

3. Ergebnisse

3.1. Kontrolle der Pilocarpin-Behandlung.

Um sicher zu stellen, dass die Applikation von Pilocarpin tatsächlich zur Ausprägung einer chronischen Epilepsie in den Versuchstieren geführt hatte, wurde die Anfallshäufigkeit der mit Pilocarpin behandelten Tiere videoüberwacht aufgezeichnet. Innerhalb des Zeitraums in dem die hier vorgestellten Experimente stattfanden, wurden für diese Untersuchungen und für Studien anderer Arbeitsgruppen insgesamt 282 Ratten einer Pilocarpin-Behandlung unterzogen. 38 Tiere (13,5 %) verstarben unmittelbar während der Induktionsphase des Status epilepticus, bei 13 Tieren (4,6 %) konnten bereits während der Induktionsphase keine epileptischen Anfälle beobachtet werden. Diese Tiere zeigten auch in der Folgezeit keine epileptischen Anfälle. Von den 231 überlebenden Tieren mit Status epilepticus zeigten in der chronischen Phase 29 Tiere (12,7 %) videoüberwacht gar keine Anfälle, 66 Tiere (28,6 %) zeigten weniger als einen Anfall pro Tag und 136 Tiere (58,9 %) mehr als einen Anfall pro Tag. Die Videoüberwachung der Tiere fand tageweise und stichprobenartig in einem Zeitraum zwischen vier bis acht Wochen nach der Pilocarpin-Behandlung statt. Zur Durchführung der Experimente wurden lediglich die Tiere verwendet, bei denen durchschnittlich mindestens ein Anfall pro Tag beobachtet werden konnte.

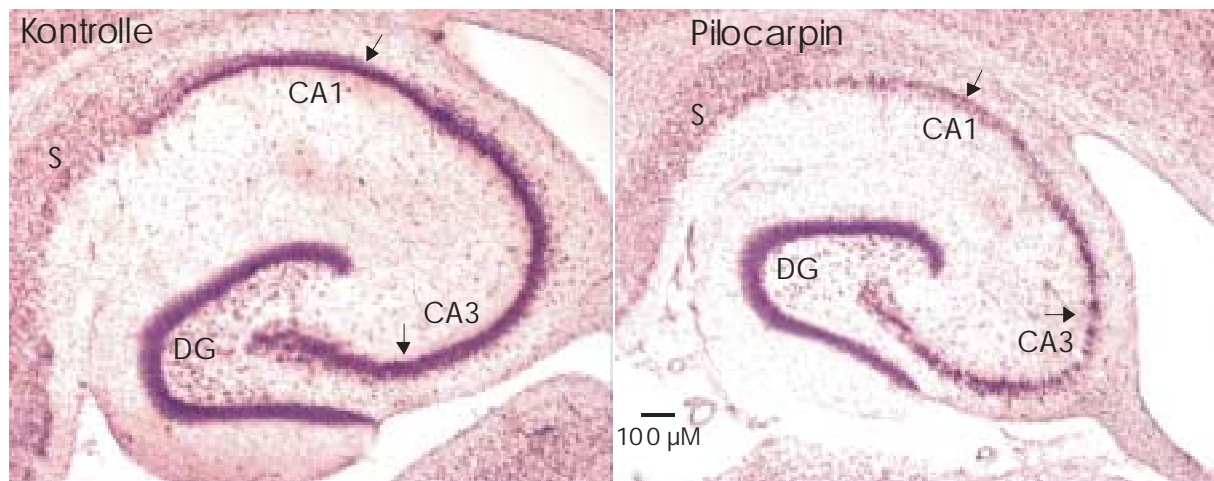


Abb. 8. Gewebevergleich zwischen Kontrolltieren und mit Pilocarpin behandelten Tieren nach Nissl-Färbung.

Dargestellt sind 30µM starke, horizontale Schnitte durch den Hippocampus. Die eingezeichneten Pfeile verweisen auf die Pyramidenzellschichten im gesunden und epileptischen Gewebe. Deutlich zu erkennen ist die Ausdünnung der Pyramidenzellschichten von CA1 und CA3 im epileptischen Gewebe. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus erscheint hingegen unverändert. **CA1:** Cornu ammonis 1; **CA3:** Cornu ammonis 3; **DG:** Gyrus dentatus, **S:** Subiculum.

Von insgesamt 38 Gehirnen wurden jeweils 2-5 Gewebeschnitte einer Nissl-Färbung unterzogen. So sollte sichergestellt werden, dass die für das Pilocarpin-Modell als typisch beschriebenen Merkmale, Sklerotisierung des Gewebes, Zell-Dispersion und Zellverlust, einheitlich und ausnahmslos auch im untersuchten Gewebe wieder zu finden waren. Eine typische Dispersion der Pyramidenzellschichten der CA1- und CA3-Region des Hippocampus konnte in allen Gewebeschnitten Pilocarpin behandelte Tiere festgestellt werden. Bei den genannten Pyramidenzellschichten ließ die Intensität der Nissl-Färbung auf eine Ausdünnung der Zelldichte schließen (Abb. 8). Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus war von einer vergleichbaren sklerotischen Atrophie nur in 18,4 % der Fälle betroffen.

Tab. 1. Verlust an Zelldichte in Prozent im epileptischen Gewebe im Vergleich zu Kontrollgewebe.

In den vier klassisch beschriebenen Zellschichten der Cornu ammonis weisen die mit Pilocarpin behandelten Tiere eine deutlich verringerte Zelldichte auf. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Verhältnisse in unbehandelten Tieren, deren Zelldichte in den jeweiligen Regionen als 100% angesetzt wurde. Die negativen Werte beschreiben somit den prozentualen Verlust an Zelldichte im Vergleich zum Kontrollgewebe. **SEM:** Standardfehler.

Zelldichte	CA1	CA3
Stratum oriens/alveus	- 46 % ± 3,2 % (SEM)	- 44 % ± 2,3 % (SEM)
Stratum pyramidale	- 35 % ± 3,1 % (SEM)	- 30 % ± 2,7 % (SEM)
Stratum radiatum	- 19 % ± 1,1 % (SEM)	- 22 % ± 1,9 % (SEM)
Stratum lacunosum moleculare	+ 7 % ± 1,3 % (SEM)	+ 10 % ± 0,5 % (SEM)

Bei 22 mit Pilocarpin behandelten Tieren und 16 Kontrolltieren wurden anhand der Nissl-Färbung Zellzählungen in den vier hippocampalen Zellschichten von CA1 und CA3 durchgeführt. Dabei wurde nicht zwischen Neuronen und Gliazellen unterschieden. Der Verlust an Zelldichte bei mit Pilocarpin behandelten Tieren erwies sich für die Schichten Stratum oriens und Stratum pyramidale im Vergleich zum Kontrollgewebe als signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test; siehe Tab. 1). Sowohl in CA1, als auch in CA3 offenbarte sich der stärkste Verlust an Zelldichte im Stratum oriens (CA1: $-46,3 \% \pm 3,2 \% \text{ SEM} = \text{Standardfehler}$; CA3 $-44,4 \% \pm 2,3 \% \text{ SEM}$). In den Schichten Stratum radiatum (CA1: $p = 0,15$; CA3: $p = 0,20$; Mann-Whitney-U-Test) und Stratum lacunosum moleculare (CA1: $p = 0,58$; CA3: $0,53$; Mann-Whitney-U-Test) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gesundem und epileptischen Gewebe festgestellt werden. Im Stratum lacunosum moleculare von CA1 und CA3 wurden im epileptischen Gewebe sogar mehr Zellen gezählt als im Kontrollgewebe.

Die hier gegebenen Prozentangaben beziehen sich nicht auf das absolute Volumen einer jeden Zellschicht, sondern auf das definierte Auszählungsvolumen (siehe 2.1.6.). Ein auf Statistik

begründetes Protokoll der Veränderung der jeweiligen Mächtigkeit der Zellschichten wurde hier nicht vorgenommen, da sich die Charakterisierung der vier hippocampalen Schichten Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und Stratum locunosum moleculare lediglich auf „gesundes“ Gewebe bezieht. Veränderungen in der Ausdehnung der Zellschichten im epileptischen Gewebe (Mello et al., 1993; Hamani et al., 1997) lassen eine absolute Bestimmung des Ausmaßes an Zelltod im epileptischen Gewebe im Vergleich mit Kontrollgewebe nicht zu. Insbesondere die Dispersion des Pyramidenzellbands im epileptischen Gewebe führte dazu, dass vereinzelt Pyramidenzellen oftmals bis weit hinein in das Stratum radiatum und Stratum oriens beobachtet werden konnten und eine zuverlässige Beurteilung der Ausdehnung des Pyramidenzellbands nicht mehr möglich war. Die signifikante Verringerung der Zelldichte im Stratum oriens und Stratum pyramidale ließ deshalb bei gleichzeitiger Veränderung der Mächtigkeit der Zellschichten im epileptischen Gewebe eine quantitative Beurteilung des Zelltods im epileptischen Gewebe nicht zu.

3.2. Tonische GABAerge Inhibition im epileptischen Gewebe.

Bei der Untersuchung der tonischen GABAergen Inhibition dienten Körnerzellen des Gyrus dentatus und Pyramidenzellen der Cornu ammonis regio superior (CA1) als Indikatoren für eine mögliche Veränderung in der Kontrolle der GABA-Aufnahme im epileptischen Gewebe. Gemessen wurden pharmakologisch isolierte Chloridströme als Antwort auf die Applikation von 10 μM GABA. Die Applikation von GABA in die Extrazellulärlösung sollte zu einer Erhöhung der tonischen GABA-Konzentration führen. Eine pathologische Veränderung des gemessenen Chloridstroms wurde als Anzeichen für eine Veränderung der extrazellulären / tonischen GABA-Konzentration interpretiert. Eine veränderte extrazelluläre GABA-Konzentration wurde wiederum als Indiz für eine veränderte Kontrolle des GABA-Recyclings gewertet. Durch die Verwendung des GAT-1 Antagonisten Tiagabin sollte geklärt werden, ob eine Störung der Kontrolle der extrazellulären GABA-Konzentration im epileptischen Gewebe im Zusammenhang mit dem GABA-Transporter 1 vorlag.

In einem Zeitraum von zwei Sekunden wurde das Haltepotential durch eine so genannte Spannungsrampe kontinuierlich und gleichmäßig von -80 mV auf 0 mV erhöht. In dieser Zeitspanne wurden dann pharmakologisch isolierte Chloridströme aufgezeichnet. Für jede Zelle wurden drei Kontrollmessungen, drei Messungen in Gegenwart von 10 μM GABA und drei Messungen in Gegenwart von 10 μM GABA und 20 μM des GABA-Transporter-GAT-1-Antagonisten Tiagabin durchgeführt (Abb. 9). Der Kontrollwert wurde als Basiswert von den beiden anderen Messungen subtrahiert. Insgesamt wurden zehn CA1-Pyramidenzellen als

Kontrolle und acht Zellen aus mit Pilocarpin behandeltem Gewebe vermessen. Bei den Körnerzellen des Gyrus dentatus erfolgten jeweils sieben Messungen für beide Testgruppen. Der Eingangswiderstand, der bei -60 mV Haltepotential gemessen wurde, betrug bei den CA1- Pyramidenzellen $60 \text{ M}\Omega \pm 4 \text{ M}\Omega$ (SEM) und bei den Körnerzellen des Gyrus dentatus $161 \text{ M}\Omega \pm 30 \text{ M}\Omega$ (SEM). Zwischen den Kontrollgruppen und den pathologischen Testgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Eingangswiderstands ($p = 0,44$, Mann-Whitney-U-Test). Der Serienwiderstand betrug bei den CA1-Pyramidenzellen $9 \text{ M}\Omega \pm 1,3 \text{ M}\Omega$ (SEM) und bei den Körnerzellen des Gyrus dentatus $14 \text{ M}\Omega \pm 2,1 \text{ M}\Omega$ (SEM). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Pilocarpingruppe festgestellt werden ($p = 0,09$ Mann-Whitney-U-Test).

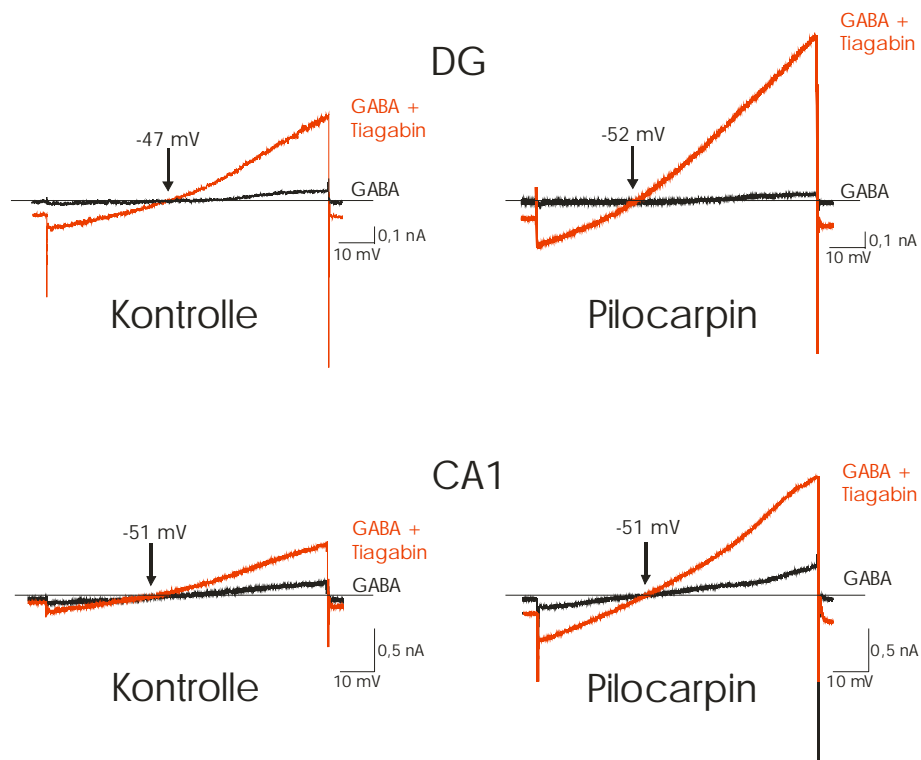


Abb. 9. Reaktion der Zellen auf GABA oder GABA und Tiagabin.

Exemplarische Antworten von Körnerzellen und Pyramidenzellen auf extrazellulär appliziertes GABA ($10 \mu\text{M}$) und GABA ($10 \mu\text{M}$) + Tiagabin ($20 \mu\text{M}$). Die abgebildeten Chloridströme unterschieden sich sowohl zwischen Kontroll- und Testgruppe, als auch zwischen Körner- und Pyramidenzellen. Bei Körnerzellen (obere Reihe) war der Tiagabin-Effekt stärker als in den CA1-Pyramidenzellen (untere Reihe). In der Pilocarpin-Gruppe (rechte Seite) war sowohl die Antwort auf $10 \mu\text{M}$ GABA, als auch die Antwort auf GABA und Tiagabin stärker ausgeprägt. Das Umkehrpotential ist mit einem Pfeil markiert. **CA1**: Cornu ammonis 1; **DG**: Gyrus Dentatus.

Die Einzelbeispiele der Chloridströme wie sie in Abb. 9. dargestellt wurden, lassen erkennen, dass das Strom-Spannungsverhältnis während der zwei Sekunden dauernden Messung nicht streng linear war. Auch das theoretische Chloridumkehrpotential war mit den experimentell ermittelten Umkehrpotentialen nicht exakt identisch. Das theoretische

Chloridumkehrpotential wurde auf der Basis der Chloridkonzentrationen in der Extra- und Intrazellulärlösung bestimmt. Nach der Nernstgleichung ergab sich ein Wert von -65,67 mV. Die experimentell bestimmten Umkehrpotentiale betragen für:

CA1 Pyramidenzellen / Kontrolle:	- 60,10 mV \pm 2,98 mV (SEM; n = 9),
CA1 Pyramidenzellen / Pilocarpin:	- 62,44 mV \pm 3,22 mV (SEM, n = 10),
DG Körnerzellen / Kontrolle:	- 56,91 mV \pm 2,01 mV (SEM; n = 7),
DG Körnerzellen / Pilocarpin:	- 59,24 mV \pm 3,12 mV (SEM; n = 7).

Als Folge der extrazellulären Applikation von 10 μ M GABA erhöhte sich der Chloridstrom um:

CA1 Pyramidenzellen / Kontrolle:	352 pA \pm 51 pA (SEM; n = 9),
CA1 Pyramidenzellen / Pilocarpin:	432 pA \pm 42 pA (SEM; n = 10),
DG Körnerzellen / Kontrolle:	121 pA \pm 33 pA (SEM; n = 7),
DG Körnerzellen / Pilocarpin:	75 pA \pm 22 pA (SEM; n = 7).

Weder die Differenz zwischen Kontrollgruppe und Pilocarpin-Gruppe bei den Pyramidenzellen ($p = 0,26$ Mann-Whitney-U-Test) noch bei den Körnerzellen ($p = 0,28$ Mann-Whitney-U-Test) erwies sich als signifikant. Somit konnte zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe kein Unterschied in der Kontrolle der tonischen GABAergen Inhibition festgestellt werden. Die GABA-induzierten Ströme unterschieden sich allerdings deutlich in Pyramidenzellen und Körnerzellen. In den CA1-Pyramidenzellen war der gemessene Chloridstrom um einen Faktor 3-4 größer als in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (Abb. 10).

Als Folge der extrazellulären Applikation von 10 μ M GABA + 20 μ M Tiagabin (GAT-1-Blocker) erhöhte sich der Chloridstroms um:

CA1 Pyramidenzellen / Kontrolle:	1698 pA \pm 276 pA (SEM; n = 9),
CA1 Pyramidenzellen / Pilocarpin:	1474 pA \pm 182 pA (SEM; n = 10),
DG Körnerzellen / Kontrolle:	803 pA \pm 152 pA (SEM; n = 7),
DG Körnerzellen / Pilocarpin:	865 pA \pm 156 pA (SEM; n = 7).

Auch durch die zusätzliche Applikation von 20 μM Tiagabin waren die Abweichungen zwischen Kontroll- und Pilocarpingruppe weder für die Pyramidenzellen ($p = 0,33$ Mann-Whitney-U-Test) noch für die Körnerzellen ($p = 0,12$ Mann-Whitney-U-Test) signifikant. Die Blockade von GAT-1 führte zu einem deutlichen Anstieg der Chloridströme, was unter diesen Bedingungen auf eine erhöhte extrazelluläre GABA-Konzentration schließen ließ. Dies verdeutlichte die wichtige Rolle, die GAT-1 bei der Kontrolle der GABAergen Inhibition spielt. Da aber weder vor noch nach der Blockade von GAT-1 ein signifikanter Unterschied in der Chloridstrom-Antwort zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe zu erkennen war, konnte eine veränderte GAT-1 Funktion in CA1 oder im Gyrus dentatus nicht festgestellt werden (Abb. 10).

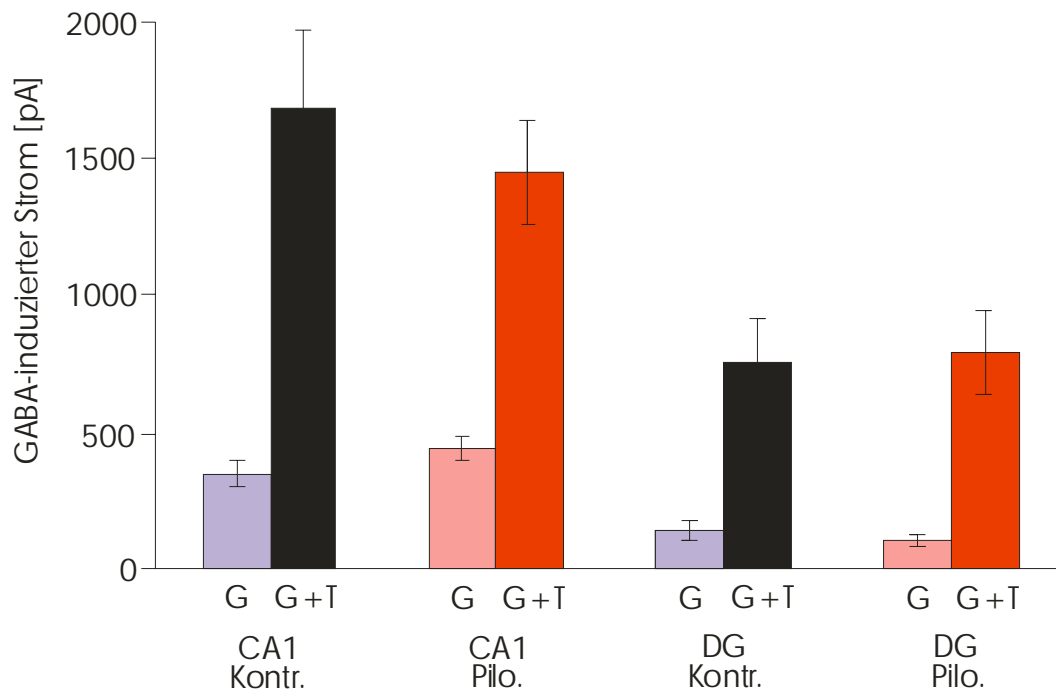


Abb. 10. Durch GABA und GABA + Tiagabin induzierte Ströme.

In den Pyramidenzellen (Kontroll- und Testgruppe) war sowohl die Antwort auf 10 μM GABA, als auch die Antwort auf 10 μM GABA + 20 μM Tiagabin ausgeprägter als in den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Doch in beiden Neuronentypen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Kontr.) und der Gruppe mit Pilocarpin (Pilo.) behandeltem Gewebe festgestellt werden. **G:** GABA-Applikation, **G+T:** GABA + Tiagabin Applikation, **CA1:** Cornu ammonus regio superior, **DG:** Gyrus dentatus

Die Behandlung der Tiere mit Pilocarpin führte auch bei der Betrachtung des prozentualen Anstiegs in der Stromantwort, vermittelt durch die Blockade des GAT-1-Transporters, bei keinem der beiden Neuronen-Typen (Pyramidenzellen: $p = 0,22$; Körnerzellen: $p = 0,08$; Wilcoxon-Test) zu einer signifikanten Differenz zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe (Abb. 11). Die Stromantwort auf die GABA-Applikation wurde hierfür jeweils als 100%

gesetzt und dann die prozentuale Abweichung der Stromantwort auf GABA + Tiagabin berechnet:

CA1 Pyramidenzellen / Kontrolle:	482 % ± 69 % (SEM; n = 9),
CA1 Pyramidenzellen / Pilocarpin:	341 % ± 43 % (SEM; n = 10),
DG Körnerzellen / Kontrolle:	662 % ± 162 % (SEM; n = 7),
DG Körnerzellen / Pilocarpin:	1135 % ± 341 % (SEM; n = 7).

Körnerzellen des Gyrus dentatus reagierten jedoch auf die Blockade des GAT-1-Transporters wesentlich stärker als die CA1-Pyramidenzellen. Der Unterschied zwischen Körnerzellen und Pyramidenzellen erwies sich bezüglich des prozentualen Tiagabin-Effekts als signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test,).

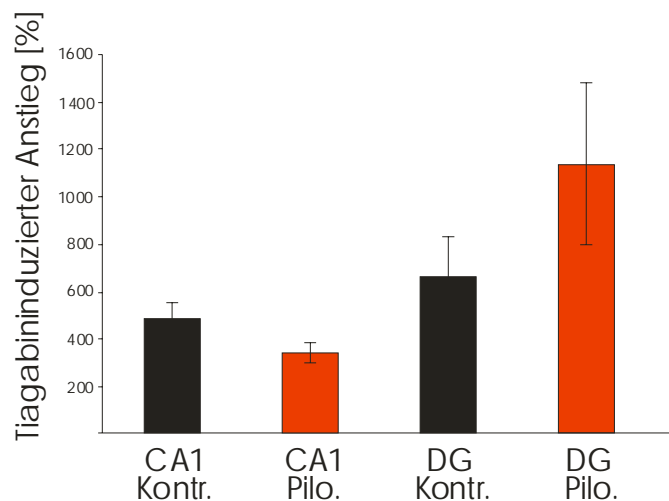


Abb. 11. Absoluter Effekt der Tiagabin Applikation.

Die Antwort der Zellen auf 10 μ M GABA wurde als 100 % gesetzt. Dann wurde für jede der vier gemessenen Zelltypen die Antwort auf Tiagabin in ein prozentuales Verhältnis zum jeweiligen 100 %-Wert gesetzt. Durch diese Normierung konnte der absolute Tiagabin-Effekt betrachtet werden. Auch hier unterschieden sich Pyramidenzellen deutlich von Körnerzellen ($p < 0,001$), jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Testgruppe zu erkennen, der die Hypothese einer epilepsietypischen Veränderung des GABA-Recyclings im epileptischen Gewebe unterstützt hätte. **CA1**: Cornu ammonis regio superior, **DG**: Gyrus dentatus.

3.3. Phasische GABAerge Inhibition im epileptischen Gewebe.

Nachdem gezeigt werden konnte (siehe 3.2.), dass weder die extrazelluläre Applikation von GABA noch von GABA + Tiagabin zu einem signifikanten Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen aus epileptischem Gewebe führte, wurde überprüft, ob CA1-Pyramidenzellen aus Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe unterschiedlich auf elektrisch stimulierte GABAerge Transmission reagierten. Um dies festzustellen, wurde die Kinetik

evozierter IPSCs (eIPSCs) zwischen Kontrollzellen und Zellen aus epileptischem Gewebe miteinander verglichen (Abb.12). Pharmakologisch isolierte eIPSCs wurden von sieben Kontrollzellen und fünf Zellen aus mit Pilocarpin behandeltem Gewebe gemessen.

Der Eingangswiderstand betrug bei den Kontrollen $84 \text{ M}\Omega \pm 4 \text{ M}\Omega$ (SEM) und in der Testgruppe $87 \text{ M}\Omega \pm 4 \text{ M}\Omega$ (SEM). Der Serienwiderstand betrug $8 \text{ M}\Omega \pm 1,1 \text{ M}\Omega$ (SEM) bei den Kontrollen und $8 \text{ M}\Omega \pm 1,3 \text{ M}\Omega$ (SEM) in der Gruppe Pilocarpin behandelte Tiere. Weder für den Eingangswiderstand noch für den Serienwiderstand konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe gefunden werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die gemittelten sIPSC-Amplituden betragen bei den Kontrollen $161 \text{ pA} \pm 36 \text{ pA}$ (SEM) und bei den Pyramidenzellen der mit Pilocarpin behandelten Ratten $174 \pm 58 \text{ pA}$ (SEM). Der Amplitudenunterschied war ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

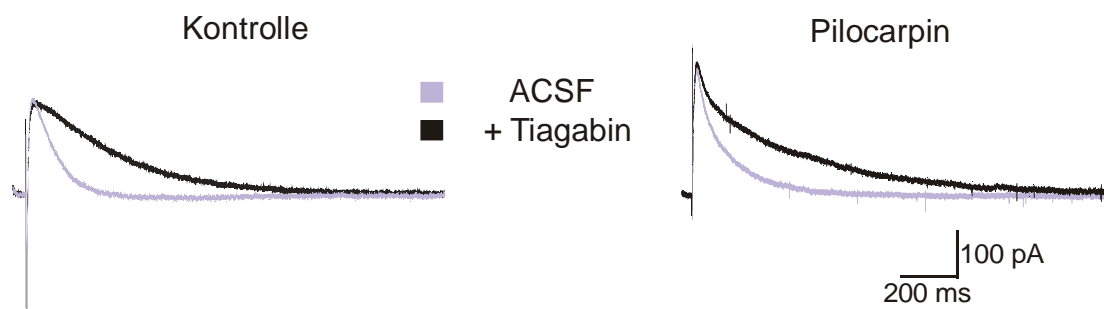


Abb. 12. Durch Stimulation induzierte IPSC.

Für jede Zelle wurde eine Serie von stimulierten eIPSC's aufgezeichnet und gemittelt. Anschließend wurde $20 \mu\text{M}$ Tiagabin appliziert und ein Mittelwert der stimulierten eIPSC's errechnet. Je ein Beispiel für eine eIPSC-Messung an einer Kontrollzelle und einer Zelle aus epileptischem Gewebe zeigen die überlagerten eIPSC-Kinetiken mit und ohne Tiagabin. Tiagabin führte zu einer offensichtlichen Verlängerung der eIPSC-Abklingdauer. Der Effekt ist zwischen den beiden Testgruppen ähnlich stark ausgeprägt. ACSF: Extrazellulärlösung

Kinetische Veränderungen der eIPSCs wurden mit dem Maß der Halbwertsbreite überprüft (Abb.13a). In der Kontrollgruppe betrug die Halbwertsbreite $87 \text{ ms} \pm 19 \text{ ms}$ (SEM), in der Testgruppe $65 \text{ ms} \pm 21 \text{ ms}$ (SEM; $p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Nach extrazellulärer Applikation des GAT-1-Antagonisten Tiagabin ($20 \mu\text{M}$) verlängerte sich die Abklingphase der eIPSCs. Unter Tiagabin betrug die Halbwertsbreite für die Kontrollgruppe $241 \text{ ms} \pm 59 \text{ ms}$ (SEM) und in der Testgruppe $204 \text{ ms} \pm 24 \text{ ms}$ (SEM, $p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Die stimulierte GABAerge Inhibition führte in CA1-Pyramidenzellen weder vor noch nach der Blockade von GAT-1 durch Tiagabin zu einem signifikanten Unterschied in der Halbwertsbreite der IPSC zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe.

Der durchschnittliche Ladungstransfer während eines eIPSC in Pyramidenzellen wurde durch die Berechnung der Fläche unterhalb der gemittelten eIPSCs bestimmt (Abb.13b). 20 μ M Tiagabin erhöhte den Ladungstransfer in den Kontrollzellen um $254 \% \pm 31 \%$ (SEM) und in den Zellen der epileptischen Testgruppe um $241 \% \pm 24 \%$ (SEM). Dieser scheinbare Unterschied erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Somit konnte auch für die phasische Komponente der GABAergen Inhibition keine pathologische Veränderung festgestellt werden. Die Effizienz der Kontrolle der GABAergen Inhibition wurde sowohl für die tonische, als auch für die phasische Komponente als unverändert zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe festgestellt. Die Blockade von GAT-1 durch Tiagabin änderte an diesem Ergebnis nichts.

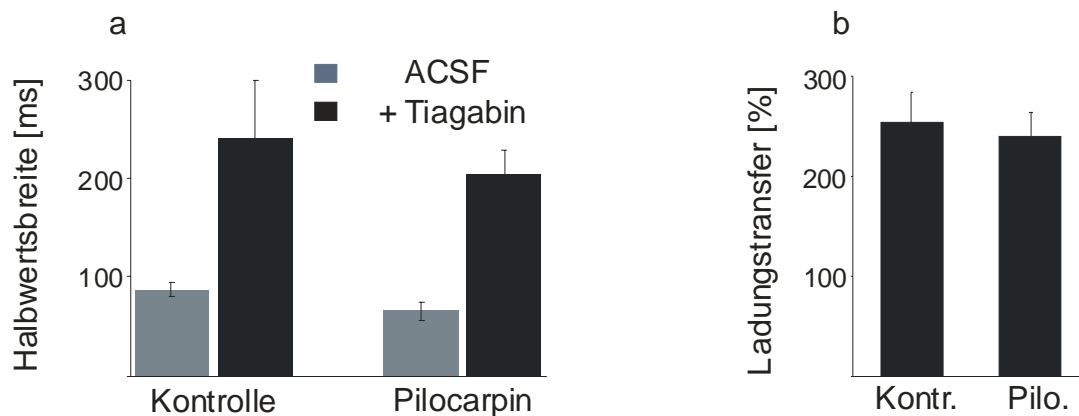


Abb. 13. Halbwertsbreite der eIPSC's und Ladungstransfer.

(a) Unter dem Einfluss von Tiagabin verlängert sich die Abklingdauer der eIPSCs, allerdings ist dieser Effekt zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit Pilocarpin behandelten Tiere nicht signifikant ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test). (b) Der Ladungstransfer während eines stimulierten eIPSC unter der Wirkung von Tiagabin betrug bei Kontrollzellen $254 \% \pm 31 \%$ (SEM), bei Zellen aus mit Pilocarpin behandeltem Gewebe $241 \% \pm 24 \%$ (SEM), bezogen auf jeweils 100% in Abwesenheit von Tiagabin. **ACSF**: Extrazellulärlösung

3.4. Inhibitorische Innervation von SRL-Interneuronen Pilocarpin behandelte Ratten in der CA1-Region des Hippocampus.

Eine pathologische Veränderung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation wurde an Interneuronen aus der Grenzschrift Stratum radiatum / Stratum lacunosum moleculare (SRL-Interneurone) in der CA1-Region des Hippocampus untersucht. Insgesamt wurden 16 Interneurone aus 12 mit Pilocarpin behandelten Ratten und 14 Interneurone aus 10 Kontrolltieren miteinander verglichen. Die Gehirne der Tiere wurden 30-40 Wochen nach der Induktion des Status epilepticus präpariert. Dieser Ansatz sollte sicherstellen, dass die Folgen der Pilocarpin-Behandlung als persistierende Unterschiede zwischen Kontrollgewebe und epileptischem Gewebe erfasst werden konnten. Im Gegensatz zu den gleichaltrigen Kontrollen oder jüngeren mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigte diese Tiere nahezu

ausnahmslos eine Verhaltensauffälligkeit. Die Tiere waren aggressiv und reagierten bei Annäherung mit einem für Ratten situativ-typischen Drohgebahren, dem Kopfwippen.

3.4.1. Aktionspotential-Frequenz.

Aktionspotentiale wurden im sogenannten „cell-attached“-Modus aufgezeichnet. Nachdem zwischen der Messpipette und der Zellwand ein Abdichtungswiderstand im Bereich von 2-10 Gigaohm etabliert wurde, wurden für alle Zellen die Aktionspotentiale während einer Minute aufgezeichnet. Dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt, wobei sich zeigte, dass sich die Frequenz und die Amplitude der aufgezeichneten Aktionspotentiale in den ersten Minuten der Messung noch stark veränderte (Abb. 6). Ca. 15 Minuten nach der Etablierung des Gigaohm-Abdichtungswiderstands veränderten sich die Amplitude und die Frequenz nicht mehr. Dieser Zeitpunkt wurde bezüglich der Ausprägung von Amplitude und Frequenz der Aktionspotentiale als konstant und repräsentativ angenommen (Abb. 14a).

Tab. 2: Frequenz gemessener Aktionspotentiale.

In Interneuronen des pathologischen Gewebes ist die AP-Frequenz um einen Faktor ~2 erhöht. Trotz erheblichen Schwankungen innerhalb der Gruppen wiesen Interneurone aus pathologischem Gewebe keine AP-Frequenzen unterhalb von 1Hz auf. **MWU-Test:** Mann-Whitney-U-Test.

	Kontrolle	Pilocarpin
AP-Frequenz	1,26 Hz	2,81 Hz
Gruppengröße	14	16
Minimum	0,1 Hz	1,1 Hz
Maximum	4,1 Hz	6,8 Hz
Standardabweichung	± 1,48 Hz	± 1,56 Hz
Standardfehler	± 0,40 Hz	± 0,42 Hz
MWU-Test	p < 0.01	

Für Interneurone Pilocarpin behandelte Tiere wurde eine Aktionspotentialfrequenz von 2,81 Hz. ± 0,42 Hz. (SEM, n = 16) ermittelt, bei den Kontrollen von 1,26 Hz. ± 0,40 Hz. (SEM, n = 14, Abb. 14b). Die gemessenen Werte für die AP-Frequenz wiesen eine hohe Schwankungsbreite innerhalb der beiden Testgruppen auf (Kontrolle: 0,1 - 4,1 Hz.; Pilocarpin: 1,1 Hz. - 6,8 Hz.). Trotzdem erwies sich der Unterschied in der AP-Frequenz im statistischen Vergleich beider Gruppen als signifikant (p < 0,01; Mann-Whitney-U-Test, Tab. 2). Auffällig war, dass die AP-Frequenz der SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe mindestens 1.1 Hz. betrug, während in einigen Interneuronen aus Kontrollgewebe nahezu gar keine Aktionspotentiale zu beobachten waren.

Nach der Etablierung der Ganzzelleableitung wurde in der Stromklemme, durch schrittweise Depolarisation, das Schwellenpotential zur Auslösung von Aktionspotentialen bestimmt. Zeigten die Zellen bei anhaltender Depolarisation eine für Interneurone in der Regel atypische deutliche Frequenzadaptation wurde der Versuch abgebrochen. Die durchschnittliche AP-Schwelle war im Kontrollgewebe etwas negativer ($-50,4 \text{ mV} \pm 1,06 \text{ mV SEM}$; $n = 10$) als bei den Interneuronen aus dem epileptischen Gewebe ($-47,9 \text{ mV} \pm 1,23 \text{ mV SEM}$; $n = 9$). Diese Differenz erwies sich allerdings als nicht signifikant ($p = 0,14$; Mann-Whitney-U Test). Die signifikant erhöhte AP-Frequenz in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe ließ sich somit nicht durch eine Veränderung in der AP-Schwelle erklären.

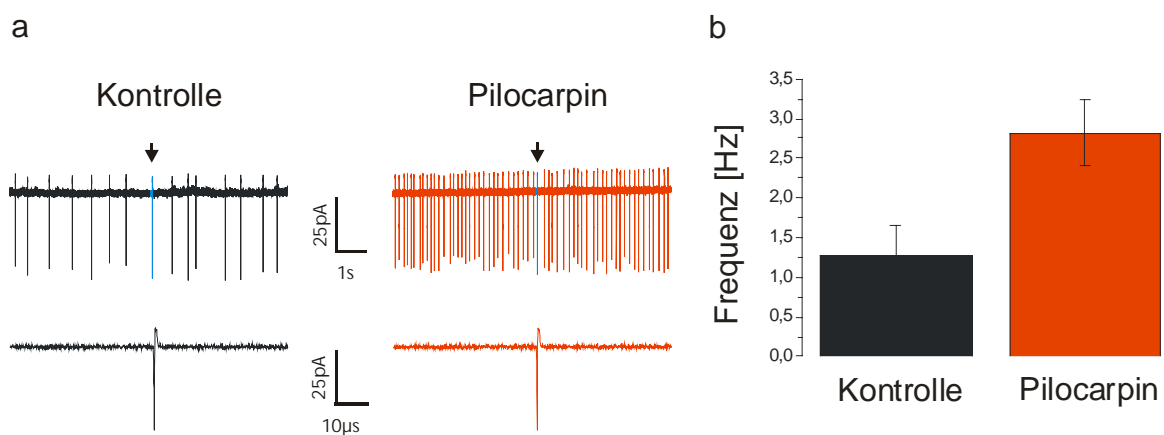


Abb. 14. Erhöhte AP-Frequenz in Interneuronen aus epileptischem Gewebe.

(a) Zwei repräsentative Beispiele aus Kontrollgewebe und epileptischem Gewebe. Die blau unterlegten Aktionspotentiale (obere Reihe) wurden zeitlich vergrößert dargestellt (untere Reihe). (b) Aktionspotentiale wurden über einen Zeitraum von drei mal einer Minute aufgezeichnet und anschließend die AP-Frequenz ermittelt. Interneurone aus Pilocarpin behandeltem Gewebe generierten durchschnittlich mehr als doppelt so häufig Aktionspotentiale.

3.4.2. Eingangs-, Serienwiderstand und Rauschanalyse.

Sowohl der Eingangs- als auch der Serienwiderstand wurden bei einem Haltepotential von -70 mV , 10 Minuten nach der Etablierung der Ganzzelleableitungssituation, in Abwesenheit jeglicher Pharmaka erstmalig gemessen. Die Bestimmung von Eingangs- und Serienwiderstand wurde dann im Verlauf der Messung regelmäßig wiederholt, um einen Qualitätsverlust der Ableitung feststellen zu können. Der Eingangswiderstand betrug für Interneurone aus der Pilocarpin-Gruppe durchschnittlich $295 \text{ M}\Omega \pm 29 \text{ M}\Omega$ (SEM) und $335 \text{ M}\Omega \pm 25 \text{ M}\Omega$ (SEM) bei der Kontrollgruppe. Der Serienwiderstand betrug bei der Pilocarpin-Gruppe durchschnittlich $12 \text{ M}\Omega \pm 0,8 \text{ M}\Omega$ (SEM), bei der Kontrollgruppe $14 \text{ M}\Omega \pm 0,6 \text{ M}\Omega$ (SEM). Für beide Kenngrößen konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Testgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (jeweils $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Das Hintergrundrauschen wurde separat für die jeweiligen Haltepotentiale gemessen, bei 0 mV (Aufzeichnung von sIPSCs) betrug es für die Pilocarpin-Gruppe $3,87 \text{ pA} \pm 0,05 \text{ pA}$ (SEM, $n = 16$) und für die Kontroll-Gruppe $3,81 \text{ pA} \pm 0,06 \text{ pA}$ (SEM, $n = 14$). Bei 0 mV und TTX-Applikation (Aufzeichnung von mIPSCs) betrug das Hintergrundrauschen $3,70 \text{ pA} \pm 0,06 \text{ pA}$ (SEM, $n = 16$) für die Pilocarpin-Gruppe und $3,67 \text{ pA} \pm 0,06 \text{ pA}$ (SEM, $n = 14$). Und bei -70 mV Haltepotential (Aufzeichnung von mEPSCs) ergab sich ein Wert von $3,34 \text{ pA} \pm 0,08 \text{ pA}$ (SEM, Kontrollen $n = 14$, Pilocarpin $n = 16$) für beide Gruppen. Weder bei der Aufzeichnung inhibitorischer noch bei der Aufzeichnung exzitatorischer Ströme traten signifikante Unterschiede im Hintergrundrauschen zwischen den beiden Versuchsgruppen auf (jeweils $p > 0,05$ für sIPSC, mIPSC und mEPSC, Mann-Whitney-U-Test). Da sowohl die Bestimmung der Mittelwerte der Amplituden, als auch der Frequenzen der PSCs vom Grundrauschen abhängig sein können, wurde das Rauschen und die Amplitude / Frequenz statistisch paarweise für jedes Interneuron getestet. Bei keinem der drei beschriebenen Parameter konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Rauschen und Amplitude oder zwischen Rauschen und Frequenz festgestellt werden (jeweils $p > 0,05$, Wilcoxon-Test). Ein Einfluss des Rauschens auf die Frequenz oder Amplitude der PSCs konnte somit ausgeschlossen werden.

3.4.3. Frequenz der postsynaptischen Ströme.

Die Messung der IPSCs erfolgte bei 0 mV Haltepotential, die Messung der EPSC-Frequenzen bei -70 mV Haltepotential und in Gegenwart von 1 mM Gabazin (GABA_A-Rezeptor-Blocker). Die Mittelwerte der IPSC-Frequenzen, waren in den untersuchten CA1 Interneuronen Pilocarpin behandelte Tiere signifikant verringert (Abb. 15). Dies war sowohl für die sIPSC (Kontrolle: $6,77 \text{ Hz.} \pm 0,85 \text{ Hz. SEM}$; Pilocarpin: $4,18 \text{ Hz.} \pm 0,62 \text{ Hz. SEM}$; $p < 0,05$ Mann-Whitney-U-Test), als auch für die mIPSC-Frequenzen (Kontrolle: $5,24 \text{ Hz.} \pm 0,69 \text{ Hz. SEM}$; Pilocarpin: $3,56 \text{ Hz.} \pm 0,69 \text{ Hz. SEM}$, $p < 0,05$ Mann-Whitney-U-Test) zu beobachten. Die mEPSC-Frequenz (Kontrolle: $1,52 \text{ Hz.} \pm 0,15 \text{ Hz. SEM}$; Pilocarpin: $1,79 \text{ Hz.} \pm 0,28 \text{ Hz.}$) zeigte zwischen beiden Gruppen keine Abweichung. Somit wurde lediglich für die Inhibition der untersuchten Interneurone festgestellt, dass die Zellen Pilocarpin behandelte Tiere signifikant seltener (niederfrequenter) inhibiert wurden, während die exzitatorischen Eingänge der Interneurone keinen Unterschied zwischen beiden Testgruppen aufzeigten. Das Ausmaß der Frequenzabnahme war mit ~ 62 % bei den sIPSCs und ~ 68 % bei den mIPSCs im Durchschnitt nahezu identisch. Innerhalb der beiden Testgruppen konnte eine große Variabilität bezüglich der IPSC-Frequenz festgestellt werden. Spontane IPSC

traten mit einer Frequenz zwischen ~ 1 bis 12 Hz. auf, miniatur IPSC mit 1 bis maximal 9 Hz. Die Verringerung der Mittelwerte der sIPSC und mIPSC-Frequenz stellten somit keine einheitliche, homogene Verringerung der inhibitorischen Innervation in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe dar. In beiden Testgruppen konnten Interneurone mit hoch- und niederfrequenten inhibitorischen Eingängen beobachtet werden.

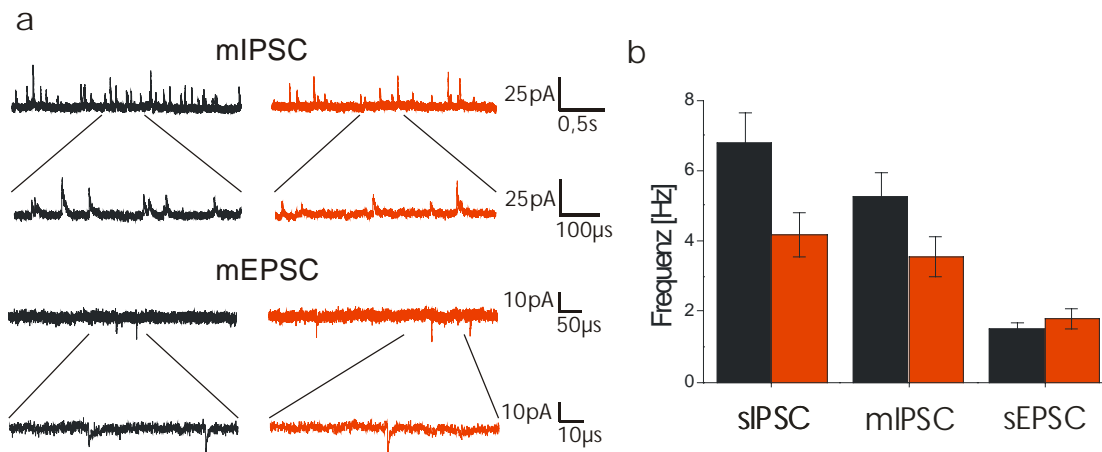


Abb. 15. Frequenz der postsynaptischen Ströme.

(a) Beispielhafte Ausschnitte aus mIPSC- und mEPSC-Aufzeichnungen, Kontrollen in schwarz, Pilocarpin-Gruppe in rot, mit 5x-Vergrößerungsausschnitt. (b) Statistische Auswertung gemittelter sIPSC-, mIPSC- und mEPSC-Frequenzen. Sowohl die sIPSC-, als auch mIPSC-Frequenzen weichen zwischen Kontroll- und epileptischer Testgruppe signifikant voneinander ab ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test). Im Gegensatz zu den exzitatorischen PSC war die Frequenz der inhibitorische PSC in Interneuronen des epileptischen Gewebes deutlich verringert.

3.4.3.1. Verhältnis zwischen mIPSC / mEPSC-Frequenz.

Da aus messtechnischen Gründen der Vergleich von spontanen inhibitorischen und exzitatorischen Potentialen nicht möglich war, wurden hier die mIPSC- und mEPSC-Frequenzen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurden nicht die Mittelwerte der beiden Parameter zueinander ins Verhältnis gesetzt, sondern es wurde für jedes Interneuron das individuelle Verhältnis zwischen mIPSC und mEPSC ermittelt und erst anschließend der Mittelwert der Verhältnisse gebildet. Durch diese Vorgehensweise sollte verhindert werden, dass es zwischen Interneuronen mit starker Innervation und Interneuronen mit weniger starker Innervation zu einer unerwünschten Gewichtung kam. Für die Kontrollgruppe ergab sich so ein mEPSC / mIPSC-Frequenz-Verhältnis von $0,29 \pm 0,04$ (SEM) und in der Pilocarpin-Gruppe von $0,81 \pm 0,25$ (SEM, $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Damit hatte sich bei den CA1-Interneuronen mit Pilocarpin behandelte Tiere die Balance zwischen mIPSC und mEPSC deutlich ($\Delta + 281$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe) zu Gunsten der Exzitation verschoben (Abb. 16a).

Wie aussagekräftig war das mEPSC / mIPSC-Frequenz-Verhältnis? Das Verhältnis mIPSC / sIPSC-Frequenz war zwischen Kontrollgruppe und der Pilocarpin-Gruppe nahezu identisch (Kontrolle: $0,92 \pm 0,12$ SEM; Pilocarpin: $0,91 \pm 0,10$ SEM). Im Kontrollgewebe, wie auch im epileptischen Gewebe schien es bei den untersuchten Interneuronen ein konstantes Verhältnis zwischen mIPSC-Frequenz und sIPSC-Frequenz zu geben (Abb. 16b). Diese Beobachtung war insofern erstaunlich, da die IPSC-Frequenzen innerhalb der Gruppen, wie beschrieben, zum Teil deutlich voneinander abwichen (siehe 3.4.3.). Dass dieses Abweichen trotz Verringerung der IPSC-Frequenzen in Interneuronen Pilocarpin behandelter Tiere im Verhältnis mIPSC / sIPSC-Frequenz zu keinem Unterschied zwischen beiden Testgruppen geführt hatte, zeigte, dass die Verschiebung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation in SRL-Interneuronen Pilocarpin behandelter Tiere, gemessen als mEPSC / mIPSC-Frequenz, nicht durch die Variabilität der SRL-Interneurone beeinflusst wurde.

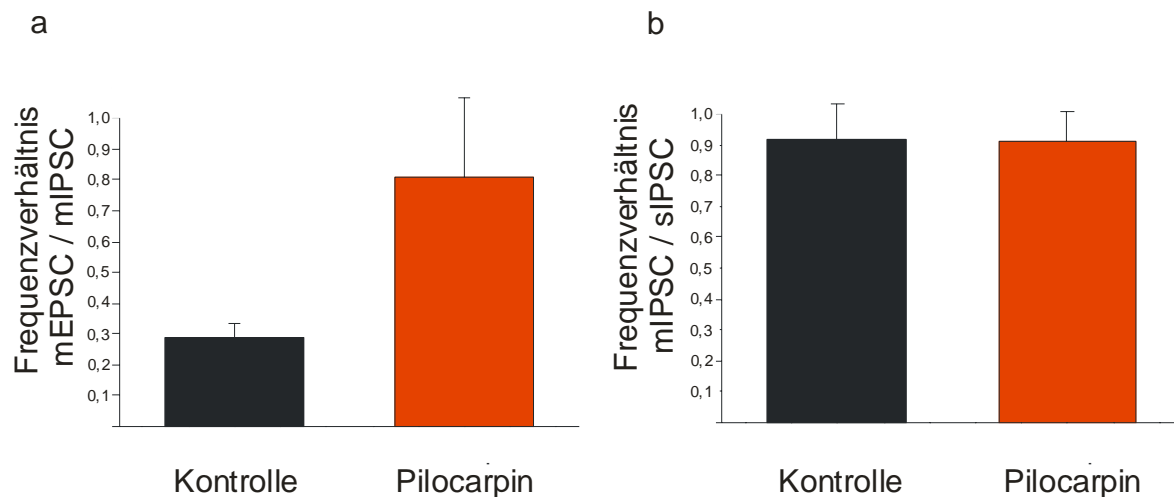


Abb. 16. Balance zwischen Inhibition und Exzitation anhand der PSC-Frequenzen.

a) Das Verhältnis der mEPSC-Frequenz zur mIPSC-Frequenz wich zwischen Kontrollgruppe und epileptischer Gruppe fast um einen Faktor drei voneinander ab ($p < 0,05$, MannWhitney-U-Test). Die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Eingängen war in den Interneuronen aus pathologischem Gewebe deutlich in die Richtung einer verstärkten Exzitation verschoben. **b)** Im Vergleich dazu blieb das Frequenzverhältnis mIPSC / sIPSC zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe nahezu konstant.

3.4.3.2. Kumulative Betrachtung der Frequenz.

Um beurteilen zu können, ob sich die Verringerung der sIPSC- und mIPSC-Frequenz im epileptischen Gewebe homogen über alle Frequenzbereiche erstreckte, wurde die Verteilung der postsynaptischen Ströme nach ihrer Frequenz untersucht. Der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinander folgende PSCs wurde als Inter-Ereignis-Intervall erfasst. Die verschiedenen Inter-Ereignis-Intervalle wurden nach ihrer Größe sortiert und in Gruppen geordnet. Anschließend wurden die Anzahl der PSCs pro Gruppe zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe verglichen. Der Abstand zwischen den Gruppen wurde für sIPSCs und mIPSCs mit

10 ms und bei den mEPSCs mit 40 ms festgelegt. Die zahlenmäßige Stärke jeder Gruppe von Inter-Ereignis-Intervallen wurde in Bezug zur Gesamtzahl aller PSCs gesetzt und die Wahrscheinlichkeit errechnet mit der jedes Inter-Ereignis-Intervall auftrat. Die Wahrscheinlichkeiten aller Gruppen von Inter-Ereignis-Intervallen wurde in einem Histogramm aufgetragen (Abb. 17). Die Festlegung der Inter-Ereignis-Intervalle auf 40 ms bzw. 10 ms diente allein der optimalen Darstellung der kumulativen Diagramme.

In Übereinstimmung mit den gemittelten IPSC-Frequenzen beider Gruppen (siehe 3.4.3), zeigten auch die kumulativen Histogramme eine Veränderung zwischen Pilocarpin- und Kontrollgruppe an. Sowohl für die Inter-sIPSC-, als auch für die Inter-mIPSC-Intervalle war eine Verschiebung der kumulativen Wahrscheinlichkeit der Intervalllänge in der Pilocarpin-Gruppe hin zu längeren Intervallzeiten zu beobachten ($p < 0,001$; Kolmogorov-Smirnov-Z-Test). Besonders im Bereich von $\sim 0,25$ sec. - 0,5 sec. bei der Betrachtung von sIPSCs und $\sim 0,25$ sec. - 1 sec. bei der Betrachtung von mIPSC, wichen die kumulativen Wahrscheinlichkeiten zwischen Pilocarpin- und Kontroll-Gruppe ab. Ein solcher Effekt trat nicht für mEPSC-Intervalle auf. Das Abweichen in der Verteilung der PSC-Frequenzen zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe wurde anhand der relativen Gruppengrößen festgestellt und drückte sich in den kumulativen Histogrammen als Differenz im Kurvenverlauf zwischen den beiden Testgruppen aus (Abb. 17).

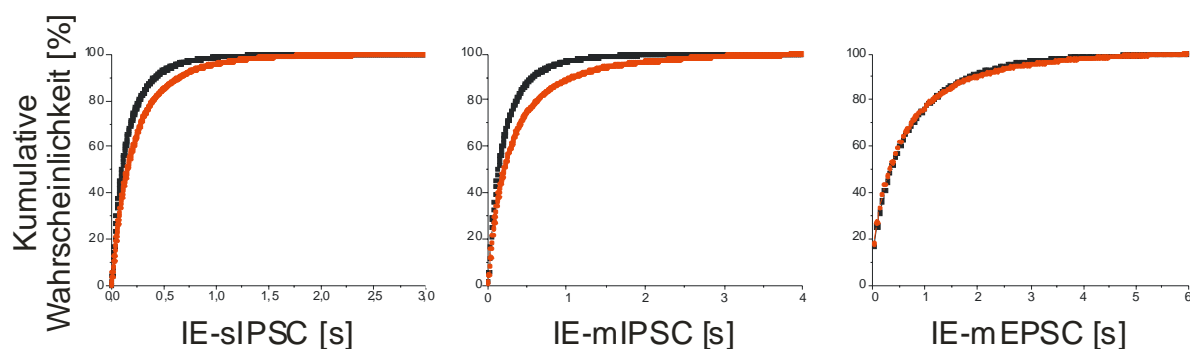


Abb. 17. Kumulative Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Inter-Ereignis-Intervallen.

In rot sind die kumulativen Wahrscheinlichkeiten für PSC-Frequenzen aus epileptischem Gewebe, in schwarz die PSC-Frequenzen aus den Kontrollmessungen dargestellt. Zwischen dem Auftreten postsynaptischer Ströme verstreicht unterschiedlich viel Zeit. Diese Zeit wurde als Inter-Ereignis-Intervall statistisch als kumulative Wahrscheinlichkeit erfasst, also die Wahrscheinlichkeit mit der eine bestimmte Intervalllänge auftritt. Dadurch wurde die Verteilung verschiedener PSC-Intervalle zwischen der Kontrollgruppe und der epileptischen Gruppe möglich. Es zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten inhibitorischer Inter-Ereignis-Intervalle in den Interneuronen aus epileptischem Gewebe bei mIPSCs im Bereich von ca. 0,5 Sekunden, bei sIPSCs im Bereich von ca. 0,4 Sekunden verringert war ($p < 0,001$, Kolmogorov-Smirnov-Z-Test). Die entsprechenden Grafiken (mittlere und linke Grafik) zeigten einen Rechtsschift der Kurve, die die Wahrscheinlichkeit der Inter-Ereignis-Intervalle widerspiegelte. Ein solcher Effekt war bei den Inter-Ereignis-Intervallen der mEPSCs (rechte Grafik) nicht zu beobachten. (IE: Inter-Ereignis-Intervall).

3.4.4. Amplituden der postsynaptischen Ströme.

Die Mittelwerte der IPSC-Amplituden waren deutlich größer als die der mEPSC-Amplituden (Abb. 18). Für alle drei gemessenen Parameter, sIPSCs (Kontrolle: 25,80 pA \pm 2,48 pA SEM; Pilocarpin: 27,29 pA \pm 3,33 pA SEM), mIPSCs (Kontrolle: 19,93 pA \pm 1,72 pA; SEM Pilocarpin: 19,36 pA \pm 1,36 pA SEM) und mEPSCs (Kontrolle: 7,57 pA \pm 0,42 pA SEM; Pilocarpin: 7,00 pA \pm 0,43 pA SEM) wurden keine Unterschiede zwischen Pilocarpin- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Mittelwerts der Amplitudengröße gefunden (jeweils $p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Da sich das Signal-Rauschverhältnis nicht zwischen pathologischem und Kontrollgewebe unterschied (siehe 3.4.2.), stellte sich die oben beschriebene Frequenzverminderung als unabhängig von den unveränderten Amplituden-Mittelwerten der jeweiligen PSCs dar.

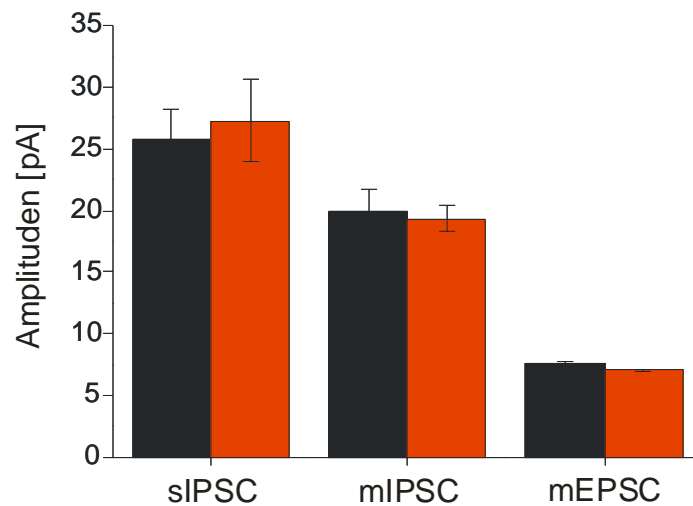


Abb. 18. Amplituden postsynaptischer Ströme.

Inhibitorische PSCs wiesen im Durchschnitt deutlich höhere Amplituden auf als die gemessenen mEPSCs. Die mIPSC-Amplituden, die in Gegenwart von 1 mM Tetrodotoxin aufgezeichnet wurden und als quantale Transmitterfreisetzung beschrieben sind, erreichten im Vergleich zu den sIPSCs einen annähernd ähnlichen durchschnittlichen Amplitudenwert. Während sich inhibitorische und exzitatorische PSCs bezüglich ihrer Frequenz signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe epileptischer Tiere unterschieden, differierte die durchschnittliche Amplitudenstärke kaum zwischen den beiden Testgruppen ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Beobachtung einer Frequenzverminderung bei gleich bleibender Amplitudengröße der IPSCs war bedeutend im Hinblick auf die Beurteilung der Ursachen der beschriebenen Effekte (siehe 4.2.2.). Für die Betrachtung der Amplitudenverhältnisse im Hinblick auf eine veränderte Balance zwischen Inhibition und Exzitation im epileptischen Gewebe wurden, wie schon bei den Frequenzverhältnissen, nicht die Mittelwerte direkt zueinander ins Verhältnis gesetzt, sondern Zelle für Zelle und daraus der Mittelwert errechnet. Auch die Betrachtung der Amplitudenverhältnisse sIPSC / mIPSC (Kontrolle: 41,7 \pm 7,4 SEM; Pilocarpin: 40,1 \pm

3,5 SEM) und mIPSC / mEPSC (Kontrolle: $89,48 \pm 8,39$; Pilocarpin: $73,77 \pm 3,75$ SEM) zeigten kein Abweichen zwischen SRL-Interneuronen aus Kontroll- und epileptischem Gewebe.

3.4.4.1. Kumulative Betrachtung der Amplituden.

Die kumulative Darstellung der Amplituden erfolgte nach demselben Prinzip wie die kumulative Darstellung der Frequenzen (siehe 3.4.3.2.) Die kumulative Verteilung der sIPSC-Amplitudengrößen zeigte im Gegensatz zu den mIPSC- und mEPSC-Amplitudengrößen einen signifikanten Unterschied zwischen Interneuronen aus Kontrollgewebe und epileptischem Gewebe ($p < 0,001$; Kolmogorov-Smirnov-Z-Test). SRL-Interneurone aus mit Pilocarpin behandeltem Gewebe wiesen weniger sIPSCs mit einer Amplitude zwischen 15 – 40 pA auf als SRL-Interneurone aus der Kontrollgruppe. Nach Applikation von TTX war dieser Effekt für die mIPSC-Amplituden nicht mehr feststellbar ($p = 0,61$; Kolmogorov-Smirnov-Z-Test). Das verminderte Auftreten von sIPSCs im Bereich zwischen 15 – 40 pA hatte aber offensichtlich keinen Einfluss auf den Mittelwert der sIPSC-Amplituden (Abb. 19).

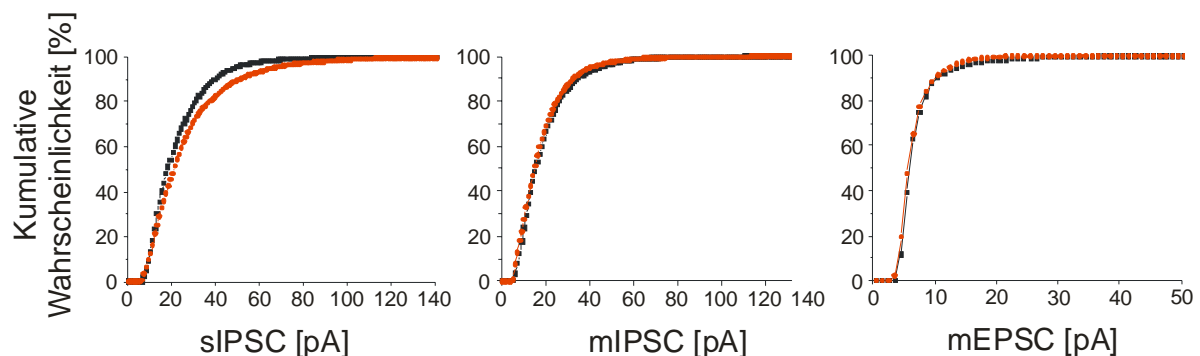


Abb. 19. Kumulative Wahrscheinlichkeit für das Auftreten verschiedener Amplitudengrößen.

In rot die kumulativen Wahrscheinlichkeiten für PSC-Amplituden aus epileptischem Gewebe, in schwarz für die PSC-Amplituden aus den Kontrollmessungen. Die kumulative Betrachtung der PSC-Amplituden zeigte, dass sich lediglich die Verteilung der sIPSC-Amplitudengrößen zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe unterschied (linke Grafik). Ab 15 pA wichen die repräsentativen Kurven für sIPSC-Amplitudengrößen zwischen Kontroll- und Pilocarpingruppe voneinander ab. Das Maximum der Abweichung lag bei 40 pA, danach verringert sich der Abstand der Kurvenverläufe wieder.

Ob das verringerte Auftreten von sIPSC-Amplituden in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe im Bereich zwischen 15 bis 40 pA einen signifikanten Einfluss auf die verminderte sIPSC-Frequenz hatte, konnte nicht festgestellt werden. Die kumulative Darstellung von sIPSC-Frequenzen mit Amplituden zwischen 15 bis 40 pA ($p > 0,05$; Kolmogorov-Smirnov-Z-Test) bestätigte einen solchen Verdacht jedoch nicht.

3.4.5. Kinetische Eigenschaften der postsynaptischen Ströme.

Da sich die Frequenz der inhibitorischen postsynaptischen Ströme bei Interneuronen aus epileptischem Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert zeigte, sollte die Frage geklärt werden, ob PSCs eine veränderte Kinetik aufwiesen. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob sich der Verlust der inhibitorischen Innervation bei SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe auf eine bestimmte Gruppe von PSCs mit einer spezifischen Kinetik zurückführen ließ. Zur Bestimmung der Kinetik der PSCs wurde die Methode der Bestimmung der Halbwertsbreite verwendet. Die Halbwertsbreite ist ein Zeitmaß, welches zwischen Anstieg und Abfall eines PSCs bei halber Amplitude vorliegt. Obwohl die durchschnittliche Halbwertsbreite bei allen gemessenen PSCs der Pilocarpin-Gruppe im Mittel länger war, als bei den Kontrollen, war keine dieser Differenzen signifikant (Abb. 20).

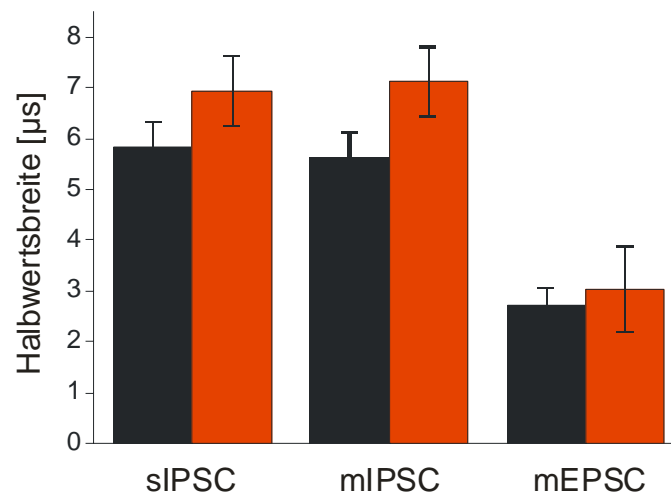


Abb 20. Kinetik inhibitorischer und exzitatorischer postsynaptischer Potentiale.

Die Kinetik der PSPs wurde mit Hilfe der Methode der Messung der Halbwertsbreite analysiert. Grundsätzlich waren EPSPs um ca. einen Faktor zwei kürzer als IPSPs. Bei allen drei Parametern war die Kinetik in den Kontroll-PSPs schneller als in der epileptischen Testgruppe. Dieser Unterschied erwies sich aber als statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

Aufgrund des wesentlich besseren Signal-Rausch-Verhältnisses wurden die Halbwertsbreiten nicht für alle PSCs bestimmt, sondern nur für die jeweils 50 größten PSCs pro Interneuron einer jeden Gruppe. Waren die Amplituden der PSCs sehr klein, verhinderte das Rauschen das Ausmessen der Breite bei halber Amplitudenhöhe. Außerdem hatte die Betrachtung der kumulativen Wahrscheinlichkeiten ergeben, dass die Abweichungen zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe in der Verteilung der Amplitudengröße sich nicht auf die PSCs mit geringer Amplitude bezog (siehe 3.4.4.1.).

Die Halbwertsbreiten betragen für sIPSCs der Kontrollgruppe $5,81 \text{ ms} \pm 0,52 \text{ ms}$ (SEM) und: $6,94 \text{ ms} \pm 0,69 \text{ ms}$ (SEM) bei der Pilocarpin-Gruppe ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Für mIPSC betrug die Halbwertsbreite bei der Kontrollgruppe $5,62 \text{ ms} \pm 0,50 \text{ ms}$ (SEM) und $7,11 \text{ ms} \pm 0,68 \text{ ms}$ (SEM) bei der Pilocarpin-Gruppe ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Bei mEPSC betrug die Halbwertsbreite in der Kontrollgruppe $2,73 \text{ ms} \pm 0,32 \text{ ms}$ (SEM) und $3,03 \text{ ms} \pm 0,83 \text{ ms}$ (SEM) bei der Pilocarpin-Gruppe ($p > 0,05$ Mann-Whitney-U-Test). Zusammenfassend beschrieben hatte die elektrophysiologische Charakterisierung von SRL-Interneuronen von Kontroll- und mit Pilocarpin behandelten Ratten eine Reduktion der inhibitorischen Innervation durch eine Verminderung der sIPSC- und mIPSC-Frequenzen aufgezeigt. Die mEPSC-Frequenzen waren unverändert zwischen beiden Gruppen. Die Balance der inhibitorischen und exzitatorischen Innervation hatte sich in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe zugunsten der Exzitation verschoben. Die AP-Frequenz hatte sich in plausibler Übereinstimmung mit der verminderten Inhibition in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe verdoppelt. Neurone, die von SRL-Interneuronen inhibiert werden, erfahren im epileptischen Gewebe (bezogen auf SRL-Interneurone) eine verstärkte Inhibition.

3.4.6. Morphologische Charakterisierung der SRL-Interneurone.

In alle elektrophysiologisch charakterisierte Zellen wurde für eine anschließende morphologische Untersuchung Neurobiotin appliziert (siehe 2.2.). Dies ermöglichte eine spätere dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen (Abb. 21). Zum einen sollte natürlich geklärt werden um welchen Typus von Interneuron es sich jeweils handelte - Ziel war es eine möglichst homogene Gruppe von Kontroll-Interneuronen und Interneuronen aus epileptischem Gewebe miteinander zu vergleichen. Zum anderen sollte in der morphologischen Studie auch eine Synapsenzählung stattfinden, die es erlaubte Veränderungen in der Balance zwischen Inhibition und Exzitation im epileptischen Gewebe mit der Synapsendichte zu korrelieren. Aber sowohl die Behandlung des untersuchten Gewebes mit den typischen, Interneurone charakterisierenden Antikörper für kalziumbindende Proteine, Parvalbumin und Calbindin, als auch die Behandlung mit GABA- und Glutamatantikörpern konnte nicht systematisch durchgeführt werden. Die Penetrationseigenschaften der Antikörper erwiesen sich für das adulte und pathologische Gewebe als teilweise nicht ausreichend. Der Erfolg der Antikörper-Kopplung hing davon ab, wie tief die entsprechenden Zellen in den fixierten Gewebeschnitten lokalisiert waren. In einigen Fällen war gar keine Antikörper-Markierung möglich, in anderen Fällen waren lediglich Teile des Soma oder der Dendriten mit Antikörper markiert. Bezüglich der

Identifikation der SRL-Interneurone konnte letztlich nur grundlegend verifiziert werden, ob sich alle untersuchten Interneurone tatsächlich in der avisierten Grenzschicht, Stratum radiatum / Stratum lacunosum moleculare befanden. Interneurone die zu weit in Richtung Stratum pyramidale (radial) oder CA3 bzw. Subikulum (horizontal) lokalisiert waren, wurden nicht charakterisiert. Die Identifikation von Interneuronen durch Antikörper gegen den inhibitorischen Transmitter GABA zeigte, dass in allen Fällen, in denen die Penetrationseigenschaften des Antikörpers ausreichend waren, die entsprechenden Zellen auch immer GABA-positiv waren. Darüber hinaus fand eine morphologische Charakterisierung der Interneurone auf Grundlage einer Sholl-Analyse statt (siehe 2.1.7).

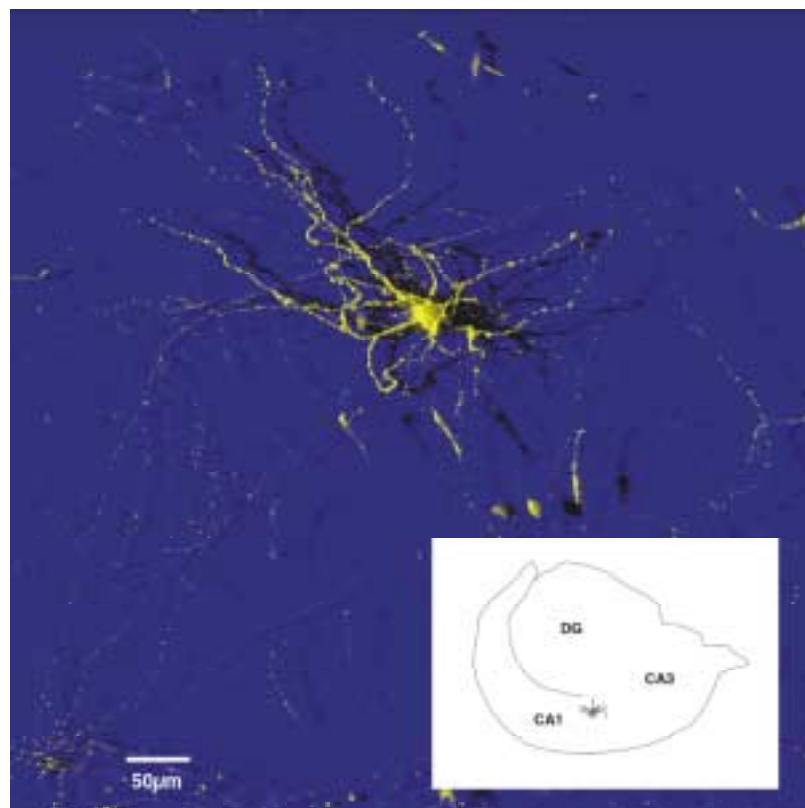


Abb. 21. Dreidimensionale Rekonstruktion eines Interneurons.

Dreidimensionale Rekonstruktion eines Interneurons aus dem Stratum lacunosum moleculare der Hippocampus Region CA1. Gelb gefärbt sind alle Kompartimente in die der intrazellulär applizierte Farbstoff Neurobiotin gelangte. Deutlich zu erkennen sind das Zellsoma und die von Varikositäten begleiteten dendritischen Verzweigungen. Varikositäten treten besonders ausgeprägt in epileptischem Gewebe auf und zeigen sich als Verdickungen entlang der Dendriten. Das Axon ist nicht eindeutig zu identifizieren. Das Einschaltbild rechts-unten zeigt die Lokalisation des Interneurons im Hippocampus (**DG**: Gyrus dentatus, **CA1/3**: Cornu amonis).

Bei jeweils elf Interneuronen der Kontrollgruppe und zwölf Interneuronen aus der Gruppe Pilocarpin behandelte Tiere, waren die Durchdringung mit Neurobiotin und die anschließende Färbung ausreichend, um eine morphologische Analyse durchzuführen. Wie erwartet, konnten diese Zellen tatsächlich in der Grenzschicht zwischen Stratum radiatum und

Stratum lacunosum moleculare, innerhalb von CA1, lokalisiert werden. Der relative Abstand der Zellkörper dieser Interneurone zum Stratum pyramidale betrug in der Kontrollgruppe durchschnittlich $347 \mu\text{m} \pm 38 \mu\text{m}$ (SEM) und in der Gruppe Pilocarpin behandelte Tiere $368 \mu\text{m} \pm 34 \mu\text{m}$ (SEM). Diese Differenz war nicht signifikant ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Grundsätzlich zeigten alle Neurone ein dendritisches Verzweigungsmuster, welches entweder dem multipolaren Zelltypus oder dem Korbzell-Typus entsprach (Kontrolle: 8 multipolare Zellen, 2 Korbzellen; Pilocarpin: 7 multipolare, 3 Korbzellen). Die Dendritenbäume der Zellen wiesen zwischen drei bis acht somanahe, primäre Verzweigungen auf (Kontrolle: $3,9 \pm 0,9$ SEM; Pilocarpin: $5,1 \pm 1,3$ SEM).

Tab. 3. Die Sholl-Analyse anhand einer Beispielzelle.

Repräsentatives Beispiel der Sholl-Analyse für eine Zelle aus Pilocarpin-behandeltem Gewebe. Ausgehend vom Zellsoma als Mittelpunkt wurden 12 Kreise unterschiedlicher Radien angelegt. Diese Anordnung wurde wiederum in Sektoren unterteilt, die der Einfachheit halber mit den Kürzeln für die Himmelsrichtungen angekürzt wurden. Die Ausrichtung Norden erfolgte nach dem Stratum pyramidale, die Ausrichtung Süden nach dem Gyrus dentatus. Die Orientierung Westen verweist in die Richtung CA3, die Orientierung nach Osten verweist in die Richtung entorhinaler Cortex. Gezählt wurden alle sichtbaren Überschneidungen der Dendriten einer Zelle mit den jeweiligen Sektorgrenzen. Auf diese Weise entstand für jede Zelle ein typisches dendritisches Verzweigungsmuster.

	N	NO	O	SO	S	SW	W	NW	Summe
50 μm	2	0	2	1	2	0	0	0	7
100 μm	2	1	0	3	2	0	1	0	9
150 μm	2	3	1	2	3	0	2	2	15
200 μm	4	2	3	2	3	0	3	2	19
250 μm	2	2	1	2	4	0	4	0	15
300 μm	1	2	1	2	4	1	5	1	17
350 μm	1	4	0	1	4	1	6	0	17
400 μm	1	3	0	1	4	1	7	0	17
450 μm	1	2	0	1	3	1	6	0	14
500 μm	2	0	0	2	4	1	5	0	14
550 μm	2	0	0	2	3	1	3	0	11
600 μm	2	0	0	1	1	0	1	0	5
Summe	22	19	8	20	37	6	43	5	160

Weder für die Interneurone aus der Kontrollgruppe noch für solche aus der Pilocarpin-Gruppe konnte ein einheitliches, zellspezifisches Verzweigungsmuster der Dendriten unter Berücksichtigung aller acht Achsen festgestellt werden. Eine vornehmlich horizontale

Verzweigung der Dendriten, wie es in anderen Publikationen postuliert wurde (Kunkel et al., 1988; Lacaille et al., 1988b; Williams et al., 1994; Freund et al., 1996), konnte hier weder für Interneurone aus Kontroll- noch epileptischem Gewebe ermittelt werden. In unterschiedlicher Gewichtung zeigten die SRL-Interneurone dendritische Verzweigungen in allen acht vorgegebenen Sektoren. Betrachtete man allerdings lediglich horizontale Verzweigungen (Achsenrichtung: CA3-CA1 - entorhinaler Cortex, bzw. Nord-Süd) und radiäre Verzweigungen (Achsenrichtung: Stratum oriens – Stratum lacunosum moleculare, bzw. Ost-West) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Testgruppen (siehe Tab. 4).

Tab. 4. Prozentuale Verteilung der horizontalen und radialen Abzweigungen in beiden Testgruppen.

Betrachtete man lediglich diejenigen Verzweigungspunkte nach der Sholl-Analyse, welche eindeutig horizontal oder radial vom Soma abzweigten, konnte festgestellt werden, dass Kontrollzellen dominant radiale dendritische Verzweigungen aufwiesen, während bei Zellen aus Pilocarpin-behandelten Tieren die horizontalen Verzweigungen dominierten. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant ($p = 0,0045$ Mann-Whitney-U-Test: MWU-Test).

	Horizontale Verzeigungen		Radiale Verzweigungen	
	Kontrolle	Pilocarpin	Kontrolle	Pilocarpin
Mittelwert in %	38,63%	69,88%	62,20%	30,12%
Gruppenstärke	11	12	11	12
Standardabweichung.	± 22,80%	± 18,76%	± 22,80%	± 18,76%
Standardfehler	± 6,88%	± 5,42%	± 6,88%	± 5,42%
Minimum	9,52%	40,0%	16,33%	9,88%
Maximum	83,67%	90,12%	90,48%	60,0%
MWU-Test	$p=0,0045$			

Während in der Kontrollgruppe sowohl Interneurone mit hauptsächlich horizontal verlaufenden Dendritenbäumen wie auch Interneurone mit hauptsächlich radiär verlaufenden Dendritenbäumen vorkamen, zeigte sich das dendritische Verzweigungsmuster von Interneuronen aus mit Pilocarpin behandelten Tieren wesentlich uniformer. Zehn von zwölf Zellen aus der pathologischen Gruppe zeigten überwiegend eine horizontale Ausrichtung der Dendriten und auch bei den beiden anderen Zellen waren immerhin noch 40% der dendritischen Verzweigungen horizontal ausgerichtet (siehe Tab. 4). Im Durchschnitt verliefen $69,88 \% \pm 5,42 \%$ (SEM) der dendritischen Verzweigungen im pathologischen Gewebe horizontal, in der Kontrollgruppe jedoch nur $38,36 \% \pm 6,88 \%$ (SEM; $p = 0,005$; Mann-Whitney-U-Test). Fasern die keiner der beiden beschriebenen Achsenrichtungen

zuzuordnen waren, wurden hierbei nicht mitgewertet, sowie diejenigen Fasern die in Richtung der Z-Achse ausliefen und im Gewebeschnitt nicht erfasst werden konnten.

Für alle acht Verzweigungsrichtungen der Sholl-Analyse wurden in der Kontrollgruppe durchschnittlich $101,4 \pm 24,4$ (SEM) dendritische Verzweigungspunkte erfasst, bei der Gruppe Pilocarpin-behandelter Tiere fiel dieser Wert mit $137,8 \pm 31,6$ (SEM) signifikant höher aus ($p < 0,0045$, Mann-Whitney-U-Test). Die erhöhte Anzahl dendritischer Verzweigungen bei Interneuronen aus pathologischem Gewebe war ausschließlich auf einen Anstieg an horizontalen Verzweigungen im pathologischen Gewebe zurückzuführen, da der Anteil der sonstigen Verzweigungen zwischen beiden Testgruppen kaum differierte (Kontrolle 50,5 %, Pilocarpin 49,4 % aller Verzweigungen (Tab. 5).

Tab. 5. Anteil der horizontalen und radialen dendritischen Verzweigungen in Prozent bezogen auf die absolute Anzahl der Verzweigungen.

Die absolute Anzahl aller dendritischen Verzweigungen unterschied sich zwischen den beiden Testgruppen signifikant (Kontrolle 101,4 versus Pilocarpin 137,8, $p < 0,0045$; Mann-Whitney-U-Test). Da die hier als andere Verzweigungen beschriebenen Verzweigungen – solche, die nicht eindeutig dem horizontalen oder radialen Typus zuzuordnen waren - sich nahezu gar nicht unterscheiden (Kontrolle 50,5 % versus Pilocarpin 49,4 %), kann der Zuwachs an Verzweigungen im pathologischen Gewebe nur auf das Anwachsen der horizontalen Verzweigungen zurückgeführt werden.

	Kontrolle		Pilocarpin	
Summe aller Verzweigungen	101,4		137,8	
Horizontale Verzweigungen	18,55	18,29 %	51,90	37,66 %
Radiale Verzweigungen	31,64	31,20 %	17,83	12,94 %
Andere Verzweigungen	51,21	50,50 %	68,07	49,40 %

Dendritische Verzweigungen wurden nicht nur unter Berücksichtigung der Orientierung ausgewertet, sondern auch nach Abstand zum Soma. Der Maximalabstand (300 μM) wurde in sechs weitere Abstände à 50 μm unterteilt. Für Abstände über 300 μM war die Zahl der dendritischen Verzweigungspunkte zu gering, um statistische Aussagen bezüglich einzelner Radien zu treffen. Interneurone aus epileptischem Gewebe zeigten für alle ausgewerteten Radien mehr Verzweigungspunkte als Interneurone aus Kontrolltieren (Abb. 21). Allerdings waren diese Abweichungen für keinen einzelnen Radius signifikant (jeweils $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Betrachtete man allerdings die Tendenz für alle Radien ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test).

Unabhängig vom jeweiligen dendritischen Verzweigungsmuster der untersuchten Zellen, konnte mindestens jeweils pro Zelle eine dendritische Verzweigung festgestellt werden, die

bis ins Stratum oriens zog. In fünf von zehn Kontrollzellen und drei von zehn Zellen der Pilocarpin-Gruppe konnte ein dendritischer Ausläufer bis hin ins Stratum pyramidale des Gyrus dentatus verfolgt werden. Das Axon oder die Axonverzweigungen konnten weit weniger gut verfolgt werden. Insoweit man überhaupt eine Aussage treffen konnte, war es die, dass die Axone meist horizontal ausliefen, sich aber sehr selten so weit verfolgen ließen, dass man eine statistisch relevante Aussage darüber hätte treffen können. In zwei Fällen wurden Axonausläufer in den Gyrus dentatus gefunden. In vier Fällen durchzogen die Axone CA1 bis zum Stratum oriens. Die Beschreibung der dendritischen und soweit vorhanden axonalen Neuritenverläufe der SRL-Interneurone deckt sich im Gegensatz zur Orientierung der Dendriten mit den Verhältnissen, die von anderen Autoren gefunden wurden (Kunkel et al., 1988; Lacaille et al., 1988b; Williams et al., 1994; Freund et al., 1996).

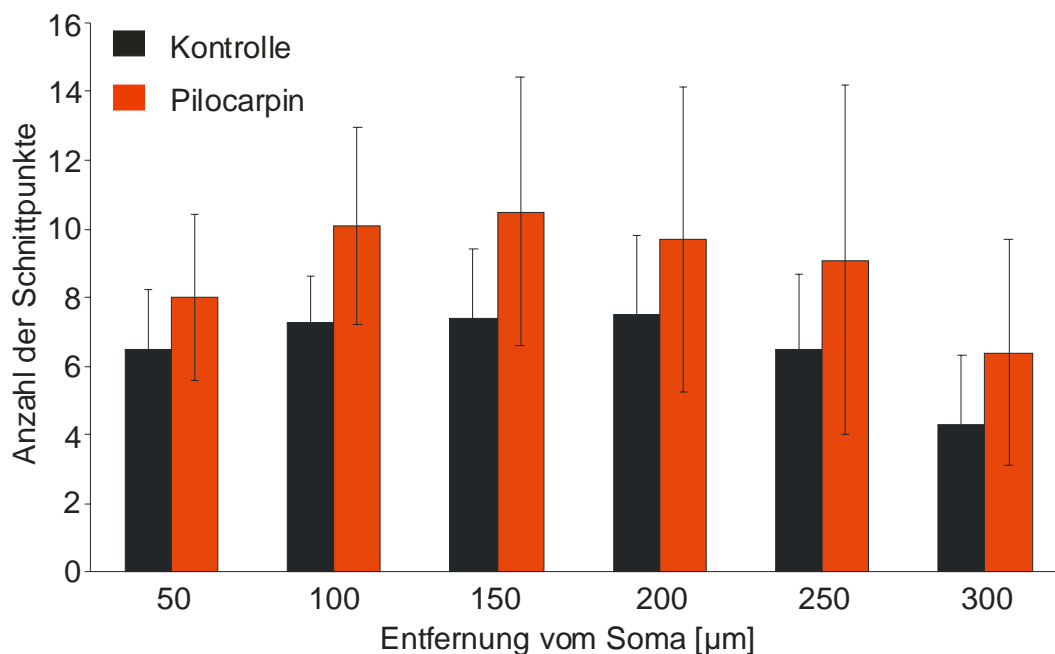


Abb. 22. Auswertung der Sholl-Analyse nach Radien.

Neurobiotin markierte Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Laser-Mikroskops identifiziert. An die identifizierten Zellen wurde eine Kreisschablone angelegt mit unterschiedlichen Kreisradien, anschließend wurden dendritische Schnittpunkte innerhalb der Kreisradien gezählt. Für keinen der Radien zwischen 50 µm – 300 µm konnte ein signifikanter Unterschied im dendritischen Verzweigungsmuster zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Pilocarpin behandelter Tiere festgestellt werden ($p > 0,05$ für alle einzelnen Radien, Mann-Whitney-U-Test). Die Tendenz innerhalb der Gruppe Pilocarpin-behandelter Tiere zu einer erhöhten Anzahl an dendritischen Verzweigungen war unter Einbeziehung aller Radien jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test).

Bei einigen Zellen konnte eine Farbstoffkopplung festgestellt werden. Das heißt, dass der Farbstoff Neurobiotin nicht nur in der Zelle sichtbar wurde, in die er auch appliziert worden war, sondern noch in mindestens einer weiteren umliegenden Zelle. In diesen Fällen war es

offensichtlich zu einer spezifischen interzellulären Farbstoff-Diffusion gekommen. Dies wiederum war nur dann möglich, wenn sich zwei oder mehrere Zellen gemeinsame, abgeschlossene Membrankompartimente teilten, oder über sogenannte „Gap-junctions“ miteinander verbunden waren. Auch bezüglich des Phänomens Farbstoffkopplung zeigte sich ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe von Zellen aus Pilocarpin-behandelten Tieren. In der Kontrollgruppe ließen sich vier Farbstoffkopplungen beobachten, davon zwei mit putativen Interneuronen im Stratum radiatum und zwei mit Pyramidenzellen im Stratum pyramidale. In der Gruppe der Zellen aus Pilocarpin-behandelten Tieren zeigten 12 Zellen das Phänomen Farbstoffkopplung, in neun Fällen mit putativen Interneuronen des Stratum radiatum, in drei Fällen mit Pyramidenzellen aus der Pyramidenzellschicht. Signifikant unterschiedlich war die erhöhte Farbstoffkopplung bei Zellen aus epileptischem Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings nicht ($p > 0,05$, Fisher's Test oder Chi-Quadrat-Test).

3.4.7. Korrelation der elektrophysiologischen Daten mit den morphologischen Daten.

Durch die elektrophysiologische Ableitung von SRL-Interneuronen wurden zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe signifikante Unterschiede in A) der AP-Frequenz, B) der sIPSC-Frequenz und C) der mIPSC-Frequenz gefunden. Die drei prominentesten Unterschiede zwischen den beiden Testgruppen aus der morphologischen Untersuchung waren a) die Anzahl der dendritischen Schnittpunkte nach Sholl-Analyse insgesamt b) die Anzahl dendritischer Schnittpunkte für alle untersuchten Auswertungsradien und c) der Prozentsatz radialer / horizontaler Schnittpunkte. Somit ergaben sich dreimal drei, also neun Korrelationspaare. Für jede Zelle wurde ein Punktepaar in einem Koordinatensystem erzeugt, dass sich beispielsweise aus AP-Frequenz (x-Wert) und Anzahl der Verzweigungspunkte nach Sholl-Analyse (y-Wert) zusammensetzte (Abb. 23). Durch die Punktepaare aller Zellen wurde anschließend eine Regressionsgerade (minimale Abstandsquadrate) gelegt. Das Ausmaß der jeweiligen Korrelation wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Spearman-Korrelations-Koeffizienten (r) bestimmt. Für keines der neun Korrelationspaare konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Morphologie und Elektrophysiologie festgestellt werden (jeweils $p > 0,05$; Wilcoxon-Test, Tab. 5). Somit konnte auch kein direkter Zusammenhang zwischen der pathologisch verminderten Inhibition und dem pathologisch veränderten Dendritenmuster gefunden werden.

Innerhalb der morphologisch signifikanten Abweichungen führte eine Korrelation der horizontalen / radialen Verzweigungsmuster mit der Gesamtzahl der Verzweigungen bei den

Interneuronen aus der Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Ergebnis ($r = 0,15$; $p = 0,33$; Wilcoxon-Test). Bei Interneuronen aus epileptischem Gewebe ergab sich allerdings ein signifikanter Zusammenhang zwischen den genannten Parametern ($r = 0,61$; $p = 0,02$; Wilcoxon-Test).

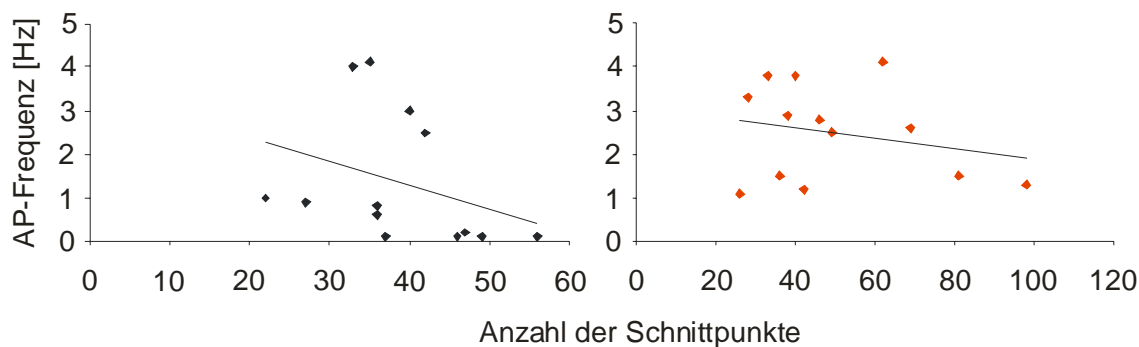


Abb. 23. Korrelation der morphologischen und elektrophysiologischen Befunde.

Morphologische und elektrophysiologische Unterschiede zwischen Kontrollgewebe und mit Pilocarpin behandeltem Gewebe wurden korreliert. Die nicht signifikante Korrelation zwischen beiden Testgruppen in der AP-Frequenz (y-Achse) mit der Anzahl dendritischer Verzweigungen (x-Achse) ist beispielhaft dargestellt. Der Spearman Korrelationskoeffizient betrug für die Kontrollgruppe $r = -0,64$ und für die Gruppe epileptischer Tiere $r = -0,09$ ($p > 0,05$; Wilcoxon Test).

Die signifikante Zunahme dendritischer Verzweigungen bei SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe (siehe 3.4.6.) betraf hauptsächlich horizontale Verzweigungen. Dieser Befund zeigte, dass das pathologische Auswachsen und Verzweigen der Dendriten von SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe nicht zufällig und in alle Richtungen gleichmäßig erfolgte, sondern eine Vorzugsrichtung besaß.

Tab. 6. Korrelationskoeffizienten für die prominentesten Parameter bezüglich der gefundenen Unterschiede aus elektrophysiologischer und morphologischer Untersuchung von Interneuronen aus Kontrollgewebe und epileptischem Gewebe.

Um zu entscheiden, ob es einen direkten, linearen Zusammenhang zwischen den mittels Elektrophysiologie festgestellten Unterschieden zwischen Interneuronen aus Kontrollgewebe und dem epileptischen Gewebe und den Unterschieden zwischen beiden Testgruppen nach der morphologischen Sholl-Analyse gab, wurden insgesamt dreimal drei Parameter korreliert. A = Aktionspotentialfrequenz, B = sIPSP-Frequenz, C = mIPSP-Frequenz, a = Gesamtzahl dendritischer Schnittpunkte, b = Anzahl der Schnittpunkte nach Sholl-Auswertungsradien und c = Prozentsatz radialer / horizontaler Schnittpunkte. Für jede Korrelation wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) ermittelt und auf Signifikanz getestet. Auf der Basis der linearen Korrelation konnte kein direkter Zusammenhang zwischen morphologisch und elektrophysiologisch evaluierten Unterschieden zwischen beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden.

	A-a	A-b	A-c	B-a	B-b	B-c	C-a	C-b	C-c
Kontrolle (r)	- 0,64	0,18	- 0,09	0,014	- 0,02	0,07	0,01	0,01	- 0,22
Pilocarpin (r)	- 0,09	0,001	- 0,02	0,016	0,01	0,10	0,03	0,03	- 0,20
Wilcoxon-Test	$p > 0,05$								

Der Umstand, dass für keinen der untersuchten Parameter ein Korrelationspaar zwischen elektrophysiologische signifikanten und morphologisch signifikanten Abweichungen zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe gefunden werden konnte deutet darauf hin, dass die entsprechenden pathologischen Mechanismen unabhängig voneinander abliefen. Dass für die elektrophysiologisch ermittelten Abweichungen zwischen beiden Testgruppen, also insbesondere für die AP-Frequenz korreliert mit der sIPSP / mIPSP-Frequenz, keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, wurde als Hinweis gewertet, dass sich eine verminderte inhibitorische Innervation in einzelnen Interneuronen nicht linear in einer erhöhten AP-Frequenz widerspiegelte. Die negative Korrelation zwischen pathologisch erhöhter AP-Frequenz und pathologisch verminderter Inhibition zeigte des Weiteren, dass die beschriebenen pathologischen Veränderungen erst auf der Netzwerkebene zu signifikanten Abweichungen zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe führten. Diese Feststellung spielte bei der Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse eine bedeutende Rolle.