

6. Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wurde nach Veränderungen in der Balance zwischen Inhibition und Exzitation im chronisch epileptischen Gewebe von Ratten gesucht. Als Epilepsie-Modell wurde das Pilocarpin-Modell für Temporallappenepilepsie verwendet. Die Arbeit bestand aus zwei Teilen. Zuerst wurde die Hypothese überprüft, wonach es im epileptischen Gewebe zu einer pathologisch veränderten Funktion des GABA-Transports kommen könnte, mit Folgen für die phasische und tonische GABAerge Inhibition. An CA1-Pyramidenzellen und Körnerzellen des Gyrus dentatus wurden Ganzzelleableitungen durchgeführt und pharmakologisch isolierte, GABA_A-Rezeptor vermittelte Chloridströme gemessen. Zur Messung der phasischen GABAergen Komponente wurde die Transmission von GABA elektrisch stimuliert. Zur Messung der tonischen GABAergen Komponente wurde 10 μ M GABA appliziert. Anschließend wurde jeweils der dominierende GABA-Transporter GAT-1 mit Tiagabin blockiert. Eine pathologische Veränderung der Kontrolle der extrazellulären GABA-Konzentration konnte in der hier vorgestellten Arbeit nicht bestätigt werden. Sowohl die phasische als auch die tonische Komponente der GABAergen Inhibition erwiesen sich im epileptischen Gewebe unverändert im Vergleich zum Kontrollgewebe. Die Blockade von GAT-1 durch Tiagabin führte weder bei stimulierter GABAerger Transmission, noch bei der Applikation von GABA ins Gewebe, zu einem signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe, in der postsynaptisch gemessenen Antwort auf GABA. Somit wurde für das epileptische Gewebe keine veränderte Effizienz in der GABA-Transport-Funktion und, in Zusammenhang mit GAT-1, keine pathologische Veränderung der Inhibition gefunden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden nicht-rekurrent mit exzitatorischen Neuronen verbundene Interneurone untersucht. Die Besonderheit dieser Interneurone besteht darin, dass eine veränderte Balance zwischen Inhibition und Exzitation in diesen Interneuronen nicht durch direkte Rückkopplung der afferenten Neurone reguliert werden kann. Eine veränderte Inhibition in pathologischen neuronalen Netzwerken wird als Ursache für die Hyperexzitabilität von Nervengewebe während epileptischer Anfälle diskutiert. In der hier vorgestellten Arbeit wurden CA1-Interneurone aus der Grenzschrift zwischen Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare (SRL-Interneurone) elektrophysiologisch und morphologisch charakterisiert. Die AP-Frequenz der SRL-Interneurone wurde im „cell-attached“-Modus aufgezeichnet. In Ganzzelleableitungen wurde die Frequenz, Amplitude und Halbwertsbreite von IPSP`s und EPSP`s bestimmt und Neurobiotin als Zellmarker in die

SRL-Interneurone appliziert. Anschließend wurde das Gewebe fixiert und die entsprechenden Interneurone mittels konfokaler Mikroskopie dreidimensional rekonstruiert. Durch Sholl-Analyse wurde das dendritische Verzweigungsmuster der SRL-Interneuronen ausgewertet. Tatsächlich zeigten SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe eine signifikant verringerte Frequenz in ihrer inhibitorischen Innervation. Die exzitatorische Innervation der SRL-Interneurone zeigte weder in der Frequenz noch in der Amplitude einen Unterschied zwischen beiden Testgruppen. In Übereinstimmung mit der verminderten inhibitorischen Innervation wurde eine Verdopplung der AP-Frequenz in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe festgestellt. Die Kinetik der IPSP's war zwischen beiden Testgruppen unverändert. Zusammen mit der ebenfalls verminderten mIPSP-Frequenz sprechen die Befunde gegen eine postsynaptische Ursache der Verminderung der inhibitorischen Innervation in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe. Eine mögliche präsynaptische Ursache der verringerten inhibitorischen Innervation der SRL-Interneurone im epileptischen Gewebe könnte im selektiven Absterben afferenter Interneurone liegen. Pathologischer Zelltod ist ein Bestandteil des Pilocarpin-Modells und wurde hier durch eine abschätzende Zellzählung bestätigt. Der Zelltod im epileptischen Gewebe wird häufig von „sprouting“-Prozessen begleitet. Eine signifikante Veränderung der dendritischen Verzweigungsmuster von SRL-Interneuronen wurde in der vorliegenden Arbeit durch morphologische Untersuchungen gefunden. SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe wiesen signifikant mehr dendritische Verzweigungen auf, wobei sich das Verzweigungsmuster zu einem dominierend horizontalen Verzweigungsmuster der Dendriten im epileptischen Gewebe veränderte. Eine Abschätzung der Folgen der beschriebenen Veränderungen in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe konnte nicht vorgenommen werden. Die beschriebenen „sprouting“-Prozesse lassen eine veränderte, nicht mehr mit dem gesunden Gewebe vergleichbare Konnektivität im Hippocampus Pilocarpin behandelte Tiere erwarten. Um einen Zusammenhang zwischen pathologisch veränderter Konnektivität und Hyperexzitabilität herstellen zu können, bedarf es weiterer Erforschung der hippocampalen Architektur in chronisch epileptischem Gewebe.

Summary.

In this study alterations in the balance between inhibition and excitation in chronic epileptic tissue from rats were investigated. The pilocarpine model was used as a model for temporal lobe epilepsy. The study contained two parts. First, the hypothesis of an altered function of GABA-transport in epileptic tissue was examined with respect to its consequences for phasic and tonic GABAergic inhibition, respectively. Whole-cell patch-clamp recordings were

performed in CA1 pyramidal cells and dentate gyrus granule cells and pharmacological isolated, GABA_A-receptor dependent chloride currents were measured. The phasic GABAergic component was measured by electrical stimulation of inhibitory afferents. The tonic GABAergic component was measured by application of 10 μ M GABA to the bath-solution. Subsequently the dominant GABA-transporter GAT-1 was blocked by tiagabin. In this study a pathological change in the control of extracellular GABA-concentration could not be confirmed. The phasic as well as the tonic component of GABAergic inhibition turned out to be unchanged in epileptic tissue as compared to control tissue. Hence, the study revealed no hints towards a functionally impaired GABA uptake system in chronic temporal lobe epilepsy.

In the second part of the study alterations in the network integration of inhibitory interneurons in epileptic tissue were investigated. Recordings were performed from putative GABAergic neurons in stratum radiatum which are not involved in recurrent inhibitory loops in CA1 (feedforward inhibitory neurons). Thus, an altered balance between inhibition and excitation in these interneurons will not be automatically compensated by altered feedback from excitatory cells. In order to search for pathological alterations in inhibitory circuitry, CA1 interneurons at the border between stratum radiatum und stratum lacunosum moleculare (SRL-interneurons) were characterized electrophysiologically and morphologically. In cell-attached recordings, action potential-frequency of SRL-interneurons was doubled in interneurons from chronically epileptic tissue. In whole-cell recordings the frequency, amplitude und half-width of IPSCs and EPSCs were assessed and the cells were filled with neurobiotin for subsequent staining.

SRL-interneurons from epileptic tissue showed a significant decrease in the frequency of spontaneous and miniature inhibitory currents. The excitatory synaptic activity was unaltered in pilocarpin-treated animals. These alterations may explain the increased excitability of the cells observed in recordings of spontaneous action potentials. The kinetics of the IPSCs remained unchanged between both tested groups of animals. Together with the decreased mIPSC-frequency, this findings points towards a decreased inhibitory innervation of SRL-interneurons in epileptic tissue. A possible reason for the diminished inhibitory innervation might be a selective cell-death of afferent interneurons in epileptic tissue. Pathological cell-death is a major symptom in the pilocarpine-model, and was confirmed in this study by estimated cell-counting. Cell-death in epileptic tissue is often accompanied by sprouting processes. In this study a significant alteration in the dendritic branching patterns of SRL-interneurons was detected by morphological investigation. SRL-interneurons from epileptic

tissue showed more dendritic branching and the dendric orientation changed to a horizontal domination. An estimation of the consequences of the alterations in SRL-interneurons in epileptic tissue was not possible, because of the described sprouting-prozesses and the changed connectivity of hippocampal epileptic and hippocampal control tissue. Therefor, more research in the field of hippocampal archtitecur in chronic epileptic tissue is necessary.