tonischen Dauer an der Gesamtdauer eines AE betrachtet (siehe 3.8.1.4 Tonische Phase, Abbildung 3-5).

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der absoluten tonischen Phase von der Baseline mit $13,9 \pm 4,2$ s zur Intervention mit $17,7 \pm 4,2$ s ($p=0,0298$, repANOVA). Im Wash out war diese vergleichbar mit der Intervention mit $18,5 \pm 5,5$ s (Abbildung 4-13). Der relative Anteil der tonischen Phase an der gesamten Dauer war in der Kontrollgruppe hingegen nicht signifikant unterschiedlich (repANOVA). Die relative Dauer der tonischen Phase betrug in der Baseline $25,8 \pm 7,5$ %, in der Intervention $28,0 \pm 7,0$ % und im Wash out $32,1 \pm 8,6$ % (Abbildung 4-15).

In der LAC-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zeigte sich eine absolute tonische Dauer von $13,1 \pm 5,3$ s in der Baseline, von $11,0 \pm 4,9$ s in der Intervention und von $16,8 \pm 5,6$ s im Wash

out (Abbildung 4-13). Zwischen Baseline und Intervention gab es keinen signifikanten Unterschied (repANOVA). Der Anstieg der absoluten tonischen Phase während des Wash out war hochsignifikant zur Baseline ($p=0,0009$, repANOVA) und signifikant zur Intervention ($p=0,0076$, repANOVA). Der relative Anteil der tonischen Phase betrug $24,0 \pm 6,4$ % in der Baseline, $18,9 \pm 5,9$ % in der Intervention und $32,5 \pm 9,2$ % im Wash out (grafisch nicht dargestellt). Der relative Anteil zeigte einen signifikanten Anstieg im Wash out im Vergleich zur Baseline ($p=0,0123$, repANOVA) und zur Intervention ($p=0,0017$, repANOVA). Die relative, als auch die absolute tonische Dauer, wurden durch LAC $10 \mu\text{M}$ während der Intervention nicht signifikant beeinflusst.

LAC $33 \mu\text{M}$ führte zu einem Abfall der tonischen Phase von der Baseline mit $11,9 \pm 5,0$ s zur Intervention mit $5,5 \pm 1,9$ s, die als Trend zu werten war ($p=0,0665$, repANOVA). Der im Folgenden beobachtete Wiederanstieg im Wash out auf $16,2 \pm 4,3$ s war signifikant unterschiedlich zur Intervention ($p=0,0010$, repANOVA), nicht aber zur Baseline (Abbildung 4-13). Die relative tonische Phase fiel signifikant zwischen der Baseline mit $24,0 \pm 8,9$ % und der Intervention mit $14,3 \pm 3,9$ % ab ($p=0,0138$, repANOVA) (Abbildung 4-15). Nach Medikamentenentzug zeigte sich während des Wash out ein hochsignifikanter Anstieg auf $33,3 \pm 8,6$ % ($p=0,0008$, repANOVA) (Abbildung 4-15). Bei LAC $100 \mu\text{M}$ war durch die vollständige Blockade in der Intervention nur ein Vergleich zwischen Wash out und Baseline möglich. Hier zeigte sich anders als bei den anderen LAC-Gruppen eine nicht signifikant unterschiedliche Dauer der tonischen Phase von $8,9 \pm 2,9$ s in der Baseline zu $8,3 \pm 2,3$ s im Wash out (t-test) (Abbildung 4-14). Auch der relative Anteil zeigte in der Gruppe für LAC $100 \mu\text{M}$ mit $21,0 \pm 9,4$ % in der Baseline und mit $18,0 \pm 8,2$ % im Wash out vergleichbare Werte (t-test) (grafisch nicht dargestellt). Beispielhafte AE in der Kontrolle und mit Lacosamid $33 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

Unter ZNS $33 \mu\text{M}$ stieg die Dauer der tonischen Phase von $11,7 \pm 2,7$ s in der Baseline auf $15,8 \pm 5,5$ s in der Intervention an ($p=0,1122$, repANOVA). Eine weitere Zunahme war auch nach Entzug des Medikamentes im Wash out auf $17,1 \pm 6,8$ s festzustellen, welche signifikant höher im Vergleich zur Baseline war ($p=0,0226$, repANOVA) (Abbildung 4-13). Die relative tonische Phase verhielt sich entsprechend mit einem Anteil von $20,1 \pm 4,3$ % in der Baseline, $24,4 \pm 10,2$ % in der Intervention und $28,9 \pm 10,6$ % im Wash out (grafisch nicht dargestellt). Unter ZNS $100 \mu\text{M}$ war die absolute tonische Dauer $14,5 \pm 3,6$ s in der Baseline, $16,5 \pm 6,0$ s in der Intervention und $16,0 \pm 5,8$ s im Wash out (Abbildung 4-13). Die relative tonische Phase betrug $29,3 \pm 10,3$ % in der Baseline, $32,2$

$\pm 10,3 \%$ in der Intervention und $32,7 \pm 9,2 \%$ im Wash out (grafisch nicht dargestellt). Es konnte keine signifikante Änderung der absoluten oder relativen tonischen Phase beobachtet werden (repANOVA). ZNS $300 \mu\text{M}$ zeigte in der Baseline eine tonische Phase von $13,2 \pm 1,7 \text{ s}$. Nach Wiedereinsetzen der AE betrug diese während des Wash out $15,7 \pm 3,9 \text{ s}$ (Abbildung 4-14). Die relative tonische Dauer verhielt sich entsprechend mit $26,4 \pm 5,3 \%$ in der Baseline und $33,2 \pm 9,0 \%$ im Wash out (grafisch nicht dargestellt). Absolute und relative tonische Phase waren nicht signifikant unterschiedlich (repANOVA).

Um die Reduktion der Intervention zur Baseline weiter zu untersuchen, wurde diese mittels Intergruppenvergleich auf eine Differenz zur Kontrollgruppe für alle Medikamentengruppen geprüft (Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17). LAC $10 \mu\text{M}$ zeigte für die absolute und relative tonische Phase eine signifikante Reduktion auf ($p=0,0050$, $p=0,0196$; oneANOVA). LAC $33 \mu\text{M}$ zeigte in der absoluten und relativen tonischen Phase eine hochsignifikante Reduktion ($p<0,0001$, $p=0,001$; oneANOVA).

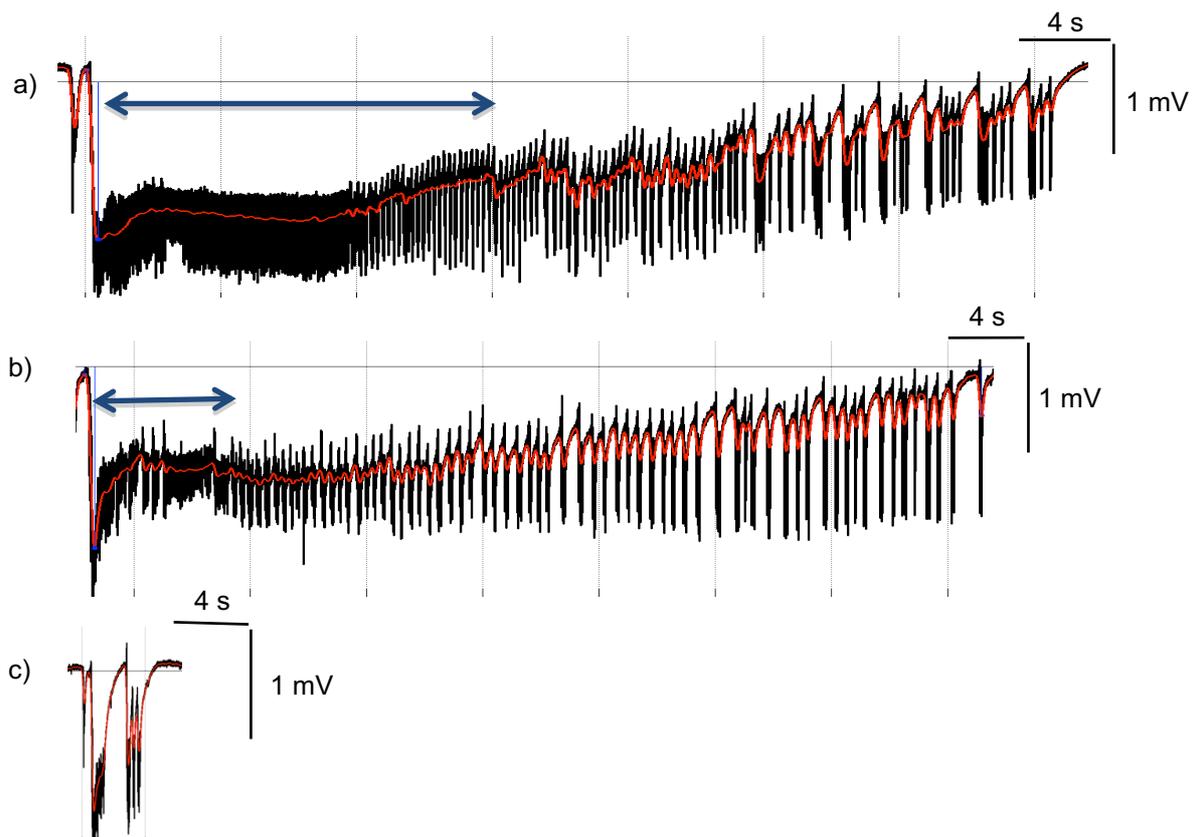


Abbildung 4-12: Darstellung der Lacosamid-Wirkung auf die Dauer der tonischen Phase am Beispiel von drei verschiedenen AE während der Intervention: a) Kontrollgruppe; b) Lacosamid $33 \mu\text{M}$; c) Lacosamid $100 \mu\text{M}$. Die vertikalen blauen Pfeile stellen die Dauer der tonischen Phase dar. Das unter Lacosamid $100 \mu\text{M}$ aufgeführte Ereignis erfüllt aufgrund seiner Dauer nicht die Einschlusskriterien für ein AE.

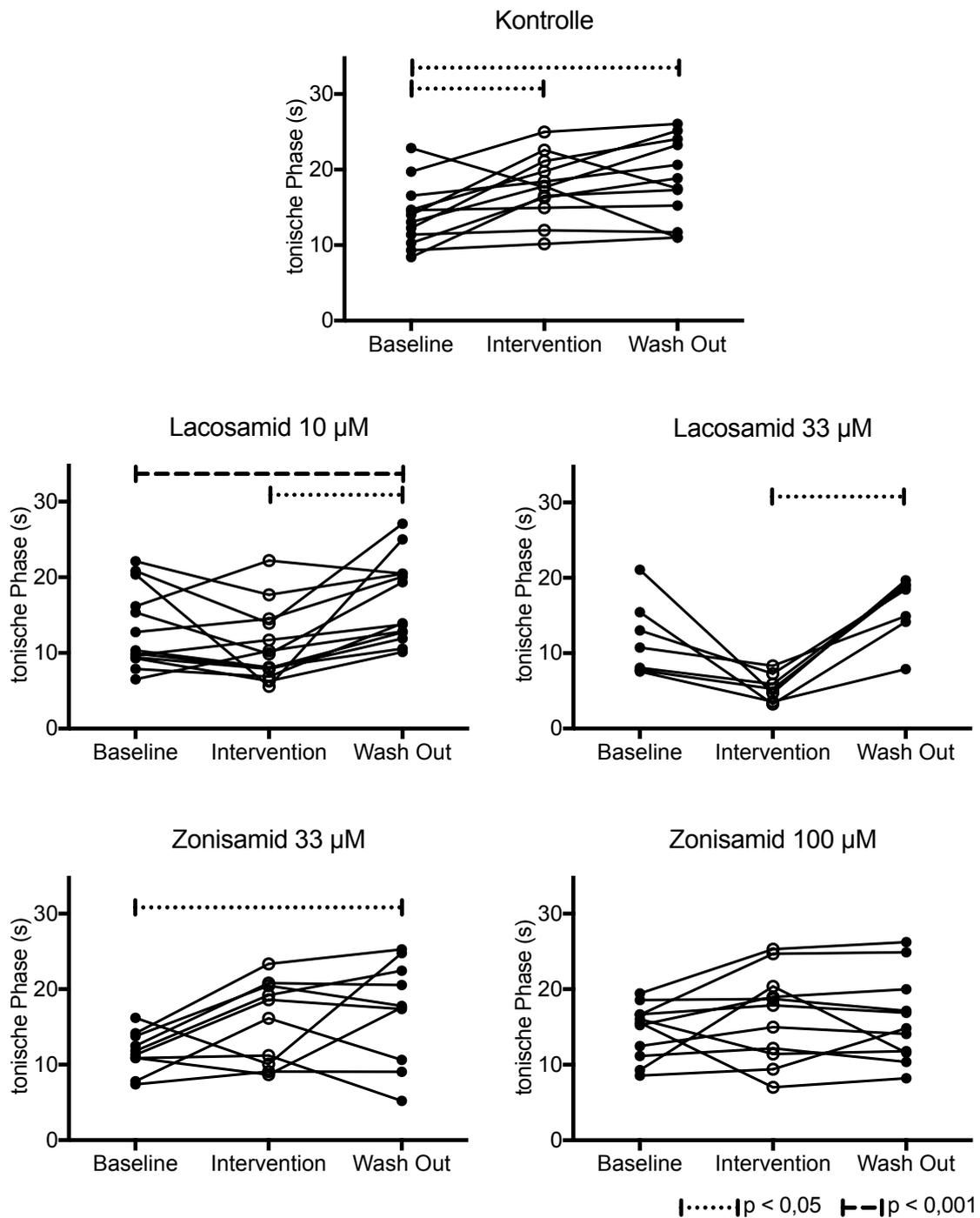


Abbildung 4-13: Die absolute Dauer der tonischen Phase der AE im Verlauf der elektrophysiologischen Messung in Sekunden (s): In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der tonischen Phase von Baseline zu Intervention. In der Kontrollgruppe und für Zonisamid 33 µM zeigte sich im Verlauf von der Baseline zum Wash out ein signifikanter Anstieg der tonischen Phase, für Lacosamid 10 µM war dieser hochsignifikant. Lacosamid 10 µM und 33 µM führte zu einem signifikanten Anstieg der tonischen Phase im Wash out in Bezug zur Intervention.

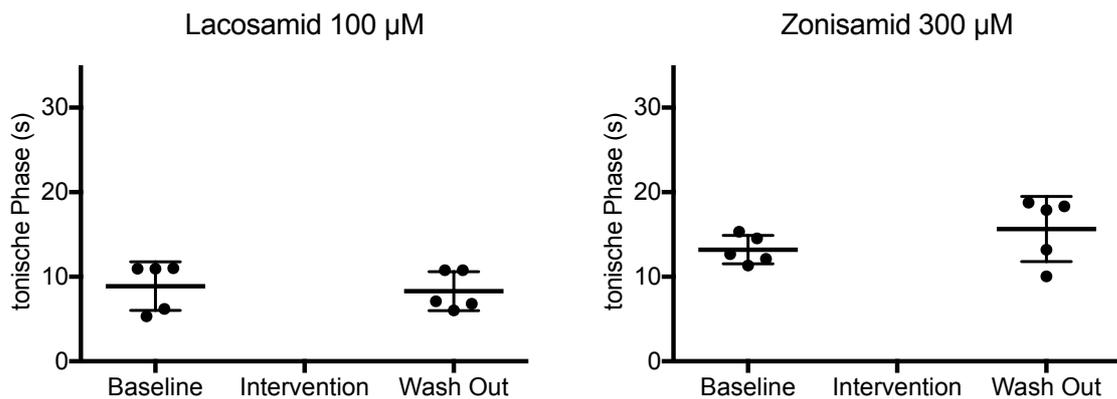


Abbildung 4-14: Die absolute Dauer der tonischen Phase der AE im Verlauf der elektrophysiologischen Messung für Lacosamid 100 µM und Zonisamid 300 µM für Baseline und Wash out in Sekunden (s): Die Intervention lieferte bei fehlenden AE keine Daten. Zwischen Wash out und Baseline bestanden keine signifikanten Differenzen.

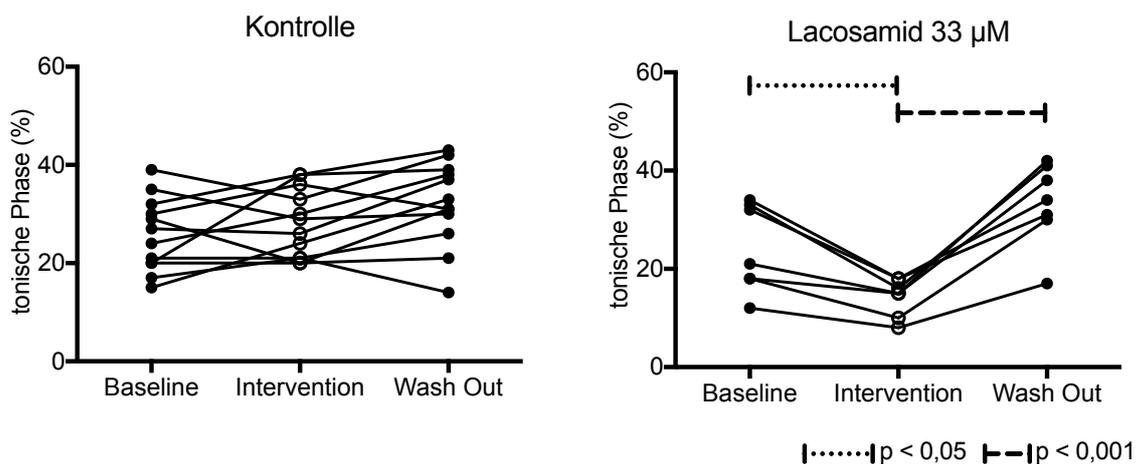


Abbildung 4-15: Die relative Dauer der tonischen Phase der AE im Verlauf der elektrophysiologischen Messung für die Kontrollgruppe und Lacosamid 33 µM in Prozent: In der Kontrollgruppe ließ sich kein Unterschied zwischen den Bedingungen feststellen, während unter Lacosamid 33 µM eine signifikante Reduktion von der Baseline zur Intervention und ein folgender hochsignifikanter Anstieg von Intervention zum Wash out beobachtet wurde.

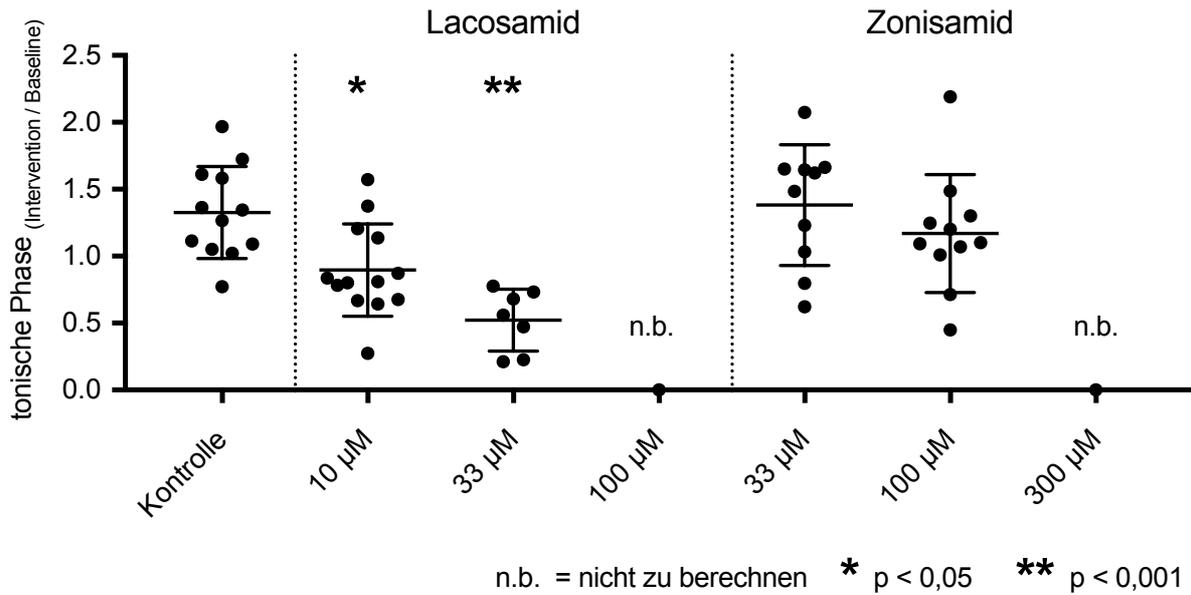


Abbildung 4-16: Die absolute Dauer der tonischen Phase der AE im Verhältnis von Intervention zur Baseline der sieben untersuchten Gruppen: Für die höchsten Konzentrationen der Medikamente ließ sich bei vollständiger AE-Unterdrückung in der Intervention kein Verhältnis bilden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion für Lacosamid 10 µM und eine hochsignifikante Reduktion für Lacosamid 33 µM im Vergleich zur Kontrollgruppe.

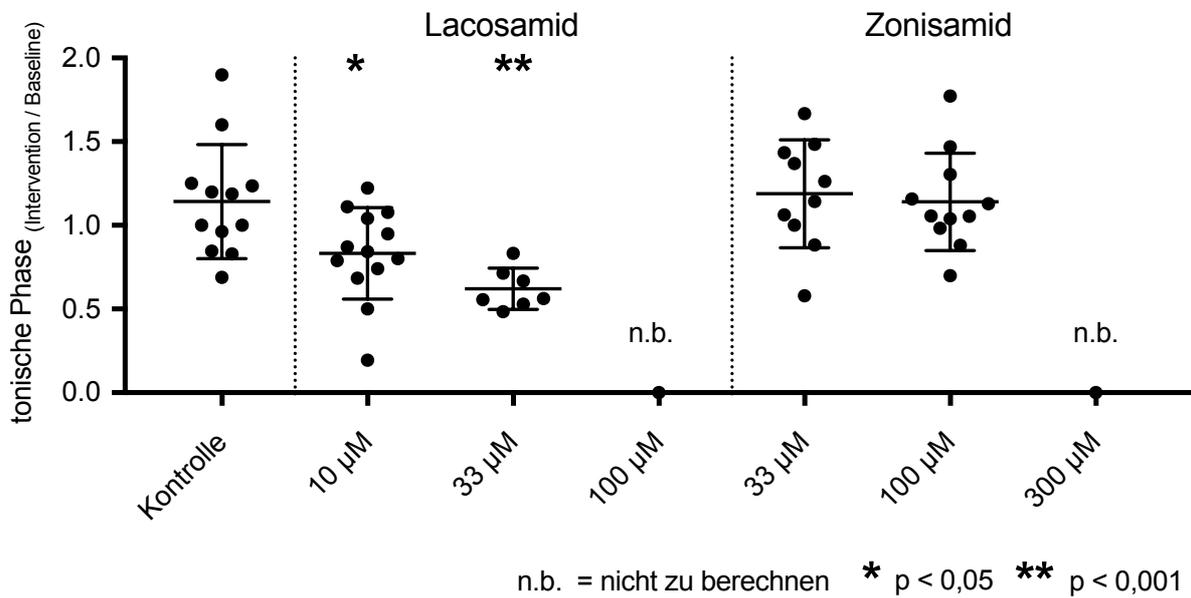


Abbildung 4-17: Die relative Dauer der tonischen Phase der AE im Verhältnis von Intervention zur Baseline der sieben untersuchten Gruppen: Für die höchsten Konzentrationen der Medikamente ließen sich bei vollständiger AE-Unterdrückung in der Intervention keine Verhältnisse bilden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion für Lacosamid 10 µM und Lacosamid 33 µM im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2 Intrinsisch optische Parameter

4.2.1 Ursprungsregion

Die Ursprungsregion des AE wurde nach visueller Kontrolle durch den Untersucher mit Hilfe der Aufnahmesoftware Grabvarcal festgelegt und folgenden anatomischen Regionen zugeordnet: Subiculum (Sub), entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PRh) und temporaler Cortex (TC) (Abbildung 4-18). Bei einigen AE konnte visuell keine einzelne Region als sicherer Ursprung festgelegt werden, da sie visuell mehrere Ursprünge aufzeigten. Bei diesen Messungen erfolgte die Definition des Ursprungs semiautomatisch durch Auffinden der ersten Region mittels Matlab, bei der eine relevante Transmissionsänderung anhand der maximalen Änderung der 1. Ableitung dieser über die Zeit auftrat. Die auf diese Weise mathematisch festgelegte Ursprungs-ROI wurde anschließend durch den Untersucher einer einzelnen anatomischen Region, z.B. dem SUB, zugeordnet.

Die meisten Schnitte zeigten einen Anfallsursprung im EC oder TC, selten im PRH oder Sub (Abbildung 4-18, Tabelle 4-1). Es waren keine Ursprünge in anderen Bereichen der hippocampalen Strukturen zu verzeichnen. Über die Zeit war der Anfallsursprung in der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich. ZNS und LAC hatten keinen Effekt auf den Ursprung der AE.

Folgende Verteilung für alle gemessenen, in die Auswertung einfließenden AE (Baseline n=238, Intervention n=229, Wash out n=283) ergab sich für die drei verschiedenen Bedingungen: Subiculum: 0,4 % in der Baseline, 0,4 % in der Intervention, 1,1 % im Wash out; Entorhinaler Cortex: 79,8 % in der Baseline, 79,8 % in der Intervention, 81,6 % im Wash out; Perirhinaler Cortex: 0,4 % in der Baseline, 0,8 % in der Intervention, 0,4 % im Wash out; Temporaler Cortex: 19,3 % in der Baseline, 19,2 % in der Intervention, 17,0 % im Wash out.

Es zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Ursprungsregionen zwischen den Bedingungen (Chi-Quadrat-Test).

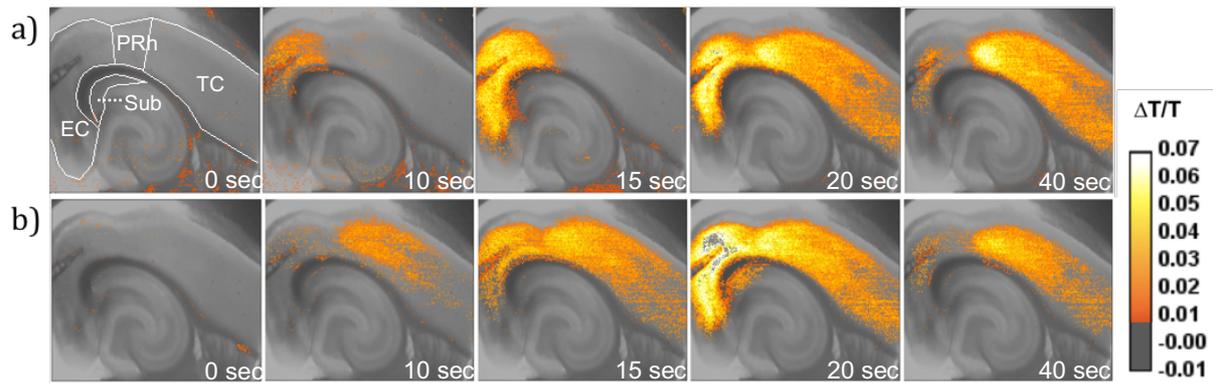


Abbildung 4-18: Darstellung zweier Fotostrecken von AE mit den am häufigsten beobachteten Ursprungsregionen im EC (a) und TC (b).

Ursprungsregionen	Subiculum	Entorhinaler Cortex	Perirhinaler Cortex	Temporaler Cortex	Hippocampus proper
Baseline (n=238)	0,4 %	79,8 %	0,4 %	19,3 %	0 %
Intervention (n=229)	0,4 %	79,5 %	0,9 %	19,2 %	0 %
Wash out (n=283)	1,1 %	81,6 %	0,4 %	17,0 %	0 %

Tabelle 4-1: Darstellung der Häufigkeiten der Ursprungsregionen in Prozent (%) für die drei Bedingungen und alle durchgeführten Experimente: Baseline, Intervention und Wash out. Den deutlich am häufigsten registrierten Ursprung stellt der entorhinale Cortex dar, der temporale Cortex ist der Zweithäufigste. Das Subiculum und der perirhinale Cortex waren nur selten die Ursprungsregion. Die Regionen differierten in den Experimenten nicht. Im Hippocampus proper war bei keiner Bedingung ein Ursprung eines AE beobachtet worden.

4.2.2 Anzahl involvierter Regionen

In den meisten Schnitten blieb das IOS nicht auf die Ursprungsregion beschränkt, sondern breitete sich in dem jeweiligen Hirnschnitt über weitere Regionen aus. Folgend ist die Anzahl der mit Hilfe des IOS erkannten, involvierter Regionen für alle AE der Kontrollgruppe und Bedingungen dargestellt (Tabelle 4-2).

In der Kontrollgruppe breiteten sich die meisten AE auf alle vier anatomischen Regionen aus, die zuvor ebenfalls als Ursprungsort untersucht wurden. In der Baseline waren es 43 von 47 AE, in der Intervention 47 von 55 AE und im Wash out 52 von 62 AE. Der Hippocampus proper war zu keinem Zeitpunkt involviert.

In der Baseline waren in drei AE nur eine Region und in einem AE drei Regionen betroffen. In der Intervention zeigte sich zudem eine Ausbreitung über insgesamt drei Regionen in acht AE und im Wash out waren in 10 AE insgesamt drei Regionen betroffen.

Kontrollgruppe	1 Region	2 Regionen	3 Regionen	4 Regionen
Baseline (n=47)	6,4 %	0,0 %	2,1 %	91,5 %
Intervention (n=55)	0,0 %	0,0 %	14,6 %	85,5 %
Wash out (n=62)	0,0 %	0,0 %	16,1 %	83,9 %

Tabelle 4-2: Darstellung der Anzahl involvierter Regionen innerhalb aller berücksichtigten AE der Kontrollgruppe für die drei Bedingungen Baseline, Intervention und Wash out: In den meisten AE aller drei Bedingungen wurde intrinsisch optisch eine Ausbreitung der Erregung in allen vier Regionen beobachtet. Am zweit häufigsten folgte die Ausbreitung unter Einbezug von insgesamt drei Regionen.

4.2.3 Ausbreitungsgrad

Die Ausbreitung der AE bewegte sich innerhalb der schon für die Ursprungsregion genannten anatomischen Bereiche: Subiculum, entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex. Der Gyrus dentatus und die Regionen von CA1 und CA3 waren in keinem der Schnitte nach intrinsisch optischen Kriterien involviert. Zuerst wurde der gesamte Bereich der Regionen zusammen untersucht. Anschließend wurde der betroffene Anteil der einzelnen Regionen betrachtet. Es wurde in jeder Region der Ausbreitungsgrad als die Anzahl der Pixel mit signifikanter Transmissionsänderung geteilt durch die Gesamtzahl der Pixel der jeweiligen Region definiert.

In der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Änderung des Ausbreitungsgrades im Verlauf der drei Bedingungen im gesamten Hirnschnitt (Abbildung 4-19). In der Baseline betrug diese $68,5 \pm 8,9 \%$, in der Intervention $68,0 \pm 8,0 \%$ und im Wash out $68,0 \pm 8,2 \%$. Über die dreistündige Messung entsprach dies vergleichbaren Ergebnissen (repANOVA).

Es erfolgte die Untersuchung der Gesamtfläche des Hirnschnitts für LAC und ZNS (Abbildung 4-20). LAC 10 μ M, ZNS 33 μ M und 100 μ M (repANOVA) als auch LAC 100 μ M und ZNS 300 μ M (t-test) zeigten über die Bedingungen keine signifikanten

Änderungen der betroffenen Fläche. Hingegen waren bei LAC 33 μM während der Baseline $66,7 \pm 12,9$ % der Gesamtfläche und während der Intervention $57,3 \pm 15,0$ % der Gesamtfläche betroffen. Im Wash out zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Intervention auf $68,4 \pm 11,8$ % ($p=0,0087$, repANOVA).

Nun erfolgte die Betrachtung des Ausbreitungsgrades an dem Anteil der Fläche für die Subregionen des Hirnschnittes. Der Fokus lag auf LAC 33 μM , welches bereits in der Gesamtfläche signifikante Änderungen aufwies (Abbildung 4-20). Im Sub fiel der Ausbreitungsgrad der epileptiformen Aktivität ausgehend von $67,1 \pm 26,0$ % in der Baseline auf $45,6 \pm 22,2$ % in der Intervention ($p=0,0267$, repANOVA). Im Wash out waren die Werte nicht signifikant unterschiedlich in Bezug zur Intervention mit $62,3 \pm 29,3$ % (repANOVA). Während der EC vergleichbare Werte über die gesamte Zeit für LAC 33 μM zeigte, ließen sich im PRh und TC Änderungen des Flächenanteils der epileptiformen Aktivität feststellen. So betrug dieser im perirhinalen Cortex während der Baseline $62,4 \pm 21,0$ % und während der Intervention $54,6 \pm 19,3$ %. Nach Auswaschen des Medikaments stieg der Ausbreitungsgrad der epileptiformen Aktivität in der dritten Stunde mit $65,6 \pm 15,3$ % im Vergleich zur Intervention an, was als Trend zu werten war ($p=0,0530$, repANOVA). Im temporalen Cortex war die beteiligte Fläche in der Baseline $54,9 \pm 29,6$ %, in der Intervention $41,7 \pm 29,8$ % und im Wash out $60,3 \pm 25,2$ %. Der Anstieg des Ausbreitungsgrades von Intervention zu Wash out stellte sich ebenfalls als Trend dar ($p=0,0707$, repANOVA) (Abbildung 4-21).

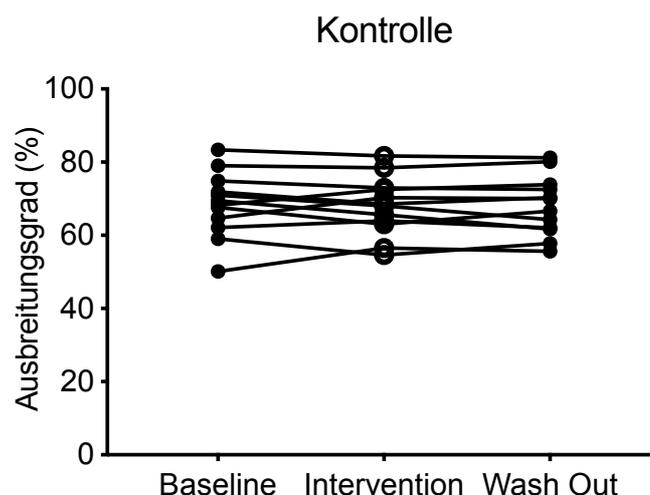


Abbildung 4-19: Darstellung des Ausbreitungsgrades der AE in allen untersuchten anatomischen Strukturen: Subiculum (Sub), entorhinaler Cortex (EC), perirhinaler Cortex (PRh) und temporaler Cortex (TC). In der Kontrollgruppe war der Ausbreitungsgrad über die gesamte Ableitungsdauer stabil.

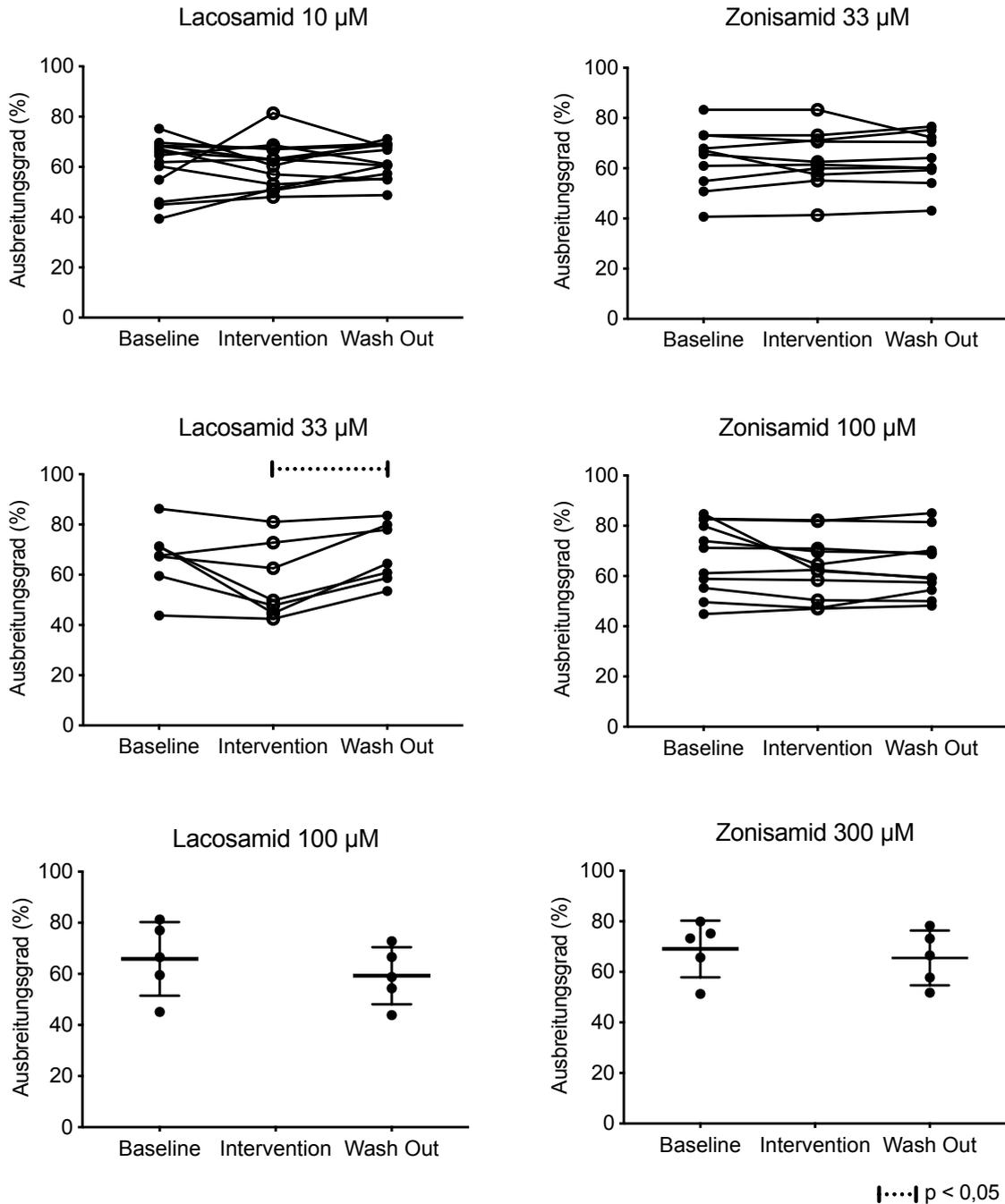


Abbildung 4-20: Der durchschnittlich betroffene Anteil der Gesamtfläche unter Lacosamid 10 µM, 33 µM und Zonisamid 33 µM und 100 µM in den drei Bedingungen, sowie Lacosamid 100 µM und Zonisamid 300 µM im Vergleich von Baseline zu Wash out bei vollständiger AE-Blockade während der Intervention. Bei Lacosamid 33 µM zeigte sich im Wash out ein signifikanter Anstieg der beteiligten Fläche im Vergleich zur Intervention, während die anderen Konzentrationen an Antiepileptika keine Effekte auf den Ausbreitungsgrad der Gesamtfläche des Hirnschnitts zeigten.

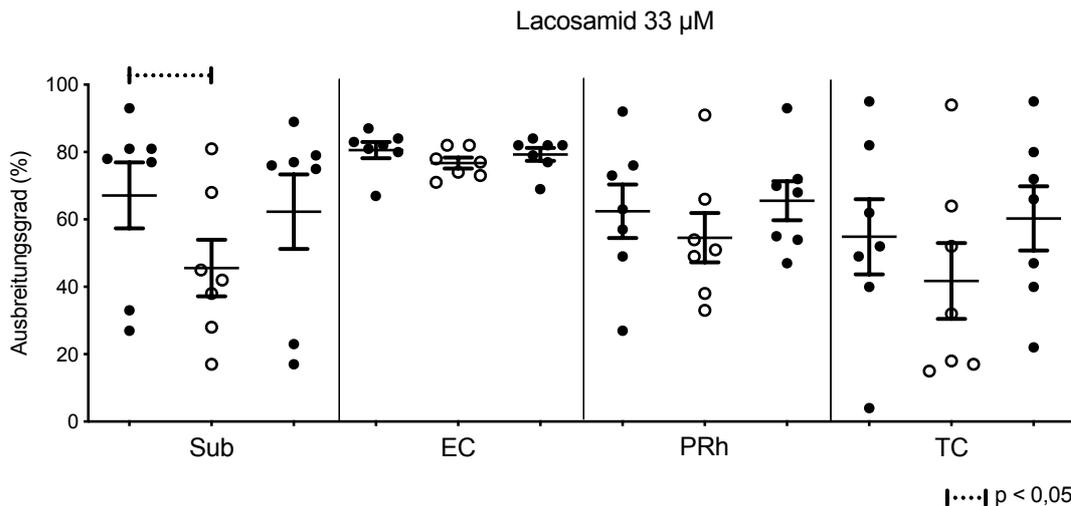


Abbildung 4-21: Darstellung des Ausbreitungsgrades der anatomischen Regionen während der AE innerhalb der drei Bedingungen für Lacosamid 33 μ M. Eine signifikante Reduktion zeigte sich zwischen Baseline und Intervention für Lacosamid 33 μ M im Sub. Ein Trend zum Anstieg zeigte sich zwischen Intervention und Wash out des PRh und des TC. Der EC wies keine relevanten Änderungen auf.

Das Subiculum schien für LAC 33 μ M die sensitivsten Veränderungen darzustellen, so dass für die weiteren Konzentrationen der Antikonvulsiva das Subiculum zur weiteren Untersuchung vorrangig betrachtet wurde.

Für LAC 10 μ M zeigte sich zwischen Baseline und Intervention eine signifikante Reduktion der betroffenen Fläche im Subiculum von $74,6 \pm 18,5$ % auf $64,2 \pm 22,4$ % ($p=0,0180$, repANOVA) (Abbildung 4-22). Im Wash out betrug sie $69,8 \pm 22,1$ % und war nicht signifikant unterschiedlich zur Intervention (repANOVA). Alle anderen Regionen zeigten über die Bedingungen vergleichbare Werte auf. LAC 100 μ M ließ lediglich einen Vergleich zwischen Baseline und Wash out bei AE-Blockade in der Intervention zu. Zwischen diesen Bedingungen bestanden vergleichbare Werte für das Subiculum (t-test) (Abbildung 4-23) als auch für die anderen Regionen (t-test) (grafisch nicht dargestellt). ZNS 33 μ M hatte keine Auswirkungen auf den Anteil der betroffenen Regionen, während ZNS 100 μ M einen Abfall des Ausbreitungsgrades des Subiculum zwischen Baseline mit $50,4 \pm 25,5$ % und Intervention $39,4 \pm 24,8$ % als Trend aufwies ($p=0,0603$, repANOVA) (Abbildung 4-22).

Entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex wurden durch das Einwaschen oder den Entzug von ZNS 100 μ M nicht signifikant beeinflusst (repANOVA). Bei ZNS 300 μ M erfolgte der Vergleich von Baseline zu Wash out bei vollständiger AE-Blockade in der Intervention. Das Subiculum zeigte hier keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 4-23), jedoch war ein signifikanter Anstieg im perirhinalen

Cortex von $82,2 \pm 5,3$ % in der Baseline zu $87,2 \pm 6,6$ % im Wash out nachzuweisen ($p=0,0426$, t-test; grafisch nicht dargestellt).

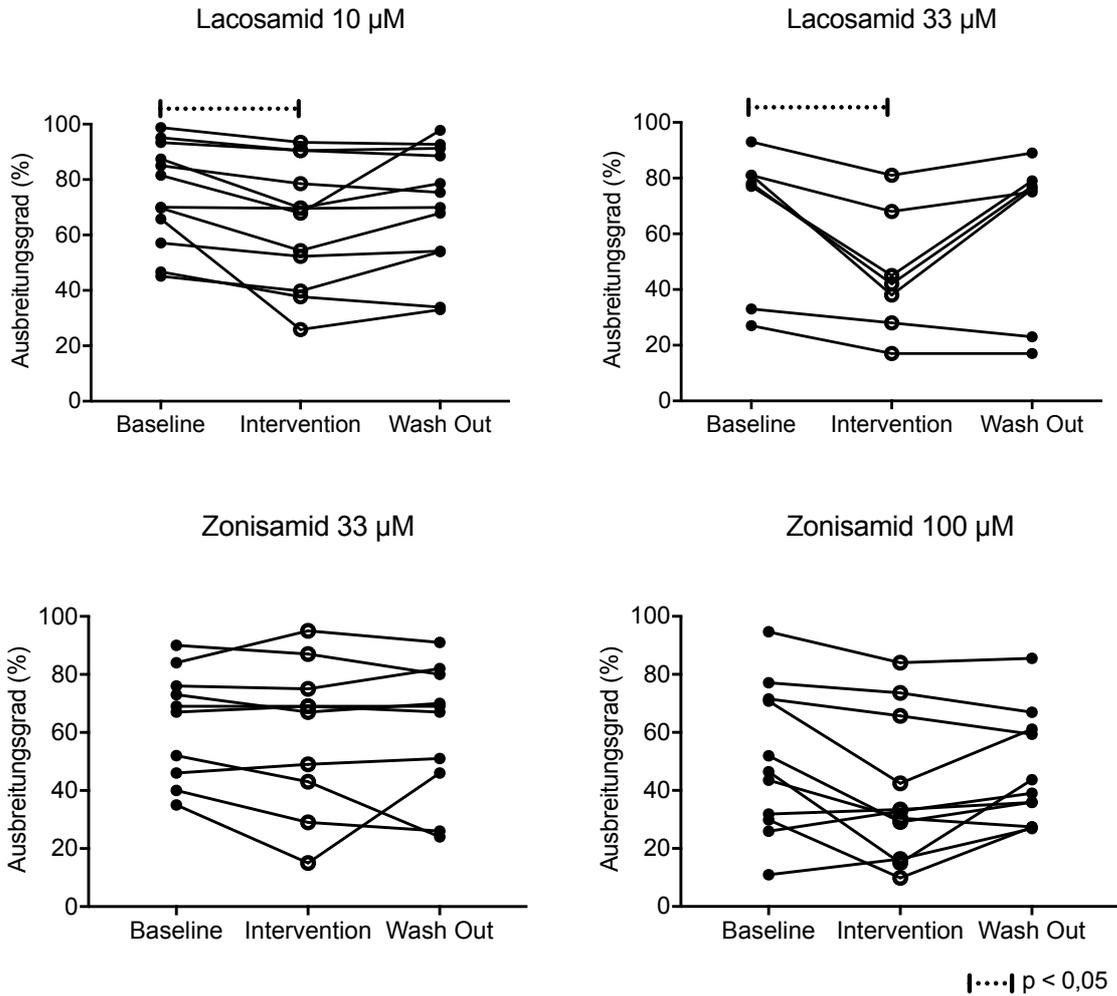


Abbildung 4-22: Darstellung des Ausbreitungsgrades im Subiculum während der AE innerhalb der drei Bedingungen für die niedrigen und mittleren untersuchten Konzentrationen von Zonisamid und Lacosamid. Eine signifikante Reduktion des Ausbreitungsgrades zeigte sich von der Baseline zur Intervention für Lacosamid 10 µM und 33 µM.

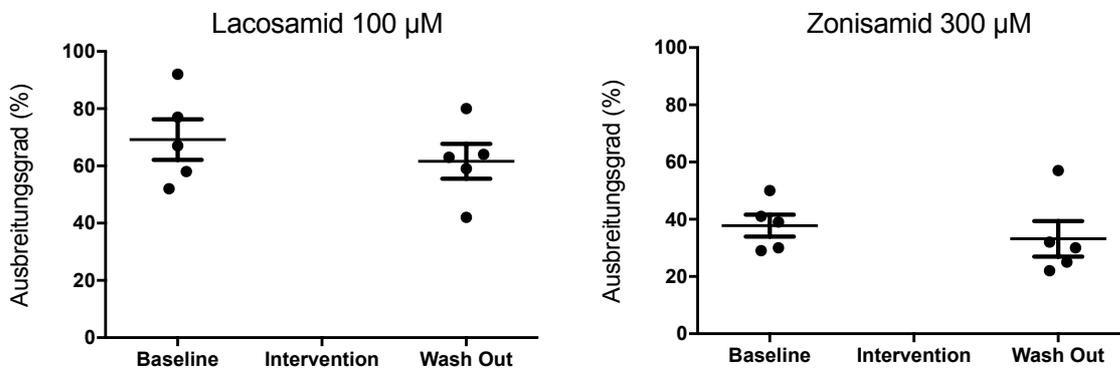


Abbildung 4-23: Darstellung des Ausbreitungsgrades im Subiculum, während der AE von Baseline und Wash out, für die höchste untersuchte Konzentration von Zonisamid und Lacosamid. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied vor und nach der AE-Blockade.

Im Folgenden wurde ein Intergruppenvergleich durchgeführt. Es wurde der Quotient aus Intervention und Baseline des Ausbreitungsgrades gebildet, um die Effekte der Medikamentengruppen mit denen der Kontrollgruppe zu vergleichen (Abbildung 4-24). Für die Gesamtfläche zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Im Subiculum kam es zu einer signifikanten Reduktion der beteiligten Fläche durch LAC 33 μM in der Intervention von $68,1 \pm 16,9 \%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $89,9 \pm 21,6 \%$ ($p=0,0491$, oneANOVA). Alle anderen Medikamentengruppen hatten einen mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Quotienten von Intervention zu Baseline.

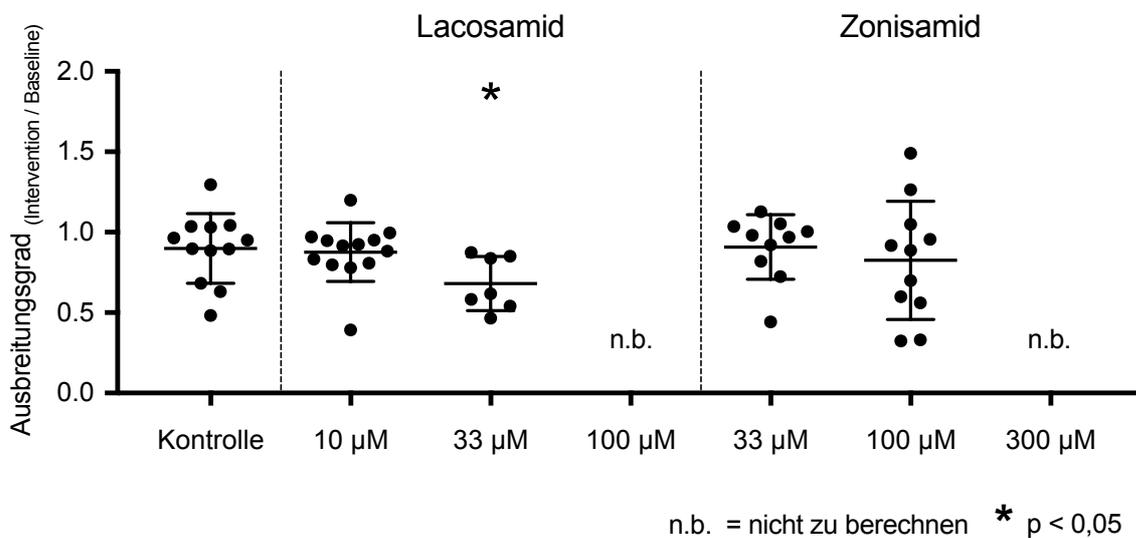


Abbildung 4-24: Der Intergruppenvergleich der Antikonvulsiva Lacosamid und Zonisamid mit der Kontrollgruppe anhand der für jedes Experiment gebildeten Quotienten aus Intervention zu Baseline für den betroffenen Anteil der Fläche des Subiculum. Für Lacosamid 33 μM zeigte sich eine signifikante Reduktion des Quotienten Intervention zu Baseline im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Lacosamid und Zonisamid in den höchsten Konzentrationen ließen sich, bei vollständiger Anfallsunterdrückung während der Intervention, keine Quotienten bilden.

4.2.4 Maximale Transmissionsänderung

Aufgrund der durch LAC 10 μM und 33 μM resultierenden Reduktion der betroffenen Fläche während der AE wurde anschließend untersucht, ob es unter LAC zu einer geringeren maximalen Transmissionszunahme kommt. Im Folgenden wird für jede involvierte anatomische Region (Subiculum, entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex) der ROI mit der maximalen Transmissionsänderung über die Zeit des AE betrachtet.

Die Kontrollgruppe zeigte zwischen Baseline, Intervention und Wash out für alle untersuchten anatomischen Regionen keine Unterschiede (repANOVA)(Abbildung 4-25).

Die durchschnittliche maximale Transmissionsänderung bewegte sich zwischen $0,99 \pm 0,4$ % (Sub; Stunde 3/Wash out) und $3,73 \pm 0,85$ % (EC; Stunde 2/Intervention). Sie war durchschnittlich am größten für den entorhinalen Cortex, gefolgt von temporalem Cortex und perirhinalen Cortex und am kleinsten für das Subiculum (Tabelle 4-3). LAC zeigte konzentrationsabhängige Effekte auf die maximale Transmissions-änderung (Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27).

In niedrigster LAC-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ stellte sich von der Baseline zur Intervention eine signifikante Reduktion der maximalen Transmissionsänderung im Subiculum von $1,43 \pm 0,72$ % auf $1,13 \pm 0,71$ % dar ($p=0,0148$, repANOVA). Von Intervention zu Wash out zeigte sich ein Anstieg auf $1,26 \pm 0,67$ %, welcher als Trend zu werten war ($p=0,0921$, repANOVA).

Die anderen Bereiche zeigten in der niedrigsten LAC-Konzentration keine signifikanten Unterschiede über die Zeit (repANOVA).

LAC $33 \mu\text{M}$ führte im Sub ebenfalls zu einem signifikanten Abfall von $\max\Delta T/T$ von der Baseline zur Intervention ($p=0,0306$, repANOVA) und von der Intervention zum Wash out zu einem signifikanten Anstieg ($p=0,0305$, repANOVA): Baseline $1,35 \pm 0,61$ %, Intervention $0,60 \pm 0,51$ %, Wash out $1,24 \pm 0,66$ %. Auch im EC zeigte sich eine signifikante Reduktion von der Baseline zur Intervention durch LAC $33 \mu\text{M}$ ($p=0,0209$, repANOVA): Baseline $3,60 \pm 1,04$ %, Intervention $3,12 \pm 0,90$ %, Wash out $3,76 \pm 0,90$ %. Der anschließende Wiederanstieg von der Intervention zum Wash out war nicht signifikant unterschiedlich.

Die Transmissionsänderung eines Experiments mit LAC $33 \mu\text{M}$ wurde visuell (Abbildung 4-31) als auch über die Zeit gemessen als Plot dargestellt (Abbildung 4-32). Im perirhinalen und temporalen Cortex konnte während der Intervention kein signifikanter Effekt beobachtet werden. Im anschließenden Wash out von LAC $33 \mu\text{M}$ zeigte sich ein signifikanter Anstieg in Bezug zur Intervention in den beiden Regionen (PRh: $p=0,0054$, TC: $p=0,0257$, je repANOVA): PRh: Baseline $2,19 \pm 1,02$ %, Intervention $1,69 \pm 0,91$ %, Wash out $2,52 \pm 1,09$ %; TC: Baseline $3,60 \pm 1,04$ %, Intervention $3,12 \pm 0,90$ %, Wash out $3,76 \pm 0,90$ %.

Die maximalen Transmissionsänderungen vor und nach vollständiger Blockade durch LAC $100 \mu\text{M}$ zeigten vergleichbare Ergebnisse zwischen Baseline und Wash out (t-test) (Abbildung 4-29).

ZNS $33 \mu\text{M}$ ließ keine Auswirkung auf die maximale Transmissionsänderung des Hirnschnittes erkennen (repANOVA). Unter ZNS $100 \mu\text{M}$ kam es zu einer Abnahme von

max Δ T/T von der Baseline zur Intervention im Subiculum (p=0,0269, repANOVA): Baseline 1,13 \pm 0,65 %, Intervention: 0,79 \pm 0,56 %, Wash out 0,94 \pm 4,7 % (Abbildung 4-28).

Die maximalen Transmissionsänderungen vor und nach Blockade durch ZNS 300 μ M zeigten keine signifikanten Unterschiede (t-test) (Abbildung 4-29).

Im anschließend durchgeführten Intergruppenvergleich, hatte LAC 33 μ M einen signifikant kleineren Quotienten von Intervention zu Baseline als die Kontrollgruppe für das Subiculum (p=0,0034, oneANOVA): Kontrollgruppe 88,28 \pm 28,09 %, LAC 33 μ M 41,24 \pm 30,63 %. Die anderen Medikamentengruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (oneANOVA) (Abbildung 4-30).

Maximale Transmissions-Änderung (in %)	Subiculum	Entorhinaler Cortex	Perirhinaler Cortex	Temporaler Cortex
Baseline (n=12)	1,18 \pm 0,49	3,72 \pm 0,92	2,46 \pm 1,33	2,46 \pm 1,45
Intervention (n=12)	1,00 \pm 0,40	3,73 \pm 0,85	2,74 \pm 1,61	2,86 \pm 1,80
Wash out (n=12)	0,99 \pm 0,40	3,64 \pm 0,94	2,81 \pm 1,65	2,82 \pm 1,82

Tabelle 4-3: Darstellung der maximalen Transmissionsänderung für die Kontrollgruppe in den vier unterteilten Subregionen Subiculum, entorhinaler Cortex, perirhinaler Cortex und temporaler Cortex. Innerhalb der dreistündigen Messungen bleibt die maximale Transmissionsänderung stabil und ist im entorhinalen Cortex am größten und im Subiculum am kleinsten.

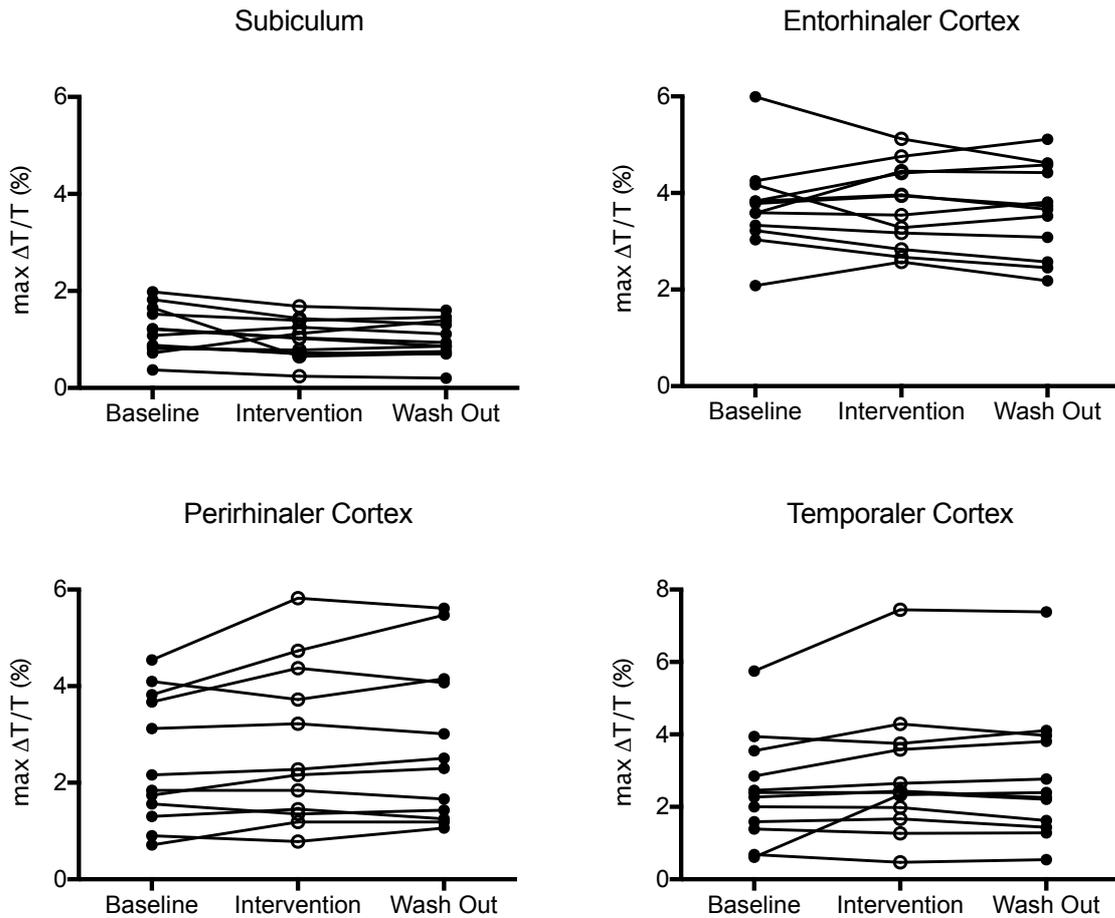


Abbildung 4-25: Darstellung der pro Experiment und Bedingung gemittelten maximalen Transmissionsänderung ($\max \Delta T/T$) über die Zeit für die vier untersuchten anatomischen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe ($n=12$). Es konnte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Regionen für die verschiedenen Bedingungen aufgezeigt werden.

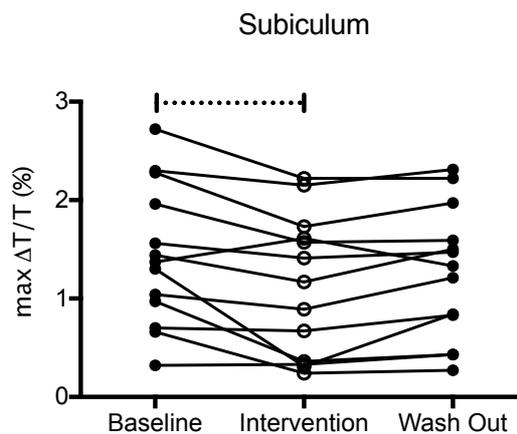


Abbildung 4-26: Darstellung der maximalen Transmissionsänderung ($\max \Delta T/T$) gemessen im Subiculum für Baseline, Intervention und Wash out mit Lacosamid $10 \mu\text{M}$. Nach Addition von Lacosamid folgt in der Intervention eine signifikante Reduktion von $\Delta T/T$. Der folgende Anstieg im Wash out ist nicht signifikant different zu der Intervention.

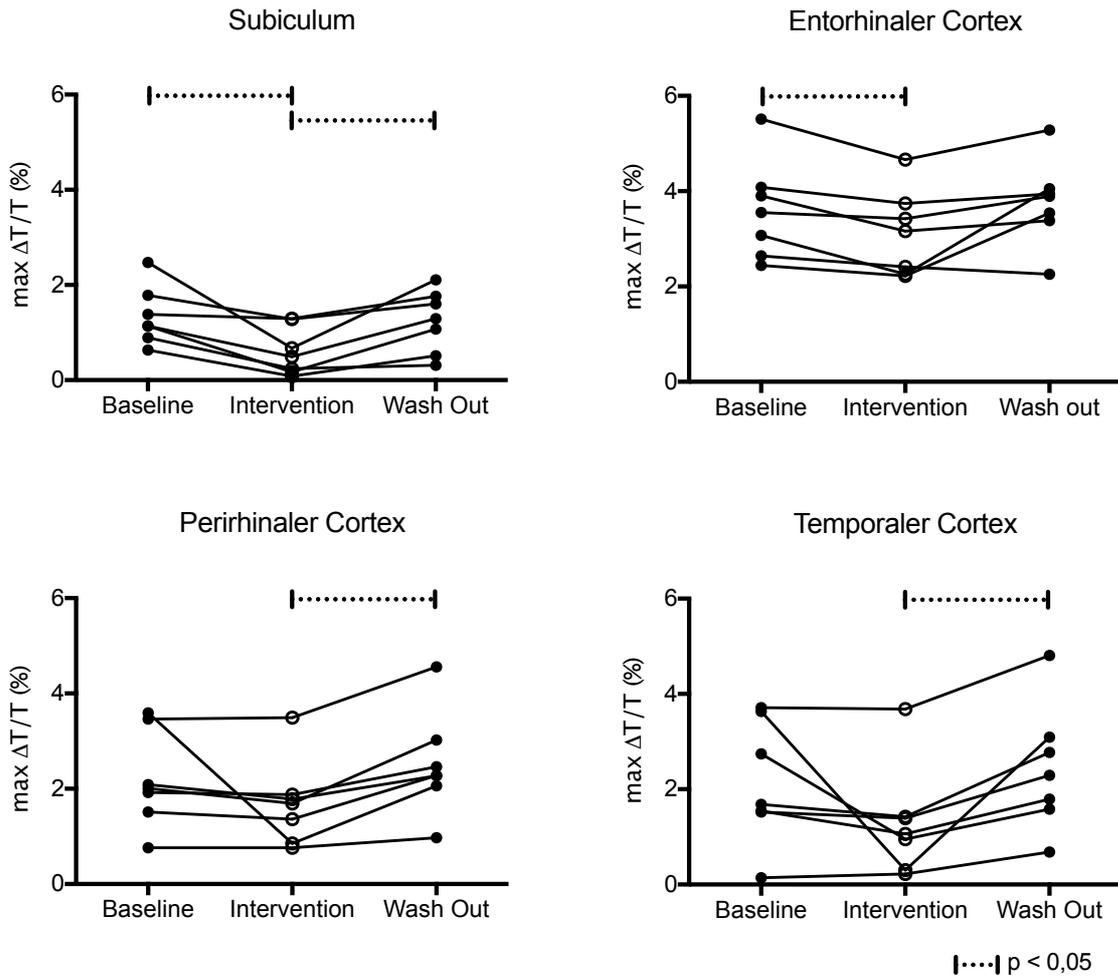


Abbildung 4-27: Darstellung der pro Experiment und Bedingung gemittelten maximalen Transmissionsänderung ($\max\Delta T/T$) über die Zeit für die vier untersuchten anatomischen Regionen für Lacosamid 33 μM . $\max\Delta T/T$ fiel durch Lacosamid 33 μM im Subiculum und entorhinalen Cortex von der Baseline zur Intervention signifikant und zeigte von der Intervention zum Wash out wieder einen Anstieg, welcher im Subiculum signifikant war. Im perirhinalen und temporalen Cortex folgte von der Intervention zum Wash out ein signifikanter Anstieg.

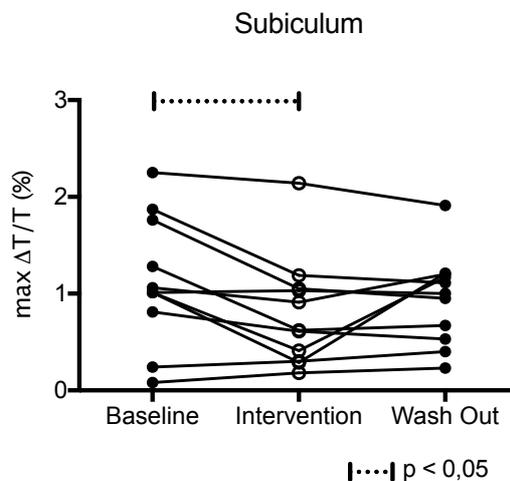


Abbildung 4-28: Zonisamid 100 μM zeigte eine signifikante Reduktion der maximalen Transmissionsänderung ($\max\Delta T/T$) im Subiculum von der Baseline zur Intervention.

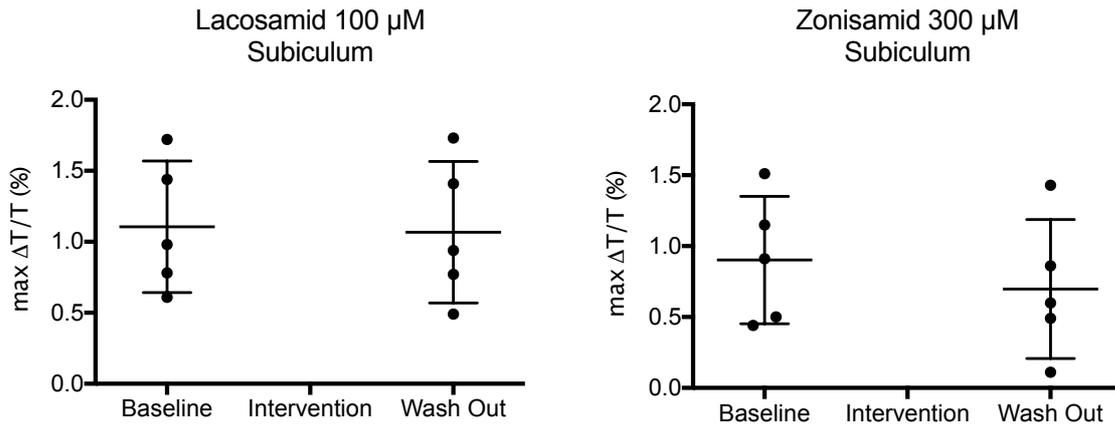


Abbildung 4-29: Darstellung der gemittelten maximalen Transmissionsänderung ($\max\Delta T/T$) im Subiculum für die höchsten untersuchten Medikamentenkonzentrationen. Vor und nach vollständiger Blockade des AE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede von $\Delta T/T$.

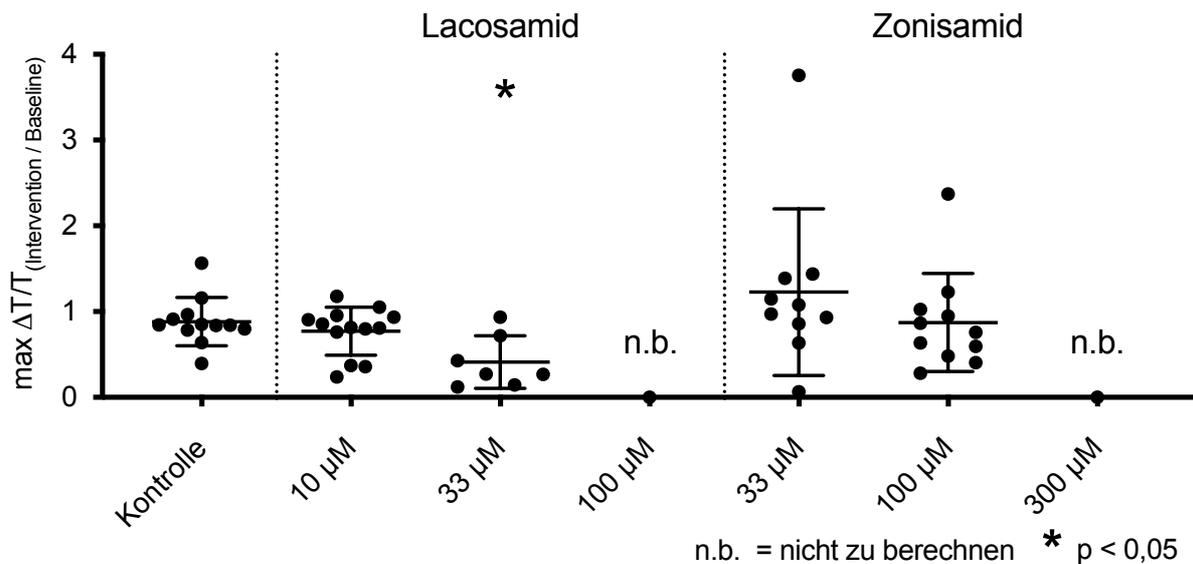


Abbildung 4-30: Darstellung des Quotienten von Intervention und Baseline der gemittelten maximalen Transmissionsänderung ($\max\Delta T/T$) im Subiculum für die Kontrollgruppe, Lacosamid und Zonisamid im Intergruppenvergleich. Für Lacosamid 33 μM zeigte sich eine signifikante Reduktion von $\max\Delta T/T$ im Subiculum. Für die höchsten Konzentrationen ließ sich bei vollständiger AE-Blockade in der Intervention kein Quotient berechnen.

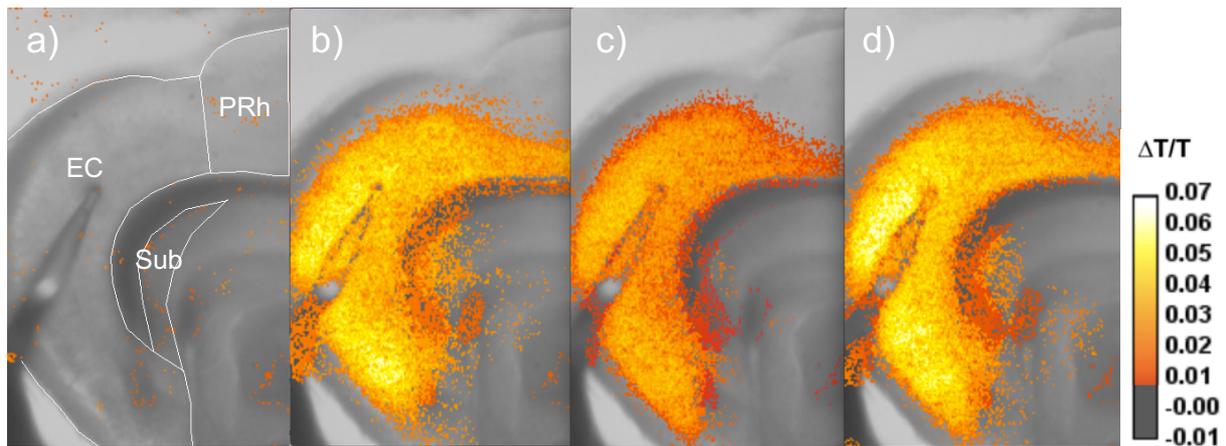


Abbildung 4-31: Darstellung der Transmissionsänderung mittels Farbkodierung über die drei Bedingungen für Lacosamid 33 μM . Das Bild a) zeigt die Regionen PRh, EC, Sub interiktal und die Bilder b) - d) sind aus der Bildsequenz der maximalen Ausbreitung je eines AE desselben Hirnschnitts aus Baseline, Intervention und Wash out ausgewählt. In der Baseline zeigt sich eine deutliche Erregung von EC und Sub (b), welcher unter Wirkung von Lacosamid 33 μM in der Intervention sowohl von dem Ausbreitungsgrad als auch der maximalen Transmissionsänderung (c) abnimmt. Im Wash out (d) wurde eine ungefähr der Baseline entsprechende Ausbreitung erreicht.

Lacosamid (33 μM): Transmissionsänderung über die Zeit im Subiculum

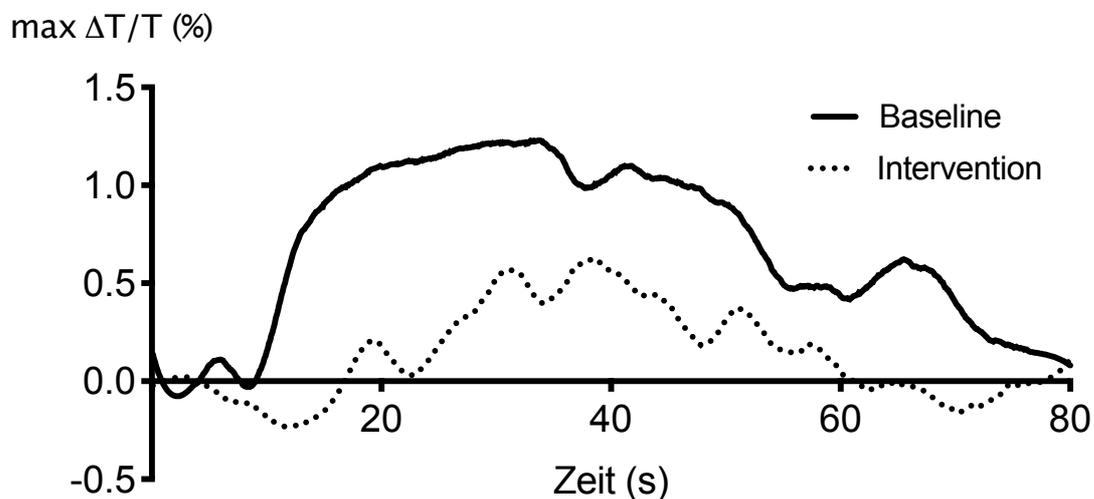


Abbildung 4-32: Darstellung der Transmissionsänderung ($\Delta T/T$) während zweier AE eines Experiments, jeweils in dem ROI mit dem maximalen $\Delta T/T$ im Subiculum gemessen: Lacosamid 33 μM führt im Vergleich zur Baseline zu einer deutlichen Reduktion der Transmissionszunahme während der Intervention.

5 Diskussion

5.1 Kontext der vorliegenden Arbeit aus klinischer Sicht - Grundsätzliche Überlegung

Die Behandlung der Epilepsien umfasst meist die Gabe von mindestens einem Antikonvulsivum. Obwohl in den letzten Dekaden zahlreiche neue Antikonvulsiva zugelassen wurden, sank der Anteil an therapierefraktären Epilepsien nicht (Marson, 2007). Hier gilt kritisch zu hinterfragen, inwiefern die schon seit vielen Dekaden bestehenden *in vivo* Modelle zum Screening von neuen antikonvulsiven Molekülen ein ausreichend breites Spektrum an neuen Medikamenten entdecken können. Insbesondere *in vivo* Modelle stellen zudem eine hohe Belastung für die Tiere dar. Es ist deshalb unumgänglich, auch *in vitro* Modelle zur Untersuchung von antikonvulsiven Molekülen heranzuziehen.

Bisher ist nur wenig über die Wirksamkeit der Antikonvulsiva der dritten Generation in *in vitro* Modellen bekannt. Das akute Rattenschnittmodell *in vitro* mit 4-AP wird seit mehr als drei Dekaden zur Erforschung elektrophysiologischer und epileptologischer Fragestellungen eingesetzt. Die Nutzung des Modells beinhaltet in unserem Labor die elektrophysiologische Messung mittels extrazellulär platzierter Elektroden sowie die Untersuchung der Lokalisation von Ursprung und Ausbreitung epileptiformer Aktivität mittels des intrinsisch optischen Signals. Dieser Ansatz erschien sinnvoll, um die AE auf Effekte von Antikonvulsiva der dritten Generation zu untersuchen und das Modell als potentiell *in vitro* Screening-Modell für antikonvulsive Substanzen in einem ersten Ansatz kritisch zu hinterfragen.

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die elektrophysiologischen und intrinsisch optischen Effekte neuer Antikonvulsiva auf die durch 4-AP erzeugte epileptiforme Aktivität in einem akuten Rattenschnittmodell *in vitro*.

Die Ergebnisse der Studie sind im Folgenden zusammengefasst: Es wurden 68 kombinierte hippocampal-entorhinale Hirnschnitte von 48 Wistar Han Ratten auf die Wirksamkeit von zwei Antikonvulsiva der dritten Generation, LAC und ZNS, untersucht. AE wurden durch 4-AP induziert und folgende signifikante Effekte auf die zu

untersuchenden Parameter konnten im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden:

LAC und ZNS führten konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Frequenz der AE. Die Amplitude der AE blieben weitestgehend unbeeinflusst durch die eingesetzten Antikonvulsiva. Die AE-Dauer wurde durch Lacosamid in mittlerer Konzentration reduziert. Die absolute und relative Dauer der tonischen Phase wurde durch LAC konzentrationsabhängig reduziert. Eine vollständige AE-Unterdrückung wurde durch LAC und ZNS in der von uns gewählten höchsten Konzentration für alle Experimente erzielt. Der Anfallsursprung betraf hauptsächlich den entorhinalen und temporalen Cortex und wurde durch die Medikamente nicht beeinflusst. LAC führte zu einer Reduktion des Ausbreitungsgrades und der Transmissionsänderung im Subiculum. Ein wesentlicher Anteil der beobachteten Effekte war im Wash out reversibel, so dass davon auszugehen ist, dass die beobachteten Effekte in der Intervention auf die Substanzapplikation zurückzuführen sind.

5.3 Bewertung der elektrophysiologischen Ergebnisse

Es wurden 68 Hirnschnitten von 48 Wistar Han Ratten mit elektrophysiologisch messbare AE im entorhinalen Cortex untersucht und abschließend eingeschlossen. Neben den ictalen Ereignissen, zeigte sich auch interiktale Aktivität in Form von kurzen Entladungen im entorhinalen Cortex. Diese Form der epileptiformen Aktivität wurde in vorangegangenen Studien mehrfach beschrieben (Avoli et al., 1996, Benini et al., 2003, D'Antuono et al., 2010). Sie wird meist mit der interiktalen Aktivität *in vivo* verglichen. Die klinische Relevanz und der diagnostische Mehrwert werden in der Literatur kritisch diskutiert (Usui et al., 2008, Jacobs et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die interiktale Aktivität aufgrund ihrer bisher ungeklärten Bedeutung nicht weiter analysiert.

5.3.1 AE-Frequenz

Die Reduktion der Frequenz der AE durch ZNS und LAC im entorhinalen Cortex ist vergleichbar mit der Wirkung schon zuvor untersuchter Antikonvulsiva in diesem *in vitro*-Modell mit 4-AP. Die klassischen Antikonvulsiva Carbamazepin, Phenytoin, Phenobarbital und Valproat blockierten die epileptiforme Aktivität im entorhinalen Cortex vollständig, während kaum Auswirkungen auf die Entladungen in der Region CA1

beobachtet werden konnten (Bruckner und Heinemann, 2000). Die Arbeitsgruppe um D'Antuono konnte die inhibierenden Einflüsse auf die epileptiforme Aktivität von Valproat, Carbamazepin und Topiramaten zeigen, während die interiktale Aktivität, kürzer als 3 Sekunden andauernd, nicht durch die Antikonvulsiva beeinflussbar schien (D'Antuono et al., 2010). Somit erscheint die Frequenzreduktion und Blockade der AE im entorhinalen Cortex als sinnvoller *in vitro* Surrogatparameter für die Wirksamkeit der AED.

Lees et al. untersuchten die Effekte von LAC und seines Stereoisomers im visuellen Cortex der Ratte (Lees et al., 2006). Die Arbeit konnte die konzentrationsabhängige Reduktion der epileptiformen Aktivität, erzeugt durch 4-AP, mittels LAC im visuellen Cortex nachweisen. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, wurden die Hirnschnitte vollständig in die Lösung eingetaucht (Submerged-Bedingungen; siehe 2.3.1 Kombinierte Hirnschnitte *in vitro*). Die vollständige Blockade wurde in der Konzentration von 100 μM in 3 von 8 Schnitten erzielt und in der Konzentration von 320 μM in 5 von 5 Schnitten. In unserer Arbeit zeigte LAC bereits in der Konzentration von 100 μM in allen Schnitten eine vollständige und reversible Blockade ($n=5$). Ein Grund der höheren Wirksamkeit in unserer Arbeit könnte in der Hirnschnittdicke liegen, die im Vergleich zu Lees et al., 50 μm dünner war (400 μm zu 450 μm) und somit einen kürzeren Diffusionsweg für die antikonvulsiven Substanzen notwendig machte. Dies führte zu einer kürzeren Latenz bis zur erreichten Zielkonzentration im Gewebe. Verstärkt wird der Effekt durch die von uns genutzten Interface-Bedingungen, welche im Vergleich zu der von Lees et al. gewählten Submerged-Bedingungen zu einem kleineren Volumen des extrazellulären Raums führt (Schuchmann et al., 2002). Es lässt sich annehmen, dass in dem relativ kleineren extrazellulären Volumen die gleiche Menge einer antikonvulsiven Substanz in einer entsprechend höheren Konzentration vorliegt. Weiterhin verwendeten Lees et al. im Gegensatz zu uns kein Lösungsmittel für LAC, welches eine schnellere Diffusion bedingen könnte. Schließlich ist eine unterschiedliche Sensibilität der parahippocampalen Strukturen im Vergleich zum visuellen Cortex zu diskutieren. Zusammenfassend zeigt unsere Arbeit eine Frequenzreduktion in den parahippocampalen Strukturen durch LAC, welche zuvor in ähnlicher Form im visuellen Cortex gezeigt worden war.

Die stetige Abnahme der AE-Frequenz in der Kontrollgruppe geht mit einer Zunahme der AE-Dauer einher. Zu vermuten ist eine einerseits in der Baseline noch nicht vollständig erreichte stabile Phase der AE innerhalb der ersten Stunde, andererseits eine Abnahme der Frequenz durch Untergang von Neuronen oder/und eine Verschiebung der Schwelle

für AE. Auch unter den unterschiedlichen Konzentrationen von ZNS zeigte sich eine signifikante Abnahme der AE-Frequenz von der Baseline im Vergleich zum Wash out. Hingegen ist nach LAC in keiner der verwendeten Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Frequenz von der Baseline zum Wash out beobachtet worden. Ursächlich könnte ein protektiver Effekt von LAC sein. So kann die Blockade der Natriumkanäle durch LAC zu weniger Depolarisation der Neurone und somit zu weniger Aktionspotential-Aktivität führen. Konsistent mit dieser Hypothese stehen beobachtete Effekte im *in vivo* Modell der mesialen Temporallappenepilepsie durch Behr et al. Hierfür wurden Ratten nach Pilocarpin-induziertem Status epilepticus mittels EEG-Monitoring mit hippocampal angebrachten bipolaren Elektroden sowohl auf die Anfallshäufigkeit als auch auf die interiktale Aktivität hin untersucht. Bei mit LAC behandelten Tieren zeigte sich eine Reduktion der interiktalen Spikes im Vergleich zu einer mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe (Behr et al., 2015). Der geringere Energieumsatz durch einen geringeren Verbrauch von ATP kann somit zu einer höheren Ischämie-Toleranz und folglich zu einem reduzierten Abfall der AE-Frequenz über die Zeit führen.

5.3.2 Responder-Rate

Die Responder-Rate von LAC 33 μM lag in der vorliegenden Arbeit bei 50 % ($n=10$). Halász et al. beschrieben in einer klinischen randomisierten kontrollierten Studie bei der Gabe von 400 mg LAC pro Tag als Zusatztherapie bei Patienten mit pharmakoresistenter fokaler Epilepsie eine Responder-Rate von 46,3 % (Halasz et al., 2009). Die ähnlichen Responder-Raten lassen eine Vergleichbarkeit der klinischen Wirksamkeit mit der Wirksamkeit *in vitro* vermuten.

Die therapeutische Dosierung von Lacosamid wird im Bereich von 4 μM bis 40 μM im Blutplasma beschrieben, womit unsere Spiegel für LAC 10 und 33 μM abgebildet werden. Die vollständige Blockade bei 100 μM würde verglichen mit Blutplasmakonzentrationen einer toxischen Dosierung entsprechen (Schulz et al., 2012).

Die Vergleichbarkeit der Medikamentendosierungen *in vivo* und *in vitro* ist jedoch eingeschränkt möglich. Eine Limitation stellt hier die unbekannte effektive Substanzmenge am eigentlichen Wirkort, den Synapsen und den Zellmembranen, dar. Nach Einnahme eines Antikonvulsivums geht nur ein Teil des Medikaments, abhängig von der Bioverfügbarkeit, in das Blut über. Um an den Wirkort zu gelangen, hat das

Medikament durch ein ausgedehntes neuronales Kapillarnetzwerkes noch eine kurze Diffusionsstrecke *in vivo* zu überwinden, in welcher zusätzlich die Passage der Blut-Hirnschranke liegt, mit einem unklaren Einfluss auf die endgültig erreichte Menge des Antiepileptikums an den Neuronen. Auch die anschließend im Liquor resultierenden Medikamentenkonzentrationen stellen eher eine Korrelation der Medikamentenmenge am Wirkort dar. Eine invasivere Untersuchung des Gewebes scheint hier jedoch nicht angemessen, so dass man *in vivo* auf die Parameter der Serum- und Liquorkonzentration zurückzugreifen hat. *In vitro* ist die Medikamentenkonzentration unter Interface-Bedingungen durch das Überwinden einer größeren Diffusionsstrecke durch den 400 µm dicken Hirnschnitt am Wirkort ebenfalls unbekannt. Es lässt sich durch den Umstand der größeren Diffusionsstrecke postulieren, dass im ACSF höhere Konzentrationen als im Serum für ähnliche Medikamenteneffekte notwendig sind.

May et al. untersuchten an 21 Patienten und 27 Proben nach Gabe von LAC (50 – 600 mg/d) die Serum- und Liquorkonzentrationen. Im Liquor fanden sich LAC-Konzentrationen von $7,37 \pm 3,73 \mu\text{g/ml}$ ($n=27$), entsprechend $29,4 \pm 14,9 \mu\text{M}$ (May et al., 2015). In Zusammenschau der Ergebnisse ähnelt die von uns gewählte mittlere LAC-Konzentration, einschließlich ihrer Wirksamkeit, der im Patienten wirksamen Konzentration. In diesem Aspekt ist das von uns genutzte *in vitro* Modell vergleichbar mit der *in vivo* Wirksamkeit im Menschen. Es lässt sich vermuten, dass die LAC-Effekte auf die Responder-Rate von humanen Liquorkonzentrationen vergleichbar mit den genutzten Konzentrationen im ACSF im akuten Rattenschnittmodell *in vitro* sind.

Die therapeutischen Dosierungen für ZNS werden mit Blutplasmaspiegeln zwischen $47,13 \mu\text{M}$ und $188,5 \mu\text{M}$ beschrieben, in dessen Bereich sich auch die niedrigste und mittlere von uns gewählte ZNS-Konzentration mit $33 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ befinden. Der toxische Bereich wird mit Spiegeln über $188,5 \mu\text{M}$ beschrieben und entspricht wie bei LAC unserer höchsten gewählten Dosierung (Schulz et al., 2012).

Bezüglich ZNS untersuchten Kumagai et al. die Konzentrationen im Serum, Speichel und Liquor von Kindern und Erwachsenen im Alter zwischen zehn Monaten und 19 Jahren, die zweimal täglich ZNS unbekannter Menge einnahmen. Von zwei von 45 Patienten lagen auch die Liquorkonzentrationen vor, wobei diese im Verhältnis zur Serumkonzentration um 36 bzw. 38 % kleiner waren und $17,9$ bzw. $28,5 \mu\text{g/ml}$ entsprachen (Kumagai et al., 1993). Dies entspricht einer molaren Konzentration von $84,3$ bzw. $134,3 \mu\text{M}$ und ist mit der von uns eingesetzten mittleren Konzentration von

ZNS (100 μM) vergleichbar. In unserer Arbeit betrug die Responder-Rate von ZNS mit 100 μMol ($n=10$) 38,5 %. In der OZONE Studie, einer prospektiven observationalen Studie an Erwachsenen mit fokaler Epilepsie, mit einer Verabreichung von Tagesdosen von 25 oder 50 mg ZNS und anschließenden Erhaltungsdosen von 300 mg pro Tag zeigten sich deutlich höhere Responder-Raten von 61,9 und 65,9 %, (Dupont et al., 2013). Die fehlenden Angaben von Liquor- und Serumkonzentration lassen leider keinen genaueren Vergleich von Medikamentenspiegel und Wirksamkeit zu. Auch Faught et al. untersuchten in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie die Frequenzreduktion und Responder-Rate von ZNS. Den Patienten wurden Dosen von 100 mg, 200 mg oder 400 mg pro Tag verabreicht, die zu Serumkonzentrationen von ca. 3,7; 7 und 18,3 $\mu\text{g/ml}$ führten, entsprechend ca. 17,4; 33 und 86 μM ($n=55$; $n=53$; $n=66$). Die Liquorkonzentrationen wurden nicht bestimmt. Nach Kumagai et al. erwarten wir jedoch eine um ca. ein Drittel niedrigere Konzentration. Bei einer Serumkonzentration von 86 μM zeigte sich bei Faught et al. bereits eine mediane Reduktion der Anfallsfrequenz von 40,5 % und eine Responder-Rate von 42 %. Somit scheinen die Effekte für ZNS in unserem *in vitro* Modell deutlich schwächer auszufallen. Weitere Untersuchungen zu erreichten Serum- und Liquorkonzentrationen von LAC und ZNS wären wünschenswert. Als Ausblick könnte das akute Rattenschnittmodell als Screeningmodell für effektive Konzentrationen von neuen antikonvulsiven Molekülen dienen und so schon eine Vorhersage für die Phase-II von klinischen Medikamentenstudien geben.

5.3.3 AE-Dauer

Die AE-Dauer in der Kontrollgruppe stieg von der Baseline zu der Intervention signifikant an. Der signifikante Anstieg während der Intervention lässt sich durch ein noch nicht endgültiges Erreichen eines Plateaus für die AE-Dauer in der ersten Stunde erklären. Ursächlich könnte die ischämische Phase während der Hirnschnittpräparation sein. Es resultiert somit eine länger werdende Synchronisation durch eine zunehmende Rekrutierung von Neuronen im Verlauf der Messung. Auch die Hirnschnitte, die als zweites Experiment nach mehr als vierstündiger Inkubation erfolgten, zeigten einen ähnlichen Anstieg der AE-Dauer in der Kontrollgruppe wie die Hirnschnitte nach einstündiger Inkubation, so dass eine längere Inkubation diesen Effekt nicht zu verhindern scheint. Es lässt sich somit annehmen, dass in der zweiten Stunde der Kontrollmessungen die maximale Anfallsdauer erreicht wird. Für die bessere Beurteilung

der AE-Dauer sollte in Zukunft daher ein größeres Zeitintervall für die Baseline unter Berücksichtigung der dabei abnehmenden Viabilität gewählt werden. Im Intergruppenvergleich zeigte sich ausschließlich für die mittlere Konzentration von LAC ein signifikanter Abfall der AE-Dauer des Quotienten von Intervention zur Baseline (Abbildung 4-9). Einen derartigen Einfluss durch LAC konnten Lees et al. ebenfalls am visuellen Cortex unter Submerged-Bedingungen zeigen (Lees et al., 2006). Der von uns beobachtete Effekt bezieht sich im Intergruppenvergleich auf die in der Kontrollgruppe noch ansteigende AE-Dauer in der Intervention und ist somit kritisch zu beurteilen. Nach einer Pubmed-Recherche konnte bisher keine weitere Studie die Reduktion der AE-Dauer im entorhinalen Cortex für andere Antikonvulsiva *in vitro* darstellen (Stand Oktober 2019).

Die Dauer epileptischer Anfälle *in vivo* wird u.a. durch Gap Junctions reguliert (Gajda et al., 2003). LAC und ZNS besitzen keinen direkten Effekt auf die Gap Junctions. Dies unterstützt den fehlenden bis geringen Einfluss auf die Dauer der AE im Vergleich zu dem ausgeprägten Einfluss auf die AE-Frequenz.

Als ursächlich für die geringen Effekte auf die AE-Dauer könnte zudem die Entstehung eines AE herangezogen werden. Diese lässt sich mit dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip eines Aktionspotentials vergleichen. Beim Aktionspotential ist das nach Erreichen des Schwellenpotentials ausgelöste Aktionspotential immer gleich, insbesondere ist es unabhängig von der initialen Reizstärke. Bei den hier beobachteten AE haben wir ein ähnliches Phänomen im Verlauf der Messung beobachten können. Der anfängliche Anstieg der Dauer ist auf eine zunehmende Netzwerkaktivität durch Rekrutierung weiterer Neuronenverbände zurückzuführen. Die Antikonvulsiva führten zu einer Reduktion der AE-Frequenz, entsprechend einer Anhebung der Schwelle für AE, ohne einen deutlichen Einfluss auf die Dauer zu zeigen.

5.3.4 AE-Amplitude

Die im entorhinalen Cortex registrierte Amplitude der AE entsprach von der Größenordnung vorherigen Experimenten mit 4-AP an juvenilen Rattenschnitten (Weissinger et al., 2005). Jones und Heinemann konnten im Niedrig-Magnesium-Modell zeigen, dass der laterale entorhinale Cortex die größten DC-Shifts (englisch: direct current-shifts) und damit Amplitude der AE im Vergleich zu Sub, medialen EC und PRh aufwies (Jones und Heinemann, 1988). In der Kontrollgruppe nahm die Amplitude über

die Zeit ab. Die Reduktion lässt sich durch eine im Verlauf der extrazellulären Messung abnehmende Anzahl der aktiven Neurone aufgrund des Untergangs neuronalen Gewebes erklären. Auch unter LAC und ZNS zeigte sich eine Reduktion der Amplitude, welche im Intergruppenvergleich keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe besaß und somit keinen signifikanten Medikamenteneffekt darstellte. Die weitere Abnahme der Amplitude im Wash out sprach ebenfalls für den Untergang neuronalen Gewebes. In der Pubmed-Recherche (Stand Oktober 2019) gab es keine Arbeiten über das akute Rattenschnittmodell mit 4-Aminopyridin, welche antikonvulsive Effekte auf die Amplitude im entorhinalen Cortex darstellte.

5.3.5 Absolute und relative Dauer der tonischen Phase

Die Differenzierung in eine tonische und eine klonische elektrophysiologische Phase während der AE im EC war in unseren Experimenten mittels Matlab-Analyse möglich und ließ die Untersuchungen von weiteren Medikamenteneffekten zu. Die Dauer der tonischen Phase der AE stieg ähnlich zur Gesamtdauer im Verlauf der 3-stündigen Messung an, bei nicht signifikant differenter relativer tonischer Dauer. LAC 33 μM zeigte in der absoluten tonischen Dauer keine signifikante Reduktion, jedoch eine signifikante Reduktion der relativen tonischen Dauer. Komplementär hierzu nahm die nicht weiter betrachtete klonische Phase relativ während der Intervention bei gleichbleibender Gesamtdauer der AE zu (Daten nicht dargestellt). Der Effekt lässt sich durch den ausschließlich auf die tonische Phase wirkenden Effekt des Medikaments begründen. Das anschließende Wash out von LAC 33 μM führte zu einem signifikanten Anstieg der absoluten tonischen Phase und ließ sich auf einen reversiblen Medikamenteneffekt während der Intervention zurückführen. Im Intergruppenvergleich stellten sich die Reduktion der relativen und absoluten tonischen Phase von LAC 10 und 33 μM als signifikant dar. Den Effekt von LAC auf die tonische Phase konnte bereits die Arbeitsgruppe um Lees et al. am visuellen Cortex unter Submerged-Bedingungen zeigen (Lees et al., 2006). Ähnliche Effekte konnten mit dem spannungsabhängigen Natriumkanalblocker Carbamazepin im akuten Rattenschnittmodell mit 4-AP bei postnatalen Ratten (Alter: 3-19 Tage) in der Region CA3 des Hippocampus von Wahab et al. gezeigt werden. Eine tonische Blockade in der Region des in dem Fall untersuchten medialen EC wurde nicht beschrieben (Wahab et al., 2011). Eine Ursache für die differente Wirkung von Carbamazepin und LAC kann in der unterschiedlichen Form der

Blockade der Natriumkanäle gesehen werden. Bei Carbamazepin ist die Wirkung von der Öffnungszeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle abhängig, bei der durch die Konformationsänderung die Bindungsstelle für das Molekül frei gegeben wird (Kohling, 2002). LAC hingegen scheint einen größeren Effekt auf die langsame Inaktivierung der Natriumkanäle zu haben, in dem es die Aktivierungseigenschaften zu hyperpolarisierten Potentialen verschiebt (Errington et al., 2008). Dieser Umstand wirkt sich auch in der Praxis aus, in der man vermutet, dass die Refraktärität gegenüber Antiepileptika u.a. durch eine Veränderung der Natriumkanalaktivierung mit Reduktion der Bindungswahrscheinlichkeit an der oben genannten Bindungsstelle erklärt ist (Remy und Beck, 2006).

Nach langjähriger Erfahrung klinisch tätiger Epileptologen wird bei Patienten die Evolution von einem fokal beginnenden epileptischen Anfall zu einem bilateral tonisch-klonischen Anfall durch Antiepileptika unterdrückt. Es lässt sich annehmen, dass eine ausreichend hohe Dosierung von LAC die Initiation eines AE durch Blockade der tonischen Phase verhindert.

ZNS zeigte hingegen keine Effekte auf die tonische Phase der AE, führte jedoch wie LAC bei ausreichender Dosierung zu einer vollständigen Blockade der AE. ZNS hat das breitere Wirkprofil mit einem Natriumkanal-Antagonismus, Antagonismus an T-Typ Calcium-Kanälen, Erhöhung der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität, Erhöhung des Dopamin-Turnovers und Hemmung der Monoaminoxidase-B, ohne jedoch die Aktivierung der Natriumkanäle zu beeinflussen (siehe 2.2.5 Zonisamid (ZNS)). Da diese jedoch maßgeblich die tonische Phase des AE beeinflussen, war bei ZNS kein Effekt zu erwarten. Der Mechanismus der Blockade des Natriumkanals bei ZNS ist jedoch vergleichbar mit Carbamazepin und Phenytoin (Biton, 2007). Dies spricht auch für den fehlenden Effekt auf die tonische Phase in unserem Modell trotz Natriumkanal-Antagonismus, welche bei Carbamazepin im EC ebenfalls nicht beschrieben wurde (Wahab et al., 2011).

5.4 Bewertung der intrinsisch optischen Ergebnisse

5.4.1 Ursprungsregion

Als die häufigste intrinsisch optisch registrierte Ursprungsregion wurde der entorhinale Cortex mit ca. 80 % registriert, gefolgt vom temporalen Cortex mit ca. 20 %. Der

perirhinale Cortex und das Subiculum waren durchschnittlich zu weniger als 1 % Ursprung der AE. Buchheim et al. zeichneten ein deutlich heterogeneres Bild der Ursprungsregionen beim akuten Rattenschnittmodell mit 4-AP mit Ursprung des EC von 41 %, des PRh von 22 %, des TC von 22 % und des Sub von 19 %. Die von uns registrierte Verteilung entspricht eher der ebenfalls von Buchheim et al. untersuchten Verteilung im Niedrig-Magnesium-Modell (Buchheim et al., 2000). Ursächlich für die hauptsächlich entorhinale Verteilung kann einerseits die Limitation der Nutzung von nur einer Elektrode in dem lateralen EC sein, während in der oben genannten Arbeit eine weitere Elektrode im PRh bzw. im TC platziert wurde. Die temporal registrierten AE wurden in unserer Arbeit nur aufgezeichnet, wenn eine Ausbreitung bis zu der Elektrodenspitze im lateralen entorhinalen Cortex stattfand. Es lässt sich anhand der Verteilung vermuten, dass eine weitere Elektrode im temporalen Cortex zu einer höheren Anzahl registrierter AE und zu einem heterogeneren Verteilungsmuster geführt hätten. Eine Ausbreitung ausgehend von hippocampalen Strukturen wurde in keinem der registrierten AE intrinsisch optisch registriert. LAC und ZNS hatten keinen Effekt auf die relative Verteilung der Ursprungsregion.

5.4.2 Anzahl involvierter Regionen

Die Ausbreitung der AE von der Ursprungsregion aus betrifft in den meisten Fällen Anteile von Sub, EC, PRh und TC. Durch die primäre elektrophysiologische Erfassung im EC war dieser immer involviert. Die Bereiche des Hippocampus mit den Regionen CA1, CA3 und Gyrus dentatus sind in keinem der eingeschlossenen Schnitte intrinsisch optisch betroffen. Ursächlich ist hier die Funktion des Gyrus dentatus, der als „gate keeper“ (dt.: Torwächter) bezeichnet, die Informationen aus dem EC nach CA3 regulierend fortleitet und die nach hippocampal ausbreitende Erregung blockiert (Hsu, 2007). Heinemann et al. konnten diese starke inhibitorische Funktion des Gyrus dentatus in kombinierten hippocampal-entorhinalen Rattenschnitten im Niedrig-Magnesium-Modell nachweisen und die Regulation mittels des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Baclofen und des GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicuculline enthemmen. Hieraus ließ sich eine primär GABAerge Inhibition als regulatorischer Mechanismus ableiten (Heinemann et al., 1992). Daneben besteht auch noch ein „direct perforant path“, welcher den Gyrus dentatus als regulatorische Einheit umgeht und die Ausbreitung der Erregung von dem EC auf den Hippocampus proper ermöglicht. Das eine derartige Ausbreitung nicht beobachtet wurde,

könnte auf durchtrennte Faserverbindungen im Rahmen der Anfertigung der Hirnschnitte zurückzuführen sein.

5.4.3 Ausbreitungsgrad

LAC führte zu einer intrinsisch optisch messbaren Reduktion der von dem AE erfassten Fläche des Subiculum. Dies zeigte sich bereits bei der niedrigsten Konzentration von 10 μM mit einem im Wash out im Vergleich zur Intervention signifikanten Anstieg der betroffenen Fläche. Auch in der mittleren LAC-Dosierung von 33 μM ließ sich gleicher Effekt darstellen. Zusätzlich zeigte sich bei LAC 33 μM im perirhinalen und temporalen Cortex ein zusätzlicher Anstieg nach dem Wash out, so dass sich ein ebenfalls hemmender Effekt auf den Ausbreitungsgrad vermuten lässt. In der Literatur konnte bisher kein derartiger Effekt eines AED im Rahmen der intrinsisch optischen Messung dargestellt werden. Dies spiegelt den Stellenwert für das intrinsisch optische Signal im Rahmen weiterführender Untersuchungen dieses akuten Rattenschnittmodells als Screening-Instrument für antikonvulsive Substanzen dar.

ZNS zeigte in mittlerer Konzentration ebenfalls eine Reduktion im Ausbreitungsgrad der AE im Subiculum. Das Subiculum scheint in den von uns untersuchten Regionen die sensibelste Veränderung durch Einflüsse von ZNS und LAC aufzuweisen. Dieser Aspekt ist beeindruckend und unterstreicht die zentrale Rolle des Sub in der AE-Induktion im 4-AP Modell (Benini und Avoli, 2005, Herrington et al., 2015).

5.4.4 Maximale Transmissionsänderung

Die maximale Transmissionsänderung wurde im Intergruppenvergleich signifikant durch LAC im Sub reduziert. Neben der relativen betroffenen Fläche fiel somit eine weniger starke maximale Transmissionsänderung in den betroffenen ROI des Sub auf. Es lassen sich weitere qualitative Effekte von antikonvulsiven Substanzen durch die Hinzunahme der Analyse des intrinsisch optischen Signals nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist die lokale Netzwerkstruktur mit einem hohen Anteil rekurrent verschalteter Zelltypen und einem hohen Anteil an burst-Neuronen. Mit der Anwendung von LAC und ZNS wurde bereits der Ausbreitungsgrad im Sub signifikant reduziert. Die maximale Transmissionsänderung wurde innerhalb eines ROI berechnet, so dass allein die Reduktion der einbezogenen Fläche zu einer Reduktion der maximalen

Transmissionsänderung geführt haben könnte. Hier stellt sich sicherlich unter Verwendung von ROI mit 400 Pixel und die gegenseitige Beeinflussung von Ausbreitungsgrad und maximaler Transmissionsänderung auch eine technische Limitation dar.

5.5 Limitationen (Bewertung der Materialien und Methodik)

5.5.1 Versuchsprotokoll, Teststärke

Eine Limitation der Studie ist die geringe Hirnschnittzahl innerhalb der untersuchten Gruppen; dies ist einerseits durch den tierexperimentellen Ansatz, andererseits durch das Messprotokoll bedingt. Pro präpariertem Tier lassen sich bis zu ca. zehn hippocampal-entorhinalen Hirnschnitte gewinnen. Dies ist auch ein Vorteil der *in vitro* Modelle, bei denen mehrere Experimente an einem Tier gleichzeitig durchgeführt werden können, um so die Anzahl an Tieren gering zu halten und schließlich die Belastung für die Tiere zu reduzieren. Bei der alleinigen elektrophysiologischen Messung wäre, in Abhängigkeit von der Anzahl vorhandener Mikromanipulatoren, die Untersuchung mehrerer Schnitte zeitgleich möglich. Durch die Kopplung der elektrophysiologischen und intrinsisch optischen Messung konnte in unserem Versuchsaufbau nur ein Schnitt zu einem Zeitpunkt untersucht werden. Dies ist dem Umstand des manuellen Startens der optischen Aufnahme geschuldet. Erstens musste eine ausreichende Auflösung gewährleistet sein, so dass bei der von uns eingesetzten Kamera nur ein Schnitt aufgezeichnet werden konnte. Zweitens beanspruchte der manuelle Start die permanente Anwesenheit eines wissenschaftlichen Mitarbeiters. Eine kontinuierliche Aufnahme bei einem Messprotokoll über drei Stunden war mit dem laboreigenen Programm nicht möglich. Durch die abnehmende Viabilität über die Zeit erfolgte meist nur die sukzessive Messung von ein bis zwei Schnitten. Retrospektiv waren Veränderungen durch die Intervention und die Wash out-Phase wenige Minuten nach Beginn dieser zu beobachten. So wäre eine mindestens einstündige Messung der Baseline zwar notwendig, die folgenden Phasen der Intervention und des Wash out könnte man jedoch auf die Hälfte der gemessenen Zeit, 30 Minuten, reduzieren. Es könnte die Untersuchung weiterer Hirnschnitte des selben präparierten Tieres erfolgen und eine höhere n-Zahl mit ähnlichem zeitlichen Aufwand gewonnen werden. In

Screening-Programmen für Antikonvulsiva wäre eine Messung von bis zu zehn Hirnschnitten möglich.

5.5.2 4-Aminopyridin-Modell im Vergleich mit dem Niedrig-Magnesium-Modell

Das genutzte Rattenschnittmodell *in vitro* ist zur Untersuchung von antikonvulsiven Substanzen etabliert. Die Induktion von epileptiformer Aktivität durch 4-AP, einem Kaliumkanalblocker, beschreibt ein chemo-convulsives Modell, welches sich durch die Blockade von Kaliumkanälen und als Calciumkanal-Aktivator auszeichnet (Judge und Bever, 2006, Wu et al., 2009). Die AE werden somit durch eine pharmakologische Modifizierung mit einem einzigen Mechanismus erzeugt. Eine Alternative stellen das Hoch-Kalium-Modell und das Niedrig-Magnesium-Modell dar. Letzteres ist ebenfalls in unserem Labor etabliert. Im Rahmen unserer Experimente untersuchten wir die Wirksamkeit von LAC und ZNS ebenfalls für das Niedrig-Magnesium-Modell. Bei unserem 3-stündigen Messprotokoll zeigte sich jedoch bereits nach durchschnittlich 90 Minuten Spätaktivität, d.h. ein kontinuierliches Auftreten von Depolarisationen ähnlich eines Status epilepticus, welche unbeeinflusst von Medikamenteneffekten waren (Zhang et al., 1995). Die durch 4-AP induzierten AE sind hingegen über viele Stunden stabil und zeigten in keinem unserer Experimente innerhalb von drei Stunden eine Form von Spätaktivität. Auch in der Literatur findet sich nur wenig über durch 4-AP induzierte, beschriebene Spätaktivität (Perreault und Avoli, 1991, Lopantsev und Avoli, 1998).

Weiterhin untersuchten wir am 4-AP Modell *in vitro* natives neuronales Gewebe. Die bei einer Epilepsie vorliegenden neuronalen Pathologien finden in diesem Modell keine Berücksichtigung. Entsprechend ist die Darstellung der Medikamentenresistenz durch pathophysiologische Veränderungen des neuronalen Gewebes nicht repräsentiert und eine Translation der Ergebnisse in diesem Modell auf den Patienten mit resistenter Epilepsie nur eingeschränkt bis gar nicht möglich. *In vivo* Tiermodelle bieten hingegen den Vorteil, dass z.B. knock-out Ratten mit einer zerebralen Pathologie als Ursache der Epilepsie untersucht werden können. Eine Kombination aus *in vivo* und *in vitro* Ansätzen würde das Problem lösen. Weiterhin ist hier auch ein chronisches Epilepsiemodell mit einem länger wählbaren Untersuchungszeitraum möglich, der bei unserem *in vitro* Modell durch den Neuronen-Untergang auf deutlich unter 24 Stunden beschränkt war. Wir verzichteten jedoch aus tierethischen Aspekten bei der grundlegenden Frage des Stellenwertes eines *in vitro* akuten Rattenschnittmodells auf die Nutzung eines *in vivo*

Modells. Die stabile AE-Aktivität über mehrere Stunden, der ausbleibende Übergang in Spätaktivität und eine niedrige Rate an SD ließen uns das 4-AP-Modell unter den akuten Rattenschnittmodellen präferieren.

5.5.3 Kombinierte hippocampal-entorhinale Hirnschnitte

Die Wirkung der Antikonvulsiva erfolgte an epileptiformer Aktivität an kombinierten hippocampal-entorhinalen Hirnschnitten der Wistar Han Ratte. Durch den lamellaren Netzwerkaufbau wird eine Untersuchung des neuronalen Netzwerks im Hirnschnittpräparat erst möglich und wurde Anfang der 1970er Jahre an der Universität von Oslo mit entwickelt (Andersen et al., 1971).

Trotzdem wurde durch die Präparation und durch den anschließenden Schneideprozess der Präparate ein wesentlicher Teil der bestehenden Faserverbindungen unterbrochen. Buckmaster und Schwartzkroin untersuchten den Einfluss der Interneurone des vollständigen Hippocampus und stellten diese mit Hilfe der Zellmarkierungen mittels Biocytin dar (Buckmaster und Schwartzkroin, 1995). Die Arbeit zeigte auf, dass zwei Arten von inhibitorischen Zellen des Gyrus dentatus Faserverläufe von mehr als der Hälfte des septotemporalen Cortex aufwies. Diese verliefen teils senkrecht zu der lamellären Anordnung des Hippocampus und wurden im *in vitro* Schnittpräparat durchtrennt. So ist *in vivo* ein deutlich höherer inhibitorischen Einfluss anzunehmen. Seit Ende der 1990er Jahre besteht die Möglichkeit der Untersuchung des gesamten isolierten Hippocampus bzw. sogar beider Hippocampi mit deren interseptalen Verbindung unter Submerged-Bedingungen (Khalilov et al., 1997). Mittels Mikroinjektion von Rhodamin-Amin-Dextran Kristallen und anschließender Fluoreszenz-Mikroskopie in einer Arbeit an kombinierten entorhinal-hippocampalen Hirnschnitten der Ratte konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Faserverbindungen bei horizontal angefertigten Schnitten erhalten bleibt. Nur ein Teil des lateralen „perforant pathways“ konnte nicht vollständig dargestellt werden (Boulton et al., 1992). Eine andere Arbeit konnte ebenfalls mit der Fluoreszenz-Mikroskopie in den Hirnschnitten eine starke Projektion von Neuronen aus den tiefen Schichten (Schichten IV und V) auf den Gyrus dentatus nachweisen (Dugladze et al., 2001). Die fehlende Ausbreitung der AE vom EC und Sub in die hippocampalen Strukturen kann ebenfalls durchtrennten Verbindungen geschuldet sein. Dies unterstützt die Annahme eines ausreichend erhaltenen neuronalen Netzwerks innerhalb der parahippocampalen Strukturen, mit der Einschränkung, die *in vivo*

Bedingungen nicht vollständig abbilden zu können. Schließlich stützen auch die seit fast zwei Jahrzehnten in unserem Labor durchgeführten erfolgreichen Arbeiten am akuten Rattenschnittmodell diese Annahme (Meierkord et al., 1997, Buchheim et al., 2000, Weissinger et al., 2005, Holtkamp et al., 2011, Weissinger et al., 2017).

5.5.4 Interface-Bedingungen

Die untersuchten Hirnschnitte befanden sich ab dem Zeitpunkt der Inkubation bis zum Abschluss der Messung auf einer Biomembran liegend zwischen einer flüssigen und gasförmigen Phase entsprechend als Interface-Bedingung (siehe 2.3.1 Kombinierte Hirnschnitte *in vitro*) bezeichnet. Während die flüssige Phase die notwendigen Nährstoffe bietet und quasi ein physiologisches Milieu darstellt, wird die gasförmige Phase durch ein Gasgemisch (Carbogen: 95 % O₂/ 5 % CO₂) gebildet, welches eine hohe Sauerstoffverfügbarkeit für den Hirnschnitt gewährleistet. Dies erlaubt im Vergleich zu Submerged-Bedingungen eine größere Ausbeute von Netzwerkoszillationen (Hajos et al., 2009). Jedoch bietet diese Messmethode auch Nachteile: 1) eine langsame ACSF-Flussgeschwindigkeit und damit auch einen niedrigen ACSF-Umsatz, welche beim Einwaschen von Substanzen eine längere Latenz zur Folge hat, 2) die Gefahr des Austrocknens der nach oben gerichteten Fläche und 3) eine unebene Oberfläche, welche durch Refraktion und Reflektion zu einer eingeschränkten optischen Aufnahmequalität führen kann.

Eine alternative Methode der Lagerung und Untersuchung ist die des vollständig in eine Lösung eingetauchten Schnittes, als Submerged-Bedingung bezeichnet. Der Schnitt liegt hier auf dem Boden einer mit Lösung perfundierten Kammer oder wird auf Filterpapier oder einem Nylonnetz gelagert. Eine hohe Perfusionsrate erlaubt einen raschen Ausgleich von Konzentrationen der Lösung mit dem Hirnschnitt, welche einen Vorteil bei der Untersuchung von Substanzen, wie z.B. von Medikamenten, besitzt. Durch die vollständige flüssige Umgebung behält der Schnitt länger seine natürliche Morphologie und steht bei der resultierenden höheren Viabilität länger für Experimente zur Verfügung (Croning und Haddad, 1998). Durch in das Wasser eingelassene Objektive wird eine Brechung des Lichts, wie am Übergang von flüssiger zu gasförmiger Phase in der Interface-Kammer, verhindert und die Aufzeichnung einzelner Neurone ist somit möglich. Schuchmann et al. konnte beim Vergleich der zwei verschiedenen Kammersysteme zeigen, dass der Extrazellarraum unter Interface-Bedingungen signifikant kleiner als

unter Submerged-Bedingungen ist. Angenommen wurde eine hauptsächlich nicht-synaptische Fortleitung und Aufrechterhaltung der AE. Dies führte unter Niedrig-Magnesium zu länger anhaltenden AE und größeren Amplituden bei Verwendung der Interface-Kammer (Schuchmann et al., 2002). Dieser Umstand und die zuvor zahlreich durchgeführten intrinsisch optischen Messungen unter Interface-Bedingungen in unserem Labor ließen uns dieses System präferieren.

5.5.5 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologische Messung erfolgte in unserer Arbeit mit einer einzigen Glaselektrode positioniert im Bereich der tiefen Schichten IV und V im Bereich des lateralen entorhinalen Cortex. Es wurden ausschließlich AE identifiziert, welche im Bereich der Glaselektroden spitze begannen oder sich mindestens bis zu dieser ausbreiteten. AE die ausschließlich den Hippocampus, das Subiculum oder den temporalen Cortex betrafen, wurden nicht registriert. Dieser Hintergrund muss bei der Betrachtung der betroffenen Regionen sowie Ursprungsregionen zu Gunsten des sehr hohen Anteils des entorhinalen Cortex Berücksichtigung finden.

In vielen publizierten Arbeiten mit akuten Rattenschnitten mit ausschließlich elektrophysiologischer Datenerfassung finden sich mehrere Elektroden in unterschiedlichen anatomischen Bereichen zur Aufzeichnung der AE. So kann mit nur einer Art der Messung auch eine räumliche Auflösung erzielt werden. Dieser Ansatz wurde im Verlauf der letzten Dekaden perfektioniert. Während 1989 die Ausbreitungsgeschwindigkeit von epileptiformer Aktivität in der Region CA1 des Hippocampus mittels einem „multi-electrode array“ von acht Elektroden untersucht wurde (Holsheimer und Lopes da Silva, 1989), dienen heute teils über 10.000 Elektroden (über 3.150 pro mm²) zur extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchung von Purkinjezellen in akuten Kleinhirnschnitten über mehrere Stunden (Frey et al., 2009).

Wir entschieden uns gegen den Einsatz von mehreren Elektroden bis hin zu multielectrode arrays, welche meist durch eine vorgegebene Form nicht exakt den morphologischen Gegebenheiten der parahippocampalen Strukturen entsprechen. Wir reduzierten die weiterführende Untersuchung auf nur eine Elektrode, um eine optisch größtmögliche freie Fläche zur Untersuchung des intrinsisch optischen Signals zu gewährleisten. Jede weitere eingesetzte Elektrode würde einen Teil des Schnittes verdecken und diesen für die weitere optische Messung nur schwer auswertbar machen.

Zudem kann jede weitere eingesetzte Elektrode zu einem gewissen Maß den Hirnschnitt schädigen bzw. zu Irritationen führen, welche wiederum zu einer geringeren Viabilität führen oder das Auftreten von spreading depressions begünstigen kann.

5.5.6 Optische Messungen

Um eine gute optische Auflösung zu gewährleisten, entschieden wir uns für den Einsatz der intrinsisch optischen Bildgebung. Diese Form der nicht invasiven Bildgebung erlaubt eine hohe örtliche sowie zeitliche Auflösung über die Gesamtheit des untersuchten Schnitts ohne weitere Manipulation. Durch den Einsatz einer Kaltlichtquelle zur Durchleuchtung, erfährt der Schnitt von extern kaum Beeinflussung. Eine Limitation ist die softwarebedingte zeitliche Auflösung von 10 Bildern pro Sekunde. Durch die kontinuierliche Speicherung von 100 Bildern, konnten in unserem Experiment auch Ursprungsregionen im TC nach elektrophysiologischer Registrierung im EC erfasst werden. Durch die Weiterentwicklung der Videotechnik ist mit einer neuen Kamera eine deutlich höhere Auflösung von über 50 Bildern pro Sekunde möglich. Vor allem eine höhere zeitliche Auflösung des Signals würde eine exaktere Bestimmung des Ursprungs erlauben. Einschränkend muss man jedoch die großen anfallenden Datenmengen erwähnen, welche trotz zunehmender Speicherkapazitäten aktuell eine Limitation darstellen könnte.

Die extrinsisch optische Bildgebung ist eine alternative experimentelle Bildgebung. Die genutzten spannungsabhängigen Farbstoffe zur optischen Darstellung finden zur Untersuchung der Ausbreitung epileptiformer Aktivität Anwendung ((Pfeiffer et al., 2014, Wright und Jackson, 2015)). Der Farbstoff kann jedoch mit den Ionenpumpen interagieren und die synaptische Transmission und so das Membranpotential der neuronalen Zellen beeinflussen. Aufgrund des invasiveren Verfahrens mit einem zusätzlichen Mediator in der Untersuchung von Medikamenten und dem 4-AP, welche ebenfalls auf die Ionenkanäle Auswirkungen haben, wurde den extrinsischen Bildgebungen das intrinsisch optische Signal vorgezogen.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die aktuelle Arbeit weist die Wirksamkeit der neuen Antikonvulsiva LAC und ZNS auf die im akuten Rattenschnittmodell *in vitro* induzierte epileptiforme Aktivität nach. Dies ließ sich sowohl durch eine elektrophysiologische als auch eine intrinsisch optische Messmethode darstellen. Hervorzuheben ist die durch LAC induzierte Reduktion der tonischen Phase, welche eine Differenzierung der Wirkungsmechanismen von LAC und ZNS in diesem Modell erlaubt.

Das 4-AP Modell *in vitro* scheint zur Entdeckung von antikonvulsiven Eigenschaften von Molekülen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen sensibel zu sein. Auch für AED der 3. Generation konnten Dóczi et al. demonstrieren, dass ein AMPA-Antagonist konzentrationsabhängig die Frequenz von interiktalen Entladungen im Neocortex von adulten Ratten mit 4-AP *in vitro* beeinflusst (Doczi et al., 1999). Eine Studie mit dem in der Klinik Verwendung findenden AED Perampanel, einem AMPA-Rezeptor-Antagonisten, wäre wünschenswert. Der KCNQ-Kaliumkanal-Öffner konnte ebenfalls die Blockade der durch 4-AP induzierten AE in hippocampalen Zellkulturen darstellen (Kobayashi et al., 2008). Auch die Verstärkung der GABAergen Hemmung durch Benzodiazepin-Derivate zeigte inhibitorische Effekte auf AE (Marinelli et al., 2000, Ridler et al., 2018). Dies lässt auf einen relevanten Einfluss der GABAergen Interneurone auf die AE im 4-AP-Modell schließen (Grosser et al., 2014).

Eine prokonvulsive Substanz als Negativkontrolle fehlt in dieser Arbeit und wäre für die weitere Prüfung des 4-AP-Modells als Screeningmodell notwendig. Brückner et al. konnten bereits zeigen, dass Bicucullin, ein GABA-A-Rezeptor Antagonist, AE resistent gegenüber den AED der 2. Generation wie Carbamazepin und Valproat werden lässt (Bruckner et al., 1999). Der Nachweis des Effekts für die AED der 3. Generation ist noch ausstehend.

Eine maßgebliche Limitation dieser Arbeit ist die Durchführung der Experimente in Hirnschnitten von naiven Ratten anstatt in denen von Nagern mit chronischer Epilepsie. Es besteht eine eingeschränkte Möglichkeit der Translation der Ergebnisse dieses Modells auf Patienten mit Epilepsie. Deshalb sind Kombinationen von akuten und chronischen Epilepsiemodellen notwendig. Auch *ex vivo* Experimente an humanen Hirnschnitten, gewonnen im Rahmen der Epilepsiechirurgie, sind ergänzend wünschenswert. Messungen an humanen hippocampalen Hirnschnitten nach

Hippocampus-Resektionen werden aktuell in unserem Labor etabliert. Die Untersuchung der Wirkung der meist bereits bei den jeweiligen Patienten eingesetzten und nicht ausreichend wirksamen Substanzen an dem vorgeschädigten hippocampalen Gewebe ermöglicht eine Fortführung der Erforschung der Genese der Therapieresistenz.

Das akute Rattenschnitt-Modell *in vitro* mit 4-AP hat sich für die weiterführende Erforschung neuer Antikonvulsiva qualifiziert und ist ein möglicher Kandidat, der in Zukunft ggfs. einen Einsatz in einer Screeningbatterie finden könnte. Unabhängig hiervon sind auch in Zukunft *in vivo* Ansätze zur Erforschung von chronischen Epilepsiemodellen und Substanzen gegen Pharmakoresistenz unabkömmlich.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Andersen, P., Bliss, T. V. and Skrede, K. K. 1971. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res*, 13, 222-38.
2. Andurkar, S. V., Stables, J. P. and Kohn, H. 1999. The anticonvulsant activities of n-benzyl 3-methoxypropionamides. *Bioorg Med Chem*, 7, 2381-9.
3. Avoli, M., Barbarosie, M., Lucke, A., Nagao, T., Lopantsev, V. and Kohling, R. 1996. Synchronous gaba-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *J Neurosci*, 16, 3912-24.
4. Avoli, M., D'antuono, M., Louvel, J., Kohling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'arcangelo, G. and Tancredi, V. 2002. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol*, 68, 167-207.
5. Avoli, M., Drapeau, C., Louvel, J., Pumain, R., Olivier, A. and Villemure, J. G. 1991. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol*, 30, 589-96.
6. Avoli, M. and Jefferys, J. G. 2016. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J Neurosci Methods*, 260, 26-32.
7. Baulac, M. 2006. Introduction to zonisamide. *Epilepsy Res*, 68 Suppl 2, S3-9.
8. Behr, C., Levesque, M., Ragsdale, D. and Avoli, M. 2015. Lacosamide modulates interictal spiking and high-frequency oscillations in a model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 115, 8-16.
9. Benini, R. and Avoli, M. 2005. Rat subicular networks gate hippocampal output activity in an in vitro model of limbic seizures. *J Physiol*, 566, 885-900.
10. Benini, R., D'antuono, M., Pralong, E. and Avoli, M. 2003. Involvement of amygdala networks in epileptiform synchronization in vitro. *Neuroscience*, 120, 75-84.
11. Beydoun, A., D'souza, J., Hebert, D. and Doty, P. 2009. Lacosamide: Pharmacology, mechanisms of action and pooled efficacy and safety data in partial-onset seizures. *Expert Rev Neurother*, 9, 33-42.

12. Beyenburg, S., Stavem, K. and Schmidt, D. 2010. Placebo-corrected efficacy of modern antiepileptic drugs for refractory epilepsy: Systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, 51, 7-26.
13. Biton, V. 2007. Clinical pharmacology and mechanism of action of zonisamide. *Clin Neuropharmacol*, 30, 230-40.
14. Borbely, S., Korossy, C., Somogyvari, Z. and Vilagi, I. 2014. In vitro intrinsic optical imaging can be used for source determination in cortical slices. *Eur J Neurosci*, 39, 72-82.
15. Boulton, C. L., Von Haebler, D. and Heinemann, U. 1992. Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus*, 2, 99-106.
16. Brodie, M. J. 2010. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19, 650-5.
17. Brodie, M. J., Perucca, E., Ryvlin, P., Ben-Menachem, E., Meencke, H. J. and Levetiracetam Monotherapy Study, G. 2007. Comparison of levetiracetam and controlled-release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 68, 402-8.
18. Bruckner, C. and Heinemann, U. 2000. Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res*, 859, 15-20.
19. Bruckner, C., Stenkamp, K., Meierkord, H. and Heinemann, U. 1999. Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neurosci Lett*, 268, 163-5.
20. Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Weissinger, F., Heinemann, U. and Meierkord, H. 2000. Comparison of intrinsic optical signals associated with low Ca^{2+} - and 4-aminopyridine-induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system. *Epilepsia*, 41, 635-41.
21. Buckle, P. J. and Haas, H. L. 1982. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J Physiol*, 326, 109-22.
22. Buckmaster, P. S. and Schwartzkroin, P. A. 1995. Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci*, 15, 774-89.

23. Castel-Branco, M. M., Alves, G. L., Figueiredo, I. V., Falcao, A. C. and Caramona, M. M. 2009. The maximal electroshock seizure (mes) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 31, 101-6.
24. Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D. and Kwan, P. 2018. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: A 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurol*, 75, 279-286.
25. Choi, D., Stables, J. P. and Kohn, H. 1996. Synthesis and anticonvulsant activities of n-benzyl-2-acetamidopropionamide derivatives. *J Med Chem*, 39, 1907-16.
26. Chung, S., Sperling, M. R., Biton, V., Krauss, G., Hebert, D., Rudd, G. D., Doty, P. and Group, S. P. S. 2010. Lacosamide as adjunctive therapy for partial-onset seizures: A randomized controlled trial. *Epilepsia*, 51, 958-67.
27. Croning, M. D. and Haddad, G. G. 1998. Comparison of brain slice chamber designs for investigations of oxygen deprivation in vitro. *J Neurosci Methods*, 81, 103-11.
28. Cruz, M. E., Schoenberg, B. S., Ruales, J., Barberis, P., Proano, J., Bossano, F., Sevilla, F. and Bolis, C. L. 1985. Pilot study to detect neurologic disease in ecuador among a population with a high prevalence of endemic goiter. *Neuroepidemiology*, 4, 108-16.
29. D'antuono, M., Kohling, R., Ricalzone, S., Gotman, J., Biagini, G. and Avoli, M. 2010. Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia*, 51, 423-31.
30. Das, A., Mcdowell, M., O'dell, C. M., Busch, M. E., Smith, J. A., Ray, S. K. and Banik, N. L. 2010. Post-treatment with voltage-gated na(+) channel blocker attenuates kainic acid-induced apoptosis in rat primary hippocampal neurons. *Neurochem Res*, 35, 2175-83.
31. Doczi, J., Banczerowski-Pelyhe, I., Barna, B. and Vilagi, I. 1999. Effect of a glutamate receptor antagonist (gyki 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices. *Brain Res Bull*, 49, 435-40.
32. Dugladze, T., Heinemann, U. and Gloveli, T. 2001. Entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro. *Brain Res*, 905, 224-31.
33. Dupont, S., Biraben, A., Lavernhe, G., Marquet, T. and Allaf, B. 2013. Management and monitoring of patients treated with zonisamide: The ozone study. *Epileptic Disord*, 15, 278-88.

34. Engel, J., Jr., Wiebe, S., French, J., Sperling, M., Williamson, P., Spencer, D., Gumnit, R., Zahn, C., Westbrook, E. and Enos, B. 2003. Practice parameter: Temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy. *Epilepsia*, 44, 741-51.
35. Errington, A. C., Stohr, T., Heers, C. and Lees, G. 2008. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol*, 73, 157-69.
36. European Medicines Agency, 2008. Annex I, summary of product characteristics zonegran. *revised 10.05.2019*, Accessed Oct 11, 2019: at https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zonegran-epar-product-information_en.pdf.
37. Faught, E., Ayala, R., Montouris, G. G., Leppik, I. E. and Zonisamide 922 Trial, G. 2001. Randomized controlled trial of zonisamide for the treatment of refractory partial-onset seizures. *Neurology*, 57, 1774-9.
38. Federico, P., Borg, S. G., Salkauskus, A. G. and Macvicar, B. A. 1994. Mapping patterns of neuronal activity and seizure propagation by imaging intrinsic optical signals in the isolated whole brain of the guinea-pig. *Neuroscience*, 58, 461-80.
39. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M. and Wiebe, S. 2014. Ilae official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55, 475-82.
40. Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshe, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E. and Zuberi, S. M. 2017. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: Position paper of the ilae commission for classification and terminology. *Epilepsia*, 58, 522-530.
41. Forsgren, L., Beghi, E., Oun, A. and Sillanpaa, M. 2005. The epidemiology of epilepsy in europe - a systematic review. *Eur J Neurol*, 12, 245-53.
42. Frey, U., Egert, U., Heer, F., Hafizovic, S. and Hierlemann, A. 2009. Microelectronic system for high-resolution mapping of extracellular electric fields applied to brain slices. *Biosens Bioelectron*, 24, 2191-8.

43. Fueta, Y. and Avoli, M. 1992. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy Res*, 12, 207-15.
44. Gajda, Z., Gyengesi, E., Hermes, E., Ali, K. S. and Szente, M. 2003. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats in vivo. *Epilepsia*, 44, 1596-600.
45. Galvan, M., Grafe, P. and Ten Bruggencate, G. 1982. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Res*, 241, 75-86.
46. Giraldez, B. G., Toledano, R., Garcia-Morales, I., Gil-Nagel, A., Lopez-Gonzalez, F. J., Tortosa, D., Ojeda, J. and Serratosa, J. M. 2015. Long-term efficacy and safety of lacosamide monotherapy in the treatment of partial-onset seizures: A multicenter evaluation. *Seizure*, 29, 119-22.
47. Glauser, T. A., Cnaan, A., Shinnar, S., Hirtz, D. G., Dlugos, D., Masur, D., Clark, P. O., Capparelli, E. V., Adamson, P. C. and Childhood Absence Epilepsy Study, G. 2010. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *N Engl J Med*, 362, 790-9.
48. Gower, A. J., Noyer, M., Verloes, R., Gobert, J. and Wulfert, E. 1992. Ucb 1059, a novel anti-convulsant drug: Pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol*, 222, 193-203.
49. Green, J. D. 1964. The hippocampus. *Physiol Rev*, 44, 561-608.
50. Grinvald, A., Frostig, R. D., Lieke, E. and Hildesheim, R. 1988. Optical imaging of neuronal activity. *Physiol Rev*, 68, 1285-366.
51. Grosser, S., Queenan, B. N., Lalchandani, R. R. and Vicini, S. 2014. Hilar somatostatin interneurons contribute to synchronized gaba activity in an in vitro epilepsy model. *PLoS One*, 9, e86250.
52. Guerrini, R., Rosati, A., Bradshaw, K. and Giorgi, L. 2014. Adjunctive zonisamide therapy in the long-term treatment of children with partial epilepsy: Results of an open-label extension study of a phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Epilepsia*, 55, 568-78.
53. Hajos, N., Ellender, T. J., Zemankovics, R., Mann, E. O., Exley, R., Cragg, S. J., Freund, T. F. and Paulsen, O. 2009. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: Importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci*, 29, 319-27.

54. Halasz, P., Kalviainen, R., Mazurkiewicz-Beldzinska, M., Rosenow, F., Doty, P., Hebert, D., Sullivan, T. and Group, S. P. S. 2009. Adjunctive lacosamide for partial-onset seizures: Efficacy and safety results from a randomized controlled trial. *Epilepsia*, 50, 443-53.
55. Hansen, A. J. and Zeuthen, T. 1981. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand*, 113, 437-45.
56. Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J. P., Ficker, E., Stabel, J. and Zhang, C. L. 1992. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 273-80.
57. Herrington, R., Levesque, M. and Avoli, M. 2015. Subiculum-entorhinal cortex interactions during in vitro ictogenesis. *Seizure*, 31, 33-40.
58. Heuzeroth, H., Wawra, M., Fidzinski, P., Dag, R. and Holtkamp, M. 2019. The 4-aminopyridine model of acute seizures in vitro elucidates efficacy of new antiepileptic drugs. *Front Neurosci*, 13, 677.
59. Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R. and Zalutsky, R. 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68, 326-37.
60. Holsheimer, J. and Lopes Da Silva, F. H. 1989. Propagation velocity of epileptiform activity in the hippocampus. *Exp Brain Res*, 77, 69-78.
61. Holtkamp, M., Buchheim, K., Elsner, M., Matzen, J., Weissinger, F. and Meierkord, H. 2011. Status epilepticus induces increasing neuronal excitability and hypersynchrony as revealed by optical imaging. *Neurobiol Dis*, 43, 220-7.
62. Holtkamp, M. and Meierkord, H. 2007. Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2023-41.
63. Hsu, D. 2007. The dentate gyrus as a filter or gate: A look back and a look ahead. *Prog Brain Res*, 163, 601-13.
64. Jacobs, J., Zijlmans, M., Zelmann, R., Chatillon, C. E., Hall, J., Olivier, A., Dubeau, F. and Gotman, J. 2010. High-frequency electroencephalographic oscillations correlate with outcome of epilepsy surgery. *Ann Neurol*, 67, 209-20.

65. Jones, R. S. and Heinemann, U. 1988. Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J Neurophysiol*, 59, 1476-96.
66. Judge, S. I. and Bever, C. T., Jr. 2006. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther*, 111, 224-59.
67. Kerrigan, J. F., Litt, B., Fisher, R. S., Cranstoun, S., French, J. A., Blum, D. E., Dichter, M., Shetter, A., Baltuch, G., Jaggi, J., Krone, S., Brodie, M., Rise, M. and Graves, N. 2004. Electrical stimulation of the anterior nucleus of the thalamus for the treatment of intractable epilepsy. *Epilepsia*, 45, 346-54.
68. Khalilov, I., Esclapez, M., Medina, I., Aggoun, D., Lamsa, K., Leinekugel, X., Khazipov, R. and Ben-Ari, Y. 1997. A novel in vitro preparation: The intact hippocampal formation. *Neuron*, 19, 743-9.
69. Kito, M., Maehara, M. and Watanabe, K. 1996. Mechanisms of t-type calcium channel blockade by zonisamide. *Seizure*, 5, 115-9.
70. Klitgaard, H., Matagne, A., Gobert, J. and Wulfert, E. 1998. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 353, 191-206.
71. Kobayashi, K., Nishizawa, Y., Sawada, K., Ogura, H. and Miyabe, M. 2008. K(+)-channel openers suppress epileptiform activities induced by 4-aminopyridine in cultured rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Sci*, 108, 517-28.
72. Kohling, R. 2002. Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia*, 43, 1278-95.
73. Kossoff, E. H., Al-Macki, N., Cervenka, M. C., Kim, H. D., Liao, J., Megaw, K., Nathan, J. K., Raimann, X., Rivera, R., Wiemer-Kruel, A., Williams, E. and Zupec-Kania, B. A. 2015. What are the minimum requirements for ketogenic diet services in resource-limited regions? Recommendations from the international league against epilepsy task force for dietary therapy. *Epilepsia*, 56, 1337-42.
74. Kumagai, N., Seki, T., Yamada, T., Takuma, Y. and Hirai, K. 1993. Concentrations of zonisamide in serum, free fraction, mixed saliva and cerebrospinal fluid in epileptic children treated with monotherapy. *Jpn J Psychiatry Neurol*, 47, 291-2.

75. Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshe, S. L., Perucca, E., Wiebe, S. and French, J. 2010. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc task force of the ilae commission on therapeutic strategies. *Epilepsia*, 51, 1069-77.
76. Leao, A. A. 1947. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 10, 409-14.
77. Lees, G., Stohr, T. and Errington, A. C. 2006. Stereoselective effects of the novel anticonvulsant lacosamide against 4-ap induced epileptiform activity in rat visual cortex in vitro. *Neuropharmacology*, 50, 98-110.
78. Letiran, A., Stables, J. P. and Kohn, H. 2001. Functionalized amino acid anticonvulsants: Synthesis and pharmacological evaluation of conformationally restricted analogues. *Bioorg Med Chem*, 9, 2693-708.
79. Lopantsev, V. and Avoli, M. 1998. Participation of gabaa-mediated inhibition in ictallike discharges in the rat entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, 79, 352-60.
80. Loscher, W. 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20, 359-68.
81. Loscher, W. and Honack, D. 1993. Profile of ucb l059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur J Pharmacol*, 232, 147-58.
82. Loscher, W. and Schmidt, D. 2011. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52, 657-78.
83. Macvicar, B. A. and Hochman, D. 1991. Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci*, 11, 1458-69.
84. Mandhane, S. N., Aavula, K. and Rajamannar, T. 2007. Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.C.Ptz and mes models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, 16, 636-44.
85. Marinelli, S., Gatta, F. and Sagratella, S. 2000. Effects of gyki 52466 and some 2,3-benzodiazepine derivatives on hippocampal in vitro basal neuronal excitability and 4-aminopyridine epileptic activity. *Eur J Pharmacol*, 391, 75-80.

86. Marson, A. G., Appleton, R., Baker, G. A., Chadwick, D. W., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Jacoby, A., Shackley, P., Smith, D. F., Tudur-Smith, C., Vanoli, A. and Williamson, P. R. 2007. A randomised controlled trial examining the longer-term outcomes of standard versus new antiepileptic drugs. The sanad trial. *Health Technol Assess*, 11, iii-iv, ix-x, 1-134.
87. Mathie, A., Wooltorton, J. R. and Watkins, C. S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*, 30, 13-24.
88. Matsumoto, H. and Marsan, C. A. 1964. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. *Exp Neurol*, 9, 286-304.
89. May, T. W., Brandt, C., Helmer, R., Bien, C. G. and Cawello, W. 2015. Comparison of lacosamide concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 56, 1134-40.
90. Meierkord, H., Schuchmann, S., Buchheim, K. and Heinemann, U. 1997. Optical imaging of low mg(2+)-induced spontaneous epileptiform activity in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices. *Neuroreport*, 8, 1857-61.
91. Meldrum, B. S. and Rogawski, M. A. 2007. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics*, 4, 18-61.
92. Mendizabal, J. E. and Salguero, L. F. 1996. Prevalence of epilepsy in a rural community of guatemala. *Epilepsia*, 37, 373-6.
93. Minato, H., Kikuta, C., Fujitani, B. and Masuda, Y. 1997. Protective effect of zonisamide, an antiepileptic drug, against transient focal cerebral ischemia with middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *Epilepsia*, 38, 975-80.
94. Mohanraj, R. and Brodie, M. J. 2005. Outcomes in newly diagnosed localization-related epilepsies. *Seizure*, 14, 318-23.
95. Morrell, F., Whisler, W. W. and Bleck, T. P. 1989. Multiple subpial transection: A new approach to the surgical treatment of focal epilepsy. *J Neurosurg*, 70, 231-9.
96. Morris, G. L., 3rd, Gloss, D., Buchhalter, J., Mack, K. J., Nickels, K. and Harden, C. 2013. Evidence-based guideline update: Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: Report of the guideline development subcommittee of the american academy of neurology. *Neurology*, 81, 1453-9.

97. Morris, M. E., Obrocea, G. V. and Avoli, M. 1996. Extracellular k^+ accumulations and synchronous gaba-mediated potentials evoked by 4-aminopyridine in the adult rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 109, 71-82.
98. Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I. and Japan Zonisamide On, P. D. S. G. 2007. Zonisamide improves motor function in parkinson disease: A randomized, double-blind study. *Neurology*, 68, 45-50.
99. Neligan, A., Bell, G. S., Johnson, A. L., Goodridge, D. M., Shorvon, S. D. and Sander, J. W. 2011. The long-term risk of premature mortality in people with epilepsy. *Brain*, 134, 388-95.
100. Owen, A. J., Ijaz, S., Miyashita, H., Wishart, T., Howlett, W. and Shuaib, A. 1997. Zonisamide as a neuroprotective agent in an adult gerbil model of global forebrain ischemia: A histological, in vivo microdialysis and behavioral study. *Brain Res*, 770, 115-22.
101. Perreault, P. and Avoli, M. 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 65, 771-85.
102. Perucca, E., Yasothan, U., Clincke, G. and Kirkpatrick, P. 2008. Lacosamide. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 973-4.
103. Pfeiffer, T., Draguhn, A., Reichinnek, S. and Both, M. 2014. Optimized temporally deconvolved $ca(2)(+)$ imaging allows identification of spatiotemporal activity patterns of $ca1$ hippocampal ensembles. *Neuroimage*, 94, 239-49.
104. Preux, P. M. and Druet-Cabanac, M. 2005. Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-saharan africa. *Lancet Neurol*, 4, 21-31.
105. Psarropoulou, C. and Avoli, M. 1993. 4-aminopyridine-induced spreading depression episodes in immature hippocampus: Developmental and pharmacological characteristics. *Neuroscience*, 55, 57-68.
106. Putnam, T. J. and Merritt, H. H. 1937. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science*, 85, 525-6.
107. Remy, S. and Beck, H. 2006. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129, 18-35.

108. Richards, R. K. and Everett, G. M. 1946. Tridione: A new anticonvulsant drug. *J Lab Clin Med*, 31, 1330-6.
109. Ridler, T., Matthews, P., Phillips, K. G., Randall, A. D. and Brown, J. T. 2018. Initiation and slow propagation of epileptiform activity from ventral to dorsal medial entorhinal cortex is constrained by an inhibitory gradient. *J Physiol*, 596, 2251-2266.
110. Rock, D. M., Macdonald, R. L. and Taylor, C. P. 1989. Blockade of sustained repetitive action potentials in cultured spinal cord neurons by zonisamide (ad 810, ci 912), a novel anticonvulsant. *Epilepsy Res*, 3, 138-43.
111. Rutecki, P. 1990. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, 31 Suppl 2, S1-6.
112. Sackellares, J. C., Ramsay, R. E., Wilder, B. J., Browne, T. R., 3rd and Shellenberger, M. K. 2004. Randomized, controlled clinical trial of zonisamide as adjunctive treatment for refractory partial seizures. *Epilepsia*, 45, 610-7.
113. Scharfman, H. E., Witter, M. P. and Schwarcz, R. 2000. The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction. *Ann N Y Acad Sci*, 911, ix-xiii.
114. Schauf, C. L. 1987. Zonisamide enhances slow sodium inactivation in myxicola. *Brain Res*, 413, 185-8.
115. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H. and Zuberi, S. M. 2017. Ilae classification of the epilepsies: Position paper of the ilae commission for classification and terminology. *Epilepsia*, 58, 512-521.
116. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
117. Schmidt, D., Jacob, R., Loiseau, P., Deisenhammer, E., Klinger, D., Despland, A., Egli, M., Bauer, G., Stenzel, E. and Blankenhorn, V. 1993. Zonisamide for add-on treatment of refractory partial epilepsy: A european double-blind trial. *Epilepsy Res*, 15, 67-73.
118. Schuchmann, S., Meierkord, H., Stenkamp, K., Breustedt, J., Windmuller, O., Heinemann, U. and Buchheim, K. 2002. Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at

- different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J Neurophysiol*, 87, 2929-35.
119. Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H. and Schmoldt, A. 2012. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care*, 16, R136.
120. Sheets, P. L., Heers, C., Stoehr, T. and Cummins, T. R. 2008. Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2r)-2-(acetylamino)-n-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 89-99.
121. Shorvon, S. D. 2009a. Drug treatment of epilepsy in the century of the ilae: The first 50 years, 1909-1958. *Epilepsia*, 50 Suppl 3, 69-92.
122. Shorvon, S. D. 2009b. Drug treatment of epilepsy in the century of the ilae: The second 50 years, 1959-2009. *Epilepsia*, 50 Suppl 3, 93-130.
123. Sills, G. J. and Brodie, M. J. 2001. Update on the mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Epileptic Disord*, 3, 165-72.
124. Sonsalla, P. K., Wong, L. Y., Winnik, B. and Buckley, B. 2010. The antiepileptic drug zonisamide inhibits mao-b and attenuates mptp toxicity in mice: Clinical relevance. *Exp Neurol*, 221, 329-34.
125. Spencer, S. and Huh, L. 2008. Outcomes of epilepsy surgery in adults and children. *Lancet Neurol*, 7, 525-37.
126. Spencer, S. S., Goncharova, Ii, Duckrow, R. B., Novotny, E. J. and Zaveri, H. P. 2008. Interictal spikes on intracranial recording: Behavior, physiology, and implications. *Epilepsia*, 49, 1881-92.
127. Spencer, S. S., Spencer, D. D., Williamson, P. D. and Mattson, R. 1990. Combined depth and subdural electrode investigation in uncontrolled epilepsy. *Neurology*, 40, 74-9.
128. Stasheff, S. F., Bragdon, A. C. and Wilson, W. A. 1985. Induction of epileptiform activity in hippocampal slices by trains of electrical stimuli. *Brain Res*, 344, 296-302.
129. Stohr, T., Kupferberg, H. J., Stables, J. P., Choi, D., Harris, R. H., Kohn, H., Walton, N. and White, H. S. 2007. Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy. *Epilepsy Res*, 74, 147-54.

130. Suzuki, S., Kawakami, K., Nishimura, S., Watanabe, Y., Yagi, K., Seino, M. and Miyamoto, K. 1992. Zonisamide blocks t-type calcium channel in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res*, 12, 21-7.
131. Thone, J., Leniger, T., Splettstosser, F. and Wiemann, M. 2008. Antiepileptic activity of zonisamide on hippocampal ca3 neurons does not depend on carbonic anhydrase inhibition. *Epilepsy Res*, 79, 105-11.
132. Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., Shorvon, S. and Lowenstein, D. H. 2015. A definition and classification of status epilepticus--report of the ilae task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia*, 56, 1515-23.
133. Usui, N., Mihara, T., Baba, K., Matsuda, K., Tottori, T., Umeoka, S., Nakamura, F., Terada, K., Usui, K. and Inoue, Y. 2008. Early seizure propagation from the occipital lobe to medial temporal structures and its surgical implication. *Epileptic Disord*, 10, 260-5.
134. Voskuyl, R. A. and Albus, H. 1985. Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res*, 342, 54-66.
135. Wahab, A., Albus, K. and Heinemann, U. 2011. Age- and region-specific effects of anticonvulsants and bumetanide on 4-aminopyridine-induced seizure-like events in immature rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Epilepsia*, 52, 94-103.
136. Walther, H., Lambert, J. D., Jones, R. S., Heinemann, U. and Hamon, B. 1986. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett*, 69, 156-61.
137. Wang, Y. and Khanna, R. 2011. Voltage-gated calcium channels are not affected by the novel anti-epileptic drug lacosamide. *Transl Neurosci*, 2, 13-22.
138. Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Heinemann, U. and Meierkord, H. 2000. Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiol Dis*, 7, 286-98.
139. Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H. and Meierkord, H. 2005. Seizure spread through the life cycle: Optical imaging in combined brain slices from immature, adult, and senile rats in vitro. *Neurobiol Dis*, 19, 84-95.

140. Weissinger, F., Wawra, M., Fidzinski, P., Elsner, M., Meierkord, H., Holtkamp, M. and Buchheim, K. 2017. Dentate gyrus autonomous ictal activity in the status epilepticus rat model of epilepsy. *Brain Res*, 1658, 1-10.
141. White Hs, S.-Y. M., Srivastava a, Wilcox Ksa, H. 2006. Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. *Models of seizures and epilepsy* Academic Pr Inc: Asla Pitkanen.
142. Wiebe, S., Blume, W. T., Girvin, J. P., Eliasziw, M., Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study, G. 2001. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*, 345, 311-8.
143. Williamson, P. D., French, J. A., Thadani, V. M., Kim, J. H., Novelly, R. A., Spencer, S. S., Spencer, D. D. and Mattson, R. H. 1993. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: li. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol*, 34, 781-7.
144. Witter, M. P., Amaral, D.G. 2004. *Hippocampal formation*. In: Paxinos, g, ed. *The rat nervous system*. , Elsevier Inc
145. Wright, B. J. and Jackson, M. B. 2015. Voltage imaging in the study of hippocampal circuit function and plasticity. *Adv Exp Med Biol*, 859, 197-211.
146. Wu, Z. Z., Li, D. P., Chen, S. R. and Pan, H. L. 2009. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*, 284, 36453-61.
147. Yabe, H., Choudhury, M. E., Kubo, M., Nishikawa, N., Nagai, M. and Nomoto, M. 2009. Zonisamide increases dopamine turnover in the striatum of mice and common marmosets treated with mptp. *J Pharmacol Sci*, 110, 64-8.
148. Yano, R., Yokoyama, H., Kuroiwa, H., Kato, H. and Araki, T. 2009. A novel anti-parkinsonian agent, zonisamide, attenuates mptp-induced neurotoxicity in mice. *J Mol Neurosci*, 39, 211-9.
149. Yoshida, S., Okada, M., Zhu, G. and Kaneko, S. 2005. Effects of zonisamide on neurotransmitter exocytosis associated with ryanodine receptors. *Epilepsy Res*, 67, 153-62.

150. Zhang, C. L., Dreier, J. P. and Heinemann, U. 1995. Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Res*, 20, 105-11.

6.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hanno Lothar Heuzeroth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss neuer Antikonvulsiva auf epileptiforme Aktivität – eine in vitro Studie unter Einsatz elektrophysiologischer und intrinsisch optischer Methoden“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Ort, Datum

Unterschrift (Hanno Heuzeroth)

6.3 Anteilserklärung

Hanno Lothar Heuzeroth hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Heuzeroth H.¹, Wawra M.¹, Fidzinski P., Dag R., Holtkamp M.:
The 4-Aminopyridine Model of acute seizures in vitro elucidates efficacy of new
antiepileptic drugs
Front. Neurosci., 2019;13:677.

Beitrag im Einzelnen: Hanno Lothar Heuzeroth trug zur Konzeption und Design der Studie bei, führte die elektrophysiologischen und optischen Messungen für die Medikamentengruppen Lacosamid und Zonisamid sowie einen Teil der Kontrollgruppe durch, analysierte die Daten, arbeitete eine erste Version der Abbildungen aus und war an der Finalisierung des Manuskripts beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

6.4 Lebenslauf

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

6.5 Wissenschaftliche Beiträge

Publikation:

Heuzeroth H.¹, Wawra M.¹, Fidzinski P., Dag R., Holtkamp M.:

The 4-Aminopyridine Model of acute seizures *in vitro* elucidates efficacy of new antiepileptic drugs

Front. Neurosci., 2019;13:677.

IF: 3,65

Posterbeiträge:

Heuzeroth H., Weissinger F., Dag R., Holtkamp M., Fidzinski P.:

Anticonvulsive effects of selected new generation antiepileptic drugs in the 4-aminopyridine *in vitro* rat model of epilepsy.

Presented at the 31th International Epilepsy Congress, Istanbul, Turkey, September 5 – September 9, 2015.

Heuzeroth H., Weissinger F., Dag R., Holtkamp M., Fidzinski P.:

Anticonvulsive effects of selected new generation antiepileptic drugs in the 4-aminopyridine *in vitro* rat model of epilepsy

Presented at the Gordon´s Research Conference: Mechanisms of Epilepsy and Neuronal Synchronization, Girona, Spain, August 21 – August 26, 2016.

6.6 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich während der Arbeit an der Dissertation unterstützt haben und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Besonderer Dank gebührt Prof Dr. Martin Holtkamp für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung sowie die stetige Erreichbarkeit und rasche Hilfe bei Schwierigkeiten und bei Ausarbeitung und Korrektur der Monografie und der Publikation.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Pawel Fidzinski für die Betreuung während der Arbeit danken, für die praktischen Tipps und stetige Unterstützung im Labor und folgend die Betreuung bei der Erstellung der Arbeit und Publikation.

Allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische und experimentelle Epileptologie an der Charité - Universitätsmedizin Berlin möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Stunden in den wöchentlichen Journal Clubs danken. Hier seien besonders Mandy Marbler-Pötter für Ihre Arbeit und Unterstützung im Labor sowie Dr. Matthias Wawra für die tatkräftige Hilfestellung bei Fragen und bei der Erstellung der gemeinsamen Publikation hervorzuheben.

Meinem Mitdoktoranden Dr. Ramazan Dag danke ich für die sehr gute Einarbeitung, die wunderbare Zusammenarbeit und die gegenseitige Motivation und stetigen angenehmen Gespräche sowohl im als auch außerhalb des Labors.

Besonders möchte ich mich auch bei allen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir während der Erstellung der Arbeit mit Aufmunterung und Rat zur Seite standen. Ein großer Dank geht hier an Karolin Zimzik für die Unterstützung durch alle Phasen der Arbeit und Sascha Fleer für die hilfreichen Tipps bei der Erstellung grafischer Abbildungen.