

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

DISSERTATION

Blut-Hirn-Schranken-Störung und epileptiforme Aktivität *in vitro*.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Friederike Nichtweiß

aus Heppenheim (Bergstrasse)

Datum der Promotion: 14.09.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt

1.1. Deutsche Version.....	5
1.2. English Version.....	6

2. Einleitung

2.1. Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....	8
2.2. Epilepsie.....	11
2.3. Epilepsie und Blut-Hirn-Schranken-Störung.....	19
2.4. Der entorhinale Cortex und Epilepsie.....	20
2.5. Der entorhinale Cortex und cholinerge Dysfunktion.....	23
2.6. Arbeitshypothesen.....	25

3. Material und Methoden

3.1. Zur Wahl der Methodik	26
3.2. Präparation der Tiere und Gehirnschnitte.....	26
3.3. Chemikalien und Lösungen.....	28
3.4. Elektrophysiologie.....	28
3.5. Statistik.....	30
3.6. Versuchsaufbau.....	31
3.6.1 Kontrollgruppe.....	31
3.6.2 Präinkubation in Testlösungen und Effekte von Atropin.....	33
3.6.3 Präinkubation in Testlösungen und Effekte von Carbamazepin.....	34

4. Ergebnisse

4.1. Kontrollgruppe.....	35
4.2. Effekte von Acetylcholin und Physostigmin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung oder mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin.....	40
4.3. Effekte von Atropin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung.....	46
4.4. Effekte von Atropin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin.....	51
4.5. Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung.....	56
4.6. Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin.....	60

4.7 Vergleich der Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und modifizierter Elektrolyte und Albumin.....	65
5. Diskussion	
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	70
5.2. Bezugnahme zu wissenschaftlichen Vorarbeiten.....	71
5.3. Bedeutung der Ergebnisse.....	77
5.4. Limitationen.....	78
6. Literaturverzeichnis.....	81
7. Abbildungsverzeichnis.....	91
8. Tabellenverzeichnis.....	93
9. Abkürzungsverzeichnis.....	94
I. Erklärung an Eides Statt.....	95
II. Lebenslauf.....	96
III. Danksagungen.....	98

1. Abstrakt

1.1 Deutsche Version

Einleitung: Die Blut-Hirn-Schranke trennt die Kompartimente Blut und neuronales Gewebe voneinander. Sie ist für die Aufrechterhaltung der Elektrolytzusammensetzung im Extrazellulärraum, die Ernährung des Hirnparenchyms und die Segregation von Neurotransmittern zwischen den Kompartimenten essentiell. Eine Schädigung führt zu einer Angleichung der Elektrolytzusammensetzung des Extrazellulärspaces an Serumkonzentrationen und zu einer Extravasation von Blutproteinen. Oft kommt es in direktem zeitlichen Zusammenhang einer Hirnschädigung mit Blut-Hirn-Schrankenstörung zum Auftreten eines symptomatischen epileptischen Anfalls und im Verlauf zu Entwicklung einer Epilepsie. Der entorhinale Cortex als Fokus bei Temporallappenepilepsien spielt in der Epilepsieforschung aufgrund seiner besonderen Verschaltung eine herausragende Rolle und ist Ziel cholinergischer Afferenzen. *In vitro* werden durch die Applikation von Acetylcholin und Physostigmin hippocampale Oszillationen im Gamma-Frequenzbereich ausgelöst, während es im Entorhinalen Cortex zu epileptiformer Aktivität kommt.

Methoden: In der vorliegenden Untersuchung wurden an horizontalen Hirnschnitten von Entorhinalen Cortex und Hippocampus naiver Ratten *in vitro* Feldpotentialmessungen im Entorhinalen Cortex (Schicht V/VI) vorgenommen. Es wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, die die Bedingungen einer Blut-Hirn-Schrankenstörung simulieren. In einer Gruppe erfolgte eine Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung (mEL), welche an Rattenserum adaptierte Elektrolytkonzentrationen enthielt. In der anderen Gruppe erfolgte die Präinkubation in mEL + 0.2 mM Albumin. Anschließend wurde durch die Applikation von Acetylcholin und Physostigmin epileptiforme Aktivität ausgelöst und pharmakologisch charakterisiert.

Ergebnisse: Durch die Applikation aufsteigender Konzentrationen von Acetylcholin kam es unter Kontrollbedingungen zum Auftreten einer kurzen epileptiformen Aktivität in Form von wiederkehrenden, epileptiformen Entladungen (*rekurrente epileptiforme Entladungen*, REEs). Sowohl nach Präinkubation mit mEL als auch nach Präinkubation mit mEL + Albumin kam es nach Applikation von Acetylcholin und Physostigmin zu epileptiformer Aktivität in Form von REEs und längeren, anfallsähnlichen Ereignissen (*Seizure-like-events*, SLEs). Nach Applikation des muskarinergen Antagonisten Atropin wurde die Ereignisdauer reduziert, in einigen Schnitten konnte die Aktivität komplett geblockt werden. Die Applikation des Antikonvulsivums Carbamazepin modulierte die

epileptische Aktivität, unterdrückte diese jedoch nicht vollständig. Die Aktivität nach Carbamazepinapplikation entsprach einer späten, wiederkehrenden („rekurrenten“) epileptiformen Aktivität (*late recurrent discharges, LRDs*), die als pharmakoresistent gilt.

Schlussfolgerungen: In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Elektrolytzusammensetzungen, wie sie im Rahmen einer Blut-Hirn-Schrankenstörung auftreten, die Suszeptibilität des Entorhinalen Cortex gegenüber Acetylcholin erhöhen und das Auftreten pharmakoresistenter epileptiformer Aktivität begünstigen. Die Ergebnisse weisen somit auf einen wahrscheinlichen Entstehungsmechanismus akut-symptomatischer Anfälle im Rahmen von Blut-Hirn-Schrankenstörung hin und unterstreichen die pathophysiologische Bedeutung eines cholinergen Ungleichgewichtes. Schlussfolgernd sollten pathophysiologische Vorgänge bei einer Blut-Hirn-Schrankenstörung besser verstanden werden, um daraus antiepileptische und auch antiepileptogenetische Therapieansätze zu entwickeln.

1.2 English version

Introduction: The blood-brain-barrier separates the compartments blood and neuronal tissue. It is essential for maintaining the electrolyte composition in the extracellular space, nutrition of neuronal tissue and segregation of neurotransmitters between the compartments. Damage leads to extravasation of blood proteins and adjustment of electrolyte concentrations towards serum concentrations. A symptomatic seizure frequently occurs in close temporal relation to brain damage with blood-brain-barrier disruption and may be followed by development of a symptomatic epilepsy. The entorhinal cortex plays an important role in temporal lobe epilepsy and is of interest in epilepsy research because of its unique interconnections and its aim of many cholinergic afferences. *In vitro* application of acetylcholine and physostigmine leads to hippocampal oscillations in the gamma frequency range whereas it leads to epileptiform activity in the entorhinal cortex.

Methods: In this study, horizontal brain slices of entorhinal cortex and hippocampus of naive rats were used to perform field potential recordings of the entorhinal cortex (layer V/VI). Two different protocols which mimic blood-brain-barrier disruption conditions were used. In one group preincubation was performed with modified electrolyte solution (mES), which contained serum adapted electrolytes. In the other group preincubation was performed in mES + 0.2 mM albumin. Subsequently epileptiform activity was induced by application of acetylcholine and physostigmine and characterized pharmacologically.

Results: In control conditions rising concentrations of acetylcholine led to a short lasting epileptiform activity in the form of recurrent epileptiform discharges (REDs). After preincubation with mES as well as after preincubation with mES + albumin application of acetylcholine and physostigmine led to epileptiform activity in the form of REDs and longer seizure-like-events (SLEs). After application of the muscarinic antagonist atropin event duration was reduced, in some slices activity was blocked completely. The application of the anticonvulsive drug carbamazepine modulated the epileptiform activity but failed to suppress it completely. The activity after application of carbamazepine matched late recurrent discharges (LRDs), which are known to be pharmacoresistant.

Conclusions: In the present study, it has been shown that changes of the electrolyte composition like they are seen under blood-brain-barrier-disruption increase the susceptibility of the entorhinal cortex to acetylcholine and promote the occurrence of pharmacoresistant epileptiform activity. These results indicate to a probable mechanism of development of acute symptomatic seizures during blood-brain-barrier-disruption and highlight the pathophysiological importance of cholinergic imbalances. Hence, a better understanding of pathophysiological processes during blood-brain-barrier-disruption is needed to develop antiepileptic and antiepileptogenic therapy approaches.

2. Einleitung

2.1. Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) trennt die Kompartimente Blut und Hirnsubstanz hinsichtlich Ionen-, Protein- und Transmitterzusammensetzung. Dies ist für die störfreie Funktion der jeweiligen Kompartimente wichtig. Erstmals wurde diese von Paul Ehrlich im Jahr 1885 beschrieben. Die Segregation der Kompartimente wird durch verschiedene Barriereanteile bewirkt, die sich zu einer funktionellen Einheit zusammenschließen. Die BHS besteht aus (a) den Kapillar-Endothelzellen, welche über durch die Zonula occludens (*Tight Junctions*) verbunden sind, (b) den die Endothelzellen umgebende Pericyten und der Basallamina, sowie (c) den perivaskulären Endfüßchen der Astrozyten (1). Neuere Studien belegen hierbei das komplexe Zusammenspiel von Endothel und Pericyten mit assoziierten neuronalen Populationen und Astrozyten (1, 2). Das Verständnis vom Konzept der statischen BHS wird zugunsten der Betrachtung der neurovaskulären Einheit (NVE) als einer dynamischen Regulationseinheit von cerebralem Blutfluss und selektivem Transport über die BHS verlassen. Die BHS stellt eine tridirektionale Schnittstelle zwischen endokrinem System, dem Nerven- und Immunsystem dar. Die Aufgaben der BHS bestehen in: a) Ionen- und Flüssigkeitshomöostase b) Segregation von Neurotransmittern und neuroaktiven Substanzen zwischen Serum- und Hirnparenchym c) Ernährung d) Aufrechterhaltung der neuroimmunologischen Privilegiertheit des Gehirns und die lokale Regulation des Blutflusses (1,3). Der Transport über die BHS kann sowohl aktiv als auch passiv stattfinden. Kleine wasserlösliche polare Moleküle wie z.B. Wasser und Harnstoff können parazellulär diffundieren, wobei die interzellularen *Tight Junctions* diesen Austausch limitieren (elektrische Barriere). Lipophile Moleküle diffundieren transzellulär. Größere Moleküle und Proteine können aktiv mittels rezeptorvermittelter (z.B. Transferrin) oder adsorptiver Transcytose (z.B. Albumin) durch die BHS transportiert werden (4). Eine erhöhte Permeabilität der BHS kann durch verschiedene Entzündungs- Mediatoren wie zum Beispiel TNF alpha, IL1 β und IL- 6 an Endothelzellen hervorgerufen werden (5)

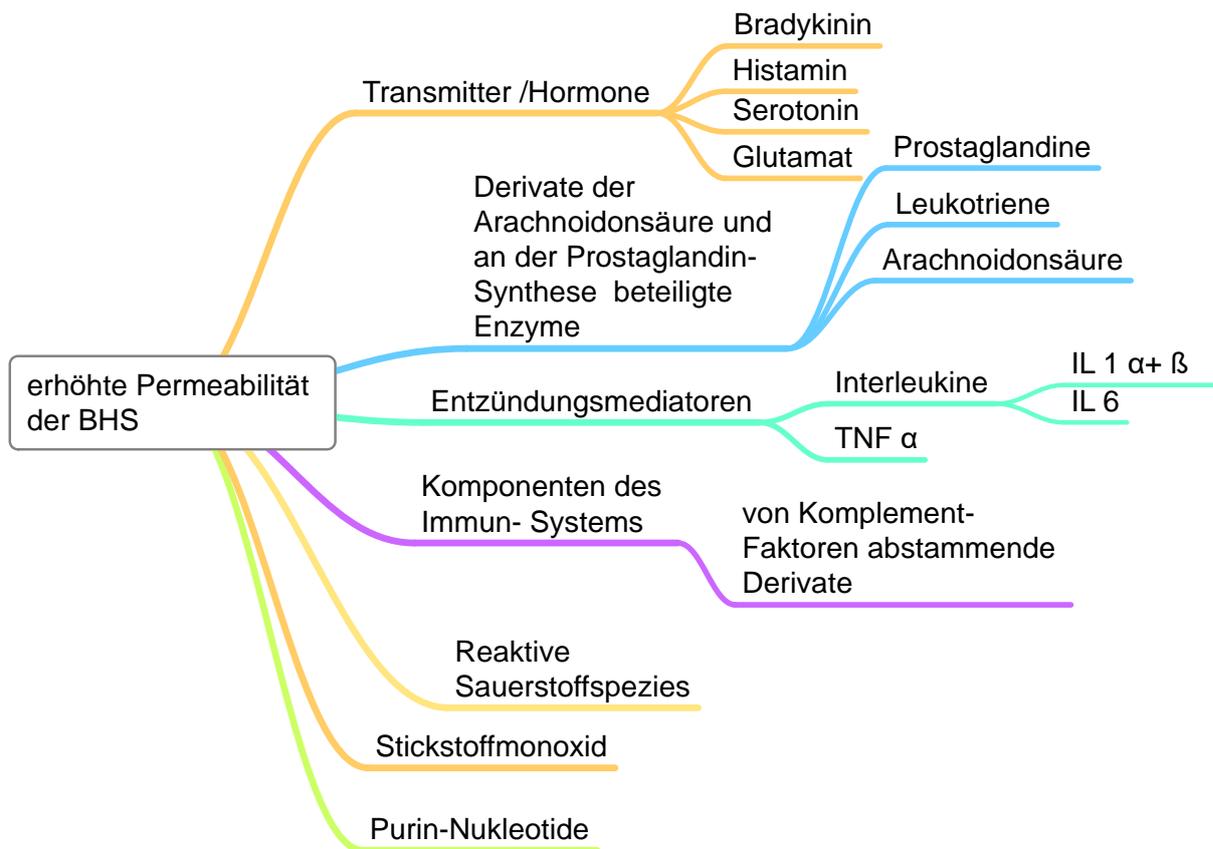


Abbildung 1: Ursachen erhöhter Permeabilität der BHS modifiziert nach (1)

Elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Studien zeigen (6), dass im Rahmen einer Schädigung der BHS zunächst eine erhöhte Permeabilität für große Moleküle (die mittels Transcytose aktiv über die BHS transportiert werden, wie z.B. Albumin) auftritt, welche einem erhöhten parazellulären Transport vorausgehen kann, aber diesen nicht zwingend nach sich zieht. Folglich geht man davon aus, dass eine graduelle und selektive Öffnung der BHS mit erhaltener elektrischer Barriere möglich ist (6) In tierexperimentellen Arbeiten konnte nach Trauma ein biphasisches Auftreten der Blut-Hirn-Schranken-Störung (BHSS) nachgewiesen werden. Es traten hierbei zwei Maxima, eines nach 4 - 6 Stunden und ein weiteres etwa drei Tage nach Ereignis auf (7). Eine komplette Öffnung der BHS zieht ein Äquilibrium der Elektrolytkonzentrationen zwischen Serum und extrazellulärer Flüssigkeit im Hirnparenchym nach sich. Hierbei kommt es im Vergleich zur physiologischen Zusammensetzung zu einer erhöhten Kaliumkonzentration im Hirninterstitium und einer erniedrigten Konzentration von Magnesium- und Calciumionen. Im Falle einer Extravasation von Blutproteinen kommt es

durch Bindung von Albumin an den astrozytär lokalisierten TGF β Rezeptor zu einer Aktivierung und der Auslösung einer Signalkaskade, welche u.a. die Phosphorylierung des Smad2 Proteins und Expression von nukleären Proteinen beinhaltet. Dies konnte einerseits durch eine Exposition gegenüber Albumin, jedoch auch gegenüber TGF β als direktem Agonisten am TGF β Rezeptor gezeigt werden. (8,9). In Folge dieser astrozytären Aktivierung kommt es zu vielfältigen Veränderungen. Zum einen kommt es zur reduzierten Expression des für die Kaliumhomöostase wesentlichen Kaliumkanals KCNJ10 (früher als Kir 4.1 bekannt). Dieser sorgt physiologischerweise für eine räumliche Pufferung von Kalium Ionen am astrozytären Endfuß, wodurch diese aus dem Extrazellulärraum in die Astrozyten aufgenommen werden. Diese tritt vor allem dann auf, wenn aktivitätsabhängig unterschiedlich hohe Konzentrationen von Kalium im Parenchym vorhanden sind. Unter physiologischen Bedingungen führt der Einstrom von Kaliumionen in die Astrozyten zu einem osmotisch bedingten Einstrom von Wasser in die Astrozyten durch den Wasserkanal AQP4. Dieser ist typischerweise mit dem KCNJ10 am astrozytären Endfuß kolokalisiert; die Expression von AQP4 wird durch Aktivierung am TGF β Rezeptor ebenfalls vermindert. Durch eine verminderte Expression des astrozytären Glutamat-Transporters SLC1A2 + 3 wird die Aufnahme des exzitatorischen Glutamats aus dem Extrazellulärraum in die Astrozyten vermindert, sodass dieses akkumuliert. Astrozyten kommunizieren untereinander unter anderem über *gap junctions*, durch die Moleküle und Ionen kontrolliert diffundieren können. Die Expression der astrozytären Connexin Proteine 30 und 43 ist im Falle einer TGF β Aktivierung herabgesetzt (8), was möglicherweise zu einer aktivitätsabhängigen Akkumulation von Kaliumionen beiträgt (9) Diese Veränderungen resultieren akut in einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit (10) und erniedrigen die Schwelle für eine hypersynchrone Netzwerkaktivität. Längerfristig führt die astrozytäre Aktivierung über die Veränderungen der neuronalen Aktivität im Sinne eines *Remodeling* zu einer veränderten Netzwerk-Aktivität und trägt zur Epileptogenese bei (11, siehe auch Abbildung 2). In Zusammenhang mit einer direkten Hirnschädigung wie z.B. einem Trauma, einer Infektion oder Ischämie kann es zu einem Anfall in direktem zeitlichen Zusammenhang mit der Hirnschädigung kommen (12). Weiterhin ist nach einer variablen Latenzphase die Rekurrenz von spontanen epileptischen Anfällen beschrieben.

Im Wesentlichen lassen sich die für die für die Anfallsentstehung in Folge einer Blut-Hirn-Schrankenstörung als ursächlich angenommenen Veränderungen in drei Kategorien unterteilen:

1. Elektrolyt- und Wasserverschiebungen
2. Inflammation, welche längerfristig über *Remodeling* zur Epileptogenese beiträgt (durch Aktivierung der Astrozyten am TGF β Rezeptor)
3. Extravasation von Neurotransmittern: Wie beispielsweise Glutamat und Adenosin

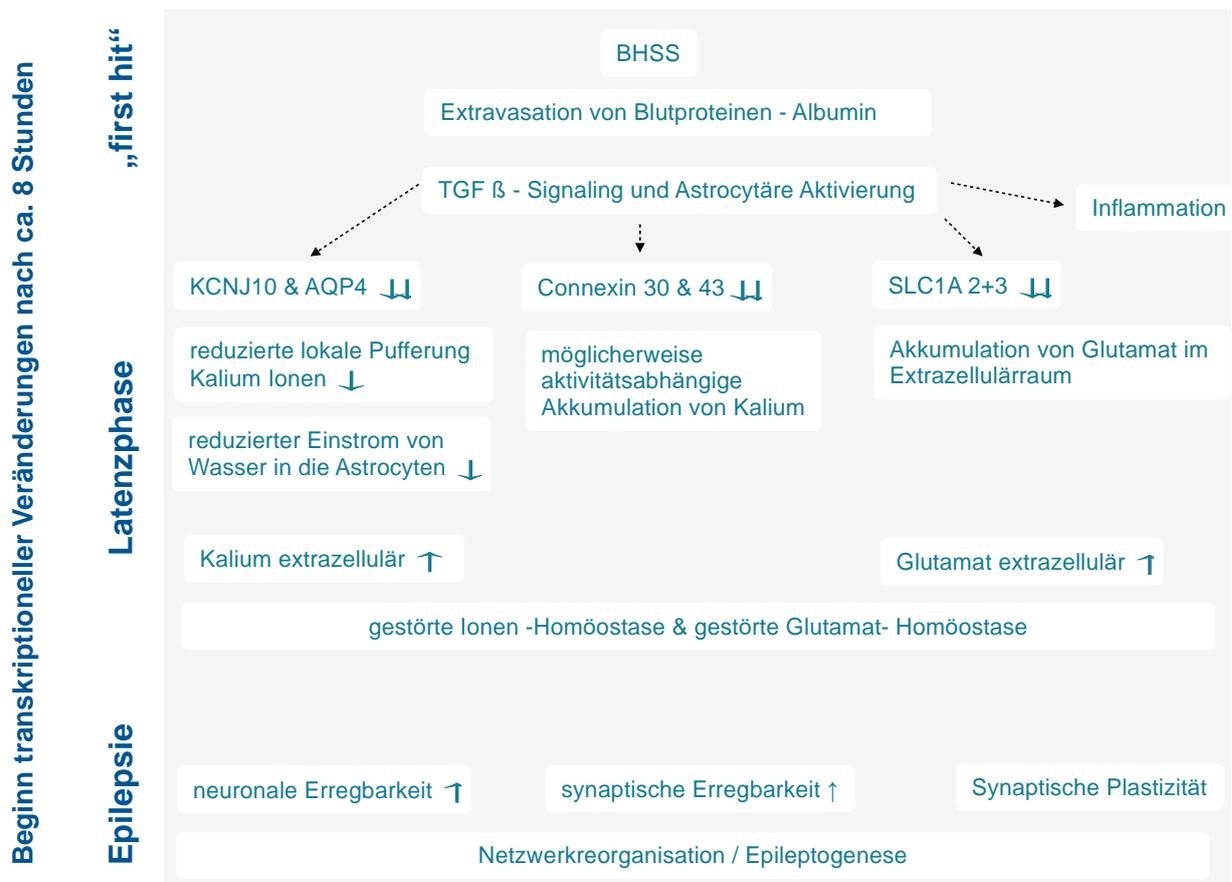


Abbildung 2: Vorgänge bei der Epileptogenese modifiziert nach (11).

2.2 Epilepsie

Epilepsie ist ein neurologisches Krankheitsbild mit einer hohen Prävalenz (13) von 0.4– 1 %. Der Terminus Epilepsie kommt nur dann zur Anwendung, wenn epileptische Anfälle spontan, also ohne erkennbaren Auslöser und wiederholt auftreten. Tritt im Gegensatz dazu ein epileptischer Anfall im Rahmen akuter struktureller (z.B. Schädel-Hirn-Trauma) oder metabolischer Entgleisungen (z.B. Hyponatriämie) auf, so ist von akuten symptomatischen Anfällen die Rede. Bei Kindern werden solche am häufigsten

im Verlauf febriler Zustände (sog. Fieberkrämpfe), bei Erwachsenen im Rahmen eines Alkoholentzuges beobachtet.

Das Risiko, einmalig im Leben einen epileptischen Anfall zu erleiden, liegt zwischen 3 und 5 % (13). Epidemiologisch betrachtet findet man einen ersten Manifestationsgipfel im Kindesalter (mit absteigender Wahrscheinlichkeit zum 18. Lebensjahr) und einen erneuten Anstieg des Auftretens nach dem nach dem 60. Lebensjahr (14). Eine Einteilung der epileptischen Anfälle wird traditionell nach Semiologie oder nach Ätiopathogenese vorgenommen (15). Demnach werden zwei große Entitäten unterschieden: Primär generalisierte (beide Gehirnhälften sind betroffen) und fokale (ehemals als partiell bezeichnete) epileptische Anfälle, die von einem kleinen Areal des Gehirns, dem sogenannten Fokus, ausgehen. Die fokalen epileptischen Anfälle wurden traditionell weiter danach unterteilt, ob sie mit oder ohne Einschränkungen des Bewusstseins einhergehen. Epileptische Anfälle die ohne Einschränkungen des Bewusstseins auftreten wurden als einfach fokale Anfälle bezeichnet. Solche die mit Einschränkung des Bewusstseins auftreten, wurden als komplex fokale Anfälle bezeichnet, bei beiden Formen ist eine sekundäre Generalisierung möglich.

Nach Ätiopathogenese unterteilt man symptomatische Epilepsien, kryptogene Epilepsien und idiopathische (meist generalisierte, zum Teil multilokuläre) Epilepsien. Bei symptomatischen Epilepsien können diffuse oder lokale Hirnschädigungen in Form von zerebraler Ischämie, Blutung, Trauma, Tumoren, Infektion oder aber auch degenerative und hereditäre zerebrale Erkrankungen ursächlich für das Auftreten von Anfällen sein. Der Anteil dieser erworbenen, auch als strukturell bezeichneten Epilepsien beträgt in etwa 30 % (12). Als kryptogen werden die Epilepsien bezeichnet, bei denen einerseits keine Ursache nachgewiesen werden kann, andererseits aber auch keine Hinweise für das Vorhandensein einer idiopathischen Epilepsie vorliegen.

Die idiopathischen Epilepsien umfassen ein weites Spektrum von Epilepsie- Syndromen, wobei in diese Gruppe viele altersgebundene Epilepsien eingruppiert werden. Hinweise für das Vorliegen einer idiopathischen Epilepsie sind u.a. eine familiäre Belastung und eine für die Erkrankung alterstypische Erstmanifestation.

Durch Weiterentwicklungen im Bereich der Genetik, der strukturellen und funktionellen bildgebenden Diagnostik sowie breite Anwendung verbesserter Elektroencephalographie (EEG) Registrierungen mit Video- und Langzeitableitungen ist mittlerweile eine ätiopathogenetisch genauere Einordnung vieler Epilepsien möglich, was eine Modifikation der Terminologien und Konzepte nach sich gezogen hat (16, 17). Die

Weiterentwicklung der Klassifikation wurde 2017 von der *International League Against Epilepsy* konsentiert, wird aber im klinischen Alltag derzeit noch nicht konsequent verwendet.

In der aktualisierten Terminologie (16, 17) ergibt sich eine mehrere Stufen umfassende Klassifikation der Epilepsien. Im Folgenden werden die Neuerungen kurz zusammengefasst (die Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit).

Die mehreren Stufen der Klassifikation umfassen:

1. Stufe: Zunächst sollte eine Klassifikation der Art des epileptischen Anfalls angestrebt werden (ausführliche Klassifikation siehe auch Abb. 3). Hierbei werden unterschieden:

- a) Fokale epileptische Anfälle (mit oder ohne Änderung des Bewusstseins als deskriptives Merkmal um die Beeinträchtigung durch die epileptischen Anfälle abzuschätzen, Beginn mit motorischen Symptomen, Beginn mit nicht-motorischen Symptomen, fokaler Beginn mit Entwicklung bilateraler tonisch-klonischen Entäußerungen)
- b) Generalisierte epileptische Anfälle (mit motorischen Symptomen oder mit nicht-motorischen Symptomen)
- c) Epileptische Anfälle mit unbekanntem Anfallsbeginn (motorisch oder nicht-motorisch) und nicht klassifizierte epileptische Anfälle

Der Begriff partiell sollte nun nicht mehr verwendet werden und wird durch fokal ersetzt, weiterhin sollte der Begriff komplex fokal durch fokal mit Einschränkung des Bewusstseins ersetzt werden. Ebenso wird empfohlen den Begriff der sekundären Generalisierung nun nicht mehr zu verwenden.

2. Stufe: Empfehlung die Art der Epilepsie einzuordnen: Die vormals bekannten Kategorien fokale Epilepsie und generalisierte Epilepsie werden um die Kategorie einer gemischten fokalen und generalisierten Epilepsie ergänzt, weiterhin wird die Kategorie unbekannt ergänzt.

3. Stufe in der neuen Klassifikation sollte, wenn möglich, die Diagnose eines Epilepsie Syndroms sein. Dies wird empfohlen, um eine möglichst individualisierte Therapie zu ermöglichen bzw. das Therapieansprechen abzuschätzen.

Weitere Empfehlungen:

A) Die Einbeziehung der Ätiologie der Epilepsie. Diese wird aufgrund der therapeutischen Konsequenzen nunmehr stärker eingebunden, sodass wenn möglich bereits beim ersten epileptischen Anfall eine Einordnung in eine der folgenden ätiologischen Kategorien erfolgen sollte: strukturell, genetisch, infektiös, metabolisch, immun- bedingt und unbekannter Ätiologie.

B) Weiterhin finden die Komorbiditäten in Form von zum Beispiel Lernbehinderungen oder psychiatrischen Auffälligkeiten als ein zusätzliches Kriterium Eingang in der neuen Klassifikation, da diese ebenfalls bei der Wahl von Therapieregimen relevant sind.

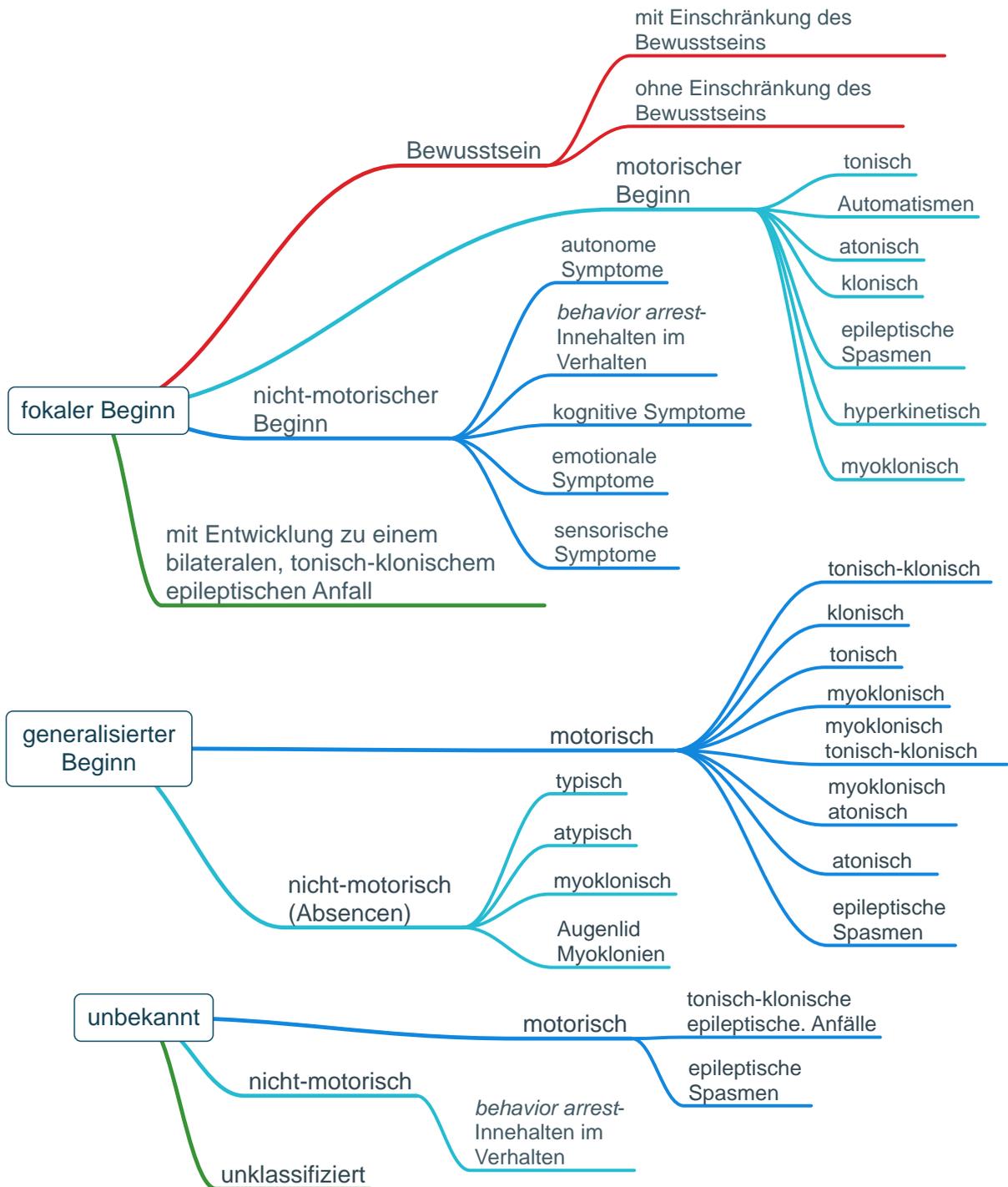


Abbildung 3: Klassifikation epileptischer Anfälle nach (17)

Die häufigste fokale Epilepsie ist mit ca. 60 % die Temporallappenepilepsie (TLE, 18). Klinisch äußert sich diese Epilepsieform häufig durch einen fokalen Anfallsbeginn, der im Verlauf in einen generalisierten Anfall übergeht. Der fokale Beginn kann als Aura auftreten, die je nach Anfallsursprung etwa in einem epigastrischen Gefühl von Unwohlsein, olfaktorischen Sensationen, den Gefühlen des Déjà-vu, des Jamais-vu oder

von Angst bestehen und von Vegetativsymptomen begleitet sein kann. Der fokale Beginn äußert sich häufig in Form einer qualitativen Bewusstseinsänderung, oralen Automatismen oder Handlungsstereotypien (Nesteln an der Kleidung, Verharren in einer Handlung).

Eine Besonderheit der TLE ist der hohe Prozentsatz von auftretender Pharmakoresistenz, die bei Patienten mit einer TLE in ca. einem Drittel der Fälle auftritt (19). Pharmakoresistenz ist hierbei definiert als das Versagen zweier tolerierter und angemessen ausgewählter Therapie-Schemen (in Monotherapie oder Kombination, (20)), während als Therapieziel die Anfallsfreiheit bei tolerablem Nebenwirkungsprofil gilt. Eine Therapieoption für Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie mit lokalisiertem Fokus stellt die operative Fokusresektion dar (21). Die Lokalisation des Fokus wird klinisch, mittels EEG und Bildgebung diagnostiziert. Bei einem nicht wegweisenden EEG-Befund kann die Implantation von invasiven Tiefenelektroden als eine sensitivere Methode zur Fokussuche notwendig werden. Die OP-Indikation sollte für alle Kinder und Erwachsene evaluiert werden, welche die Kriterien einer pharmakoresistenten Epilepsie erfüllen sowie für alle Kinder mit Epilepsie, welche jünger als 3 Jahre sind (22).

Die histopathologische Untersuchung des resezierten Fokus, der im Falle der TLE häufig die hippocampale Formation und variable Anteile des Temporallappens umfasst, dient der Gewinnung pathophysiologischer Erkenntnisse. Anhand der in der Vergangenheit so gewonnenen Daten gelingt mittlerweile auch eine Aussage zur Wahrscheinlichkeit der postoperativen Anfallsfreiheit.

Der neuropathologische Befund, der bei Patienten mit Temporallappenepilepsie in 65 % der Fälle am häufigsten erhoben wird ist eine Hippocampusklerose in unterschiedlichen Ausprägungsgraden (23). Diese wird einerseits als Folge von Anfallsserien und -stadien aufgefasst, kann unter anderem aber auch durch Hypoglykämien und Hypoxie ausgelöst werden. Sie kommt nicht nur als Folge einer Epilepsie, sondern auch als Ursache in Betracht. Histopathologisch zeigen sich hier der Verlust von Pyramidenzellen, Körnerzelldispersion (ein Migrationsdefekt der Körnerzellen) und eine reaktive Gliose. Traditionell erfolgt die neuropathologische Graduierung der Hippocampusklerose nach dem Wyler-System (24). Hierbei wurde in einer Serie von Hirnschnitten des chirurgisch entfernten Hippocampus das Maß der Gliose und des Zellverlustes im Bereich der hippocampalen Formation erfasst. Eine neuere Unterteilung der hippocampalen Sklerose nach Blümcke berücksichtigt auch klinisch-pathologische Aspekte (23). Hierbei wird u.a.

das Muster des Nervenzellverlustes im Bereich des Cornu Ammonis und des Gyrus dentatus untersucht und mit der Anfallsfreiheit der Patienten postoperativ korreliert.

Therapeutisch werden bei Epilepsien verschiedene antikonvulsiv wirksame Medikamente eingesetzt. Nicht bei allen eingesetzten Therapeutika ist der Wirkmechanismus bisher bekannt. Den bereits verstandenen Wirkmechanismen ist eine Sache gemein: Nahezu alle Substanzen führen durch unterschiedliche Mechanismen an Kanälen oder Hemmung der Transmitterfreisetzung zu einer Verschiebung der Balance zu Gunsten der hemmenden Einflüsse im Nervensystem, sodass eine hypersynchrone neuronale Aktivität erschwert und im Idealfall verhindert wird. Hierbei lassen sich folgende Mechanismen skizzieren: 1) Änderung der Funktion von Ionenkanälen 2) Verstärkung synaptischer Inhibition 3) Inhibition des exzitatorischen Transmittersystems (25). Eine Substanz mit gemischtem Wirkmechanismus, die heute aufgrund ihres Nebenwirkungsspektrums nur noch in Sonderfällen in Gebrauch ist, ist Phenobarbital. Die Wirkung von Phenobarbital wird durch die Bindung am GABA-A-Rezeptor vermittelt und besteht in einer Verstärkung der Wirkung von GABA selbst am Rezeptor, sodass die durch GABA verursachte Inhibition verstärkt wird. Eine prototypische Substanz, die ihre Wirkung am GABA Rezeptor entfaltet, sind Benzodiazepine. Diese sind für die langfristige antiepileptische Therapie aufgrund des Gewöhnungseffektes nicht geeignet. Einen weiteren Angriffspunkt antikonvulsiv wirksamer Medikamente stellen die spannungsabhängigen Natriumkanäle dar. Die Aktivierung dieser Kanäle trägt physiologischerweise zur Generierung von Aktionspotentialen bei. Eine Modulation dieser Kanäle wirkt dem repetitiven Feuern von Neuronen und somit hypersynchroner Netzwerkaktivität entgegen. Über diesen Mechanismus wirkt beispielsweise das Antiepileptikum Carbamazepin (26).

Tierexperimentell gibt es verschiedene Epilepsiemodelle, die vorrangig genutzt werden, um potentiell antikonvulsive Therapien zu testen und die pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese zu untersuchen. Hierbei können zwei Arten von chronischen (fokalen) Epilepsiemodellen unterschieden werden, welche sich durch die Art der Induktion unterscheiden: Elektrisch und chemisch (27).

Bei beiden Modellen kommt es durch den Induktionsreiz zu Umbauvorgängen im Gehirn, welche schlussendlich in Epilepsie resultieren. Bei elektrischer Induktion können auch während der Induktionsphase akut epileptische Anfälle induziert werden; es gibt Modelle

bei denen es durch repetitive elektrische Reizung zur Entwicklung einer chronischen Epilepsie kommt („*electrical kindling*“) (28). Hiervon zu unterscheiden sind post-Status-epilepticus Modelle, bei denen es durch elektrische Reizung zur Induktion eines Status epilepticus (SE) und im Anschluss danach zu spontanen, wiederkehrenden Anfällen kommt. Bei den Modellen, die die Anfallsinduktion durch chemische Substanzen nutzen, gibt es ebenfalls Modelle zur chronischen Epilepsie („*chemical kindling*“). Hierbei werden den Tieren zum Beispiel repetitiv niedrige Dosen des am ionotropen Glutamatrezeptor agonistisch wirkenden Kainat intraperitoneal appliziert (29). Nach einigen Injektionen entwickeln die Tiere fokal-motorische Anfälle, die dann nach einer Latenzzeit von im Schnitt ca. elf Wochen spontan auftraten. Analog hierzu gibt es Tiermodelle, bei denen eine höherdosierte einmalige intraperitoneale Injektion von Kainat zur Entwicklung von spontan rekurrenten, epileptischen Anfällen führt (30). Dies ist jedoch weniger effektiv und mit einer höheren Mortalität assoziiert (29). Da diese Modelle im Gegensatz zur TLE eine beidseitige hippocampale Pathologie entwickeln, hat sich ein weiteres Modell mit topischer Applikation von Kainat in die Amygdala etabliert. Dieses resultiert in einer unilateralen hippocampalen Pathologie und spontan rezidivierenden epileptische Anfällen (31). Diesen Modellen ist ein „*initial hit*“ mit einer Störung der BHS gemein, welcher mutmaßlich zur Epileptogenese beiträgt (siehe Kapitel 2.3).

Eines der am besten untersuchten Tiermodelle, bei dem Anfälle durch chemische Substanzen ausgelöst werden, ist das Pilocarpinmodell. Hierbei handelt es sich um ein Post-SE Epilepsiemodell (32). Durch die Injektion des am M1 und M2 muskarinergen Acetylcholinrezeptor wirksamen (33) cholinergen Agonisten Pilocarpin wird zunächst ein SE induziert, welcher zum Teil selbstlimitierend verläuft und andernfalls pharmakologisch durchbrochen wird. Nach 5 - 10 Tagen Latenz kommt es bei diesem Modell bereits zum Auftreten von spontanen epileptischen Anfällen, welche auch elektroenzephalographisch messbar sind. Analog zur intra-Amygdala Injektion gibt es auch hier Modelle, die eine topische Applikation (intra-hippocampal) als ein selektiveres TLE Modell nutzen (31). Die Betrachtung der tierexperimentellen Epilepsiemodelle erhebt an dieser Stelle keinen Anspruch auf Vollständigkeit und soll lediglich einen Einblick in die Vielfalt von Tiermodellen zur chronischen Epilepsie geben. Weitere experimentelle Ansätze beziehen sich unter anderem auf die thermische Induktion von Anfällen (34) und Modelle zur posttraumatischen Epilepsie (35).

2.3 Epilepsie und Blut-Hirn-Schranken-Störung

Aus klinischen Beobachtungen ist bereits bekannt, dass bei verschiedenen Erkrankungen (s. Kapitel 2.2), denen eine BHSS gemeinsam ist, epileptische Anfälle auftreten bzw. in deren Folge eine Epilepsie entsteht. Im Folgenden wird der bisherige Wissensstand um die Zusammenhänge zwischen BHSS und Epilepsien näher skizziert. In Analogie zu der Beobachtung, dass bei einer Hirnschädigung oft in direktem zeitlichen Zusammenhang Anfälle auftreten konnten bei Patienten, bei denen eine osmotische Öffnung der BHS zum Zwecke einer intraarteriellen Chemotherapie primärer ZNS-Lymphome vorgenommen wurde, als Nebenwirkung epileptische Anfälle beobachtet werden (36). Hierbei spricht die Latenz zwischen Öffnung der BHS und Anfallsereignis am ehesten für einen durch Elektrolytverschiebungen bedingten prokonvulsiven Effekt. Auch eine Öffnung der BHS mit Gallensalzen im Tiermodell *in vivo* führte zur Entwicklung eines kortikalen Epilepsiefokus. Dieser war in *ex vivo* Untersuchungen weiterhin nachweisbar. In dieser Untersuchung waren die ersten epileptiformen Potentiale hierbei vier bis sieben Tage nach der Behandlung sichtbar und weit über den Zeitpunkt der akuten Phase der BHSS bis zu 49 Tage nach Ereignis ableitbar, sodass diese als elektrophysiologisches Korrelat der Epileptogenese gewertet werden könnten (37). In einem SE-Tiermodell (elektrisches Kindling) konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der BHSS mit der Anfallsfrequenz und dem Grad der BHSS korreliert. Dies galt auch für die Latenzphase und chronisch epileptische Tiere (38). Auch im humanen Gewebe aus Resektionen von Patienten mit Epilepsie konnte eine Veränderung im Bereich der BHS nachgewiesen werden (39). Es zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Probanden eine höhere Blutgefäßdichte, welche positiv mit der Anfallsfrequenz korrelierte. Weiterhin zeigte sich der Verlust von *Tight Junctions* (Diffusionsbarriere), sowie eine Extravasation von Immunglobulin G (IgG). Untersuchungen von BHSS im Rahmen von Traumamodellen konnten eine vermehrte Expression von *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Folge eines Traumas nachweisen, welche bereits sechs Stunden nach Ereignis nachweisbar war und bis zu 14 Tage anhielt. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der vermehrten Expression dieses Angiogenesefaktors um einen Reparaturmechanismus im Bereich der BHS handelt (40). Im Tiermodell für chronische Epilepsien (Pilocarpin) zeigte sich, korrelierend mit den humanen Daten, früh im Anschluss an einen SE eine BHSS mit einer Überexpression von VEGF als Zeichen einer Angiogenese und eine IgG Extravasation als Marker einer BHSS. Diese Beobachtung ließ sich auch an einem Epilepsiemodell in Mäusen (Intra-Amygdala Kainatinjektion)

nachvollziehen. Hier zeigte sich kurz (4 - 24 Std.) nach einem SE eine vermehrte Extravasation von IgG und Albumin, welche räumlich auf den ipsilateralen Hippocampus beschränkt war (41). Aus tierexperimentellen Versuchsansätzen *in vitro* ist bekannt, dass durch 4-Aminopyridin (4-AP) induzierte epileptiforme Aktivität unter Bedingungen, wie sie bei einer BHSS vorkommen, den Übergang von epileptiformer Aktivität in *LRDs* begünstigen. Diese waren gegenüber Carbamazepin pharmakoresistent (42). In dieser Studie konnte ein direkter Effekt von Albumin (im Sinne eines *in vitro* Modells einer BHSS) auf die Wirksamkeit konventioneller Antikonvulsiva nachgewiesen werden, wobei die durch 4-AP induzierte epileptiforme Aktivität nach Auswaschen des Albumins teilweise wieder pharmakosensibel war.

2.4 Der entorhinale Cortex und Epilepsie

Die Struktur die den Ursprung der epileptischen Aktivität bei der TLE darstellt ist der entorhinale Cortex und die hippocampale Formation. Der Hippocampus als Teil der hippocampalen Formation (bestehend aus entorhinalem Cortex (EC), Para-, Pre- und Subiculum, Cornu Ammonis (CA) und dem Gyrus Dentatus (GD)) ist einer der phylogenetisch ältesten Hirnanteile (siehe Abbildung 4). Er ist im Gegensatz zum sechsschichtigen Neocortex aus drei Schichten aufgebaut. Im Vergleich zum Neocortex, wo sich oft reziproke Verschaltungen (43) finden, sind die einzelnen Strukturen der hippocampalen Formation überwiegend unidirektional miteinander verbunden (44), was den Hippocampus in Struktur und Funktion einzigartig macht. Die Hauptzellen des CA sind glutamaterge Pyramidenzellen, welche im Stratum pyramidale liegen. Hinsichtlich der Verschaltung im Hippocampus wurde traditionell das Prinzip der trisynaptischen Schleife angenommen.

Die Aktionspotentiale, welche im EC entstehen, aktivieren über den Tractus Perforans Synapsen an den Körnerzellen des DG (1. Synapse). Von hier erfolgt die Weiterleitung über die Axone der Körnerzellen (Moosfasern) auf die Pyramidenzellen der Region CA3 (2. Synapse). Von hier aus erfolgt die Erregungsweiterleitung über die axonalen Kollateralen der Pyramidenzellen in CA3 in die Area CA1, wo sie erneut synaptisch verschaltet werden (3. Synapse). Aus der Region CA3 heraus gibt es weiterhin efferente axonale Verbindungen, welche über die Fimbrien die Verbindung zur kontralateralen Hemisphäre herstellen. Die Pyramidenzellen der CA1 Region projizieren efferent über den sogenannten Alveus in das Subiculum, von wo Informationen in die tiefen Schichten des EC fortgeleitet und dort synaptisch verschaltet werden (45, 46). Die besondere

Sensitivität des EC und der hippocampalen Formation gegenüber Anfällen konnte erstmals 1949 durch Richard Jung beschrieben werden (47). Diese erhöhte Sensitivität ist auch im Tiermodell reproduzierbar. Während das Konzept der trisynaptischen Schleife auf anatomischen Grundlagen basiert, ergeben sich in funktionellen Studien Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer Schleifen: So wird 1. das Vorhandensein einer temporammonischen Afferenz vom EC auf die Region CA1 beschrieben und 2. die Afferenz über den Tractus perforans mit nachfolgender synaptischer Verschaltung, die im Wesentlichen der unter „trisynaptischer Schleife“ subsummierten Erregungsweiterleitung entspricht (48). Der EC stellt wiederum die efferente Struktur der hippocampalen Formation dar, sodass hier multiple exzitatorische Schleifen vorhanden sind, die im Falle einer Dysfunktion zur Generierung hypersynchroner, epileptiformer Entladungen führen können. Funktionell ist die hippocampale Formation durch Oszillationen unter anderem an der Bildung von neuen Gedächtnisinhalten beteiligt, wobei er Teil des Papez Kreises ist (49). Weiterhin spielt er eine wesentliche Rolle bei der Orientierung im Raum (50, 51).

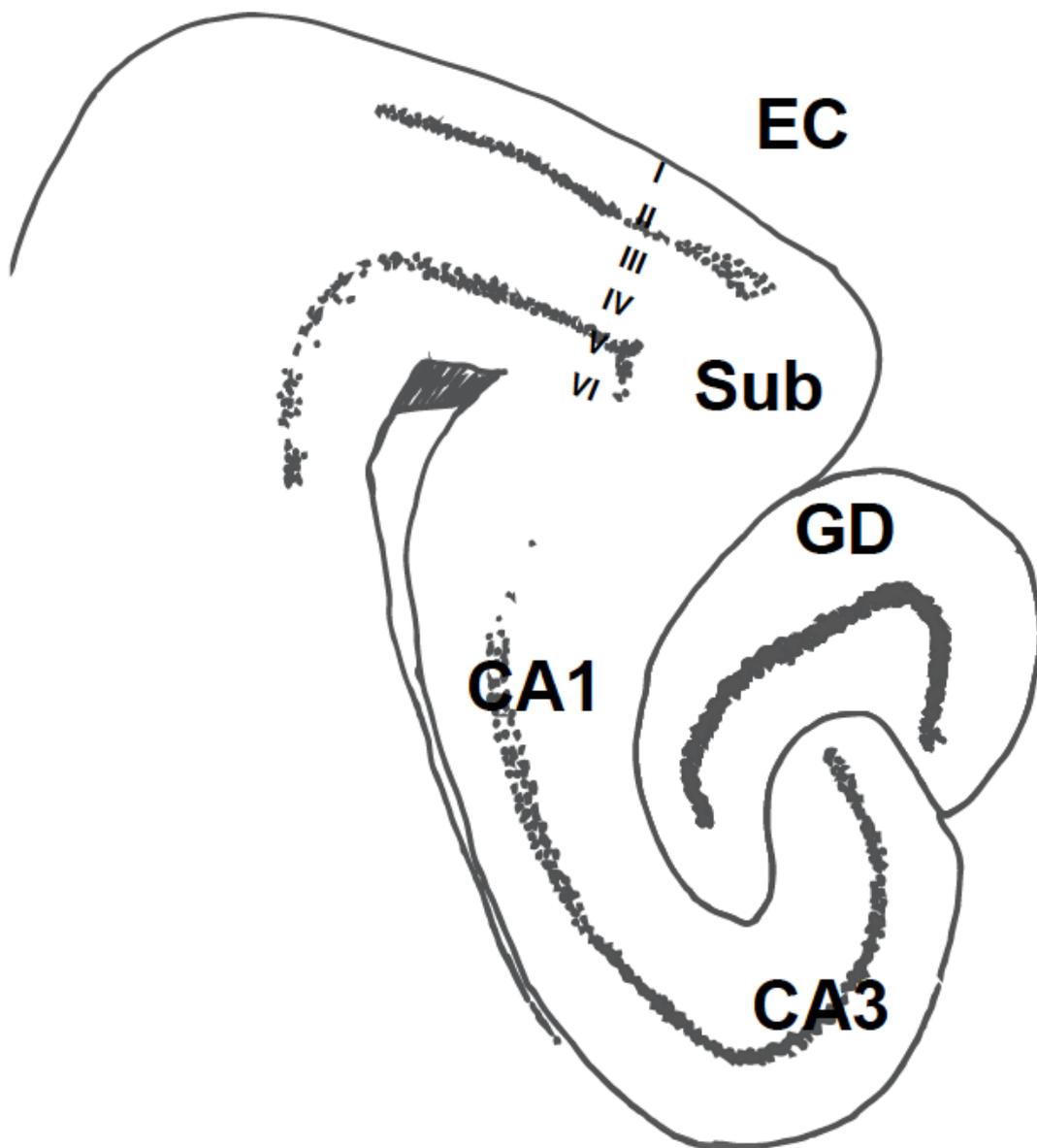


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines horizontalen Rattenhirnschnittes durch den entorhinalen Cortex und die hippocampale Formation. Entorhinaler Cortex (EC), Subiculum (Sub), Gyrus Dentatus (GD), Cornu Ammonis Region CA3 (CA3), Cornu Ammonis Region CA1 (CA1).

2.5 Der entorhinale Cortex und cholinerge Dysfunktion

Aus dem Pilocarpin Modell ist bereits bekannt, dass die Applikation von cholinergen Agonisten zur Entwicklung von prolongierten epileptischen Anfällen führt und es im Rahmen dieses Modells auch zu hippocampalen Sklerosen kommt. Der EC als neocorticaler „Eingang“ in die hippocampale Verschaltung ist Zielstruktur zahlreicher cholinergischer Afferenzen aus dem medialen Septum (52). Acetylcholin (ACh) ist einer der wichtigsten Neurotransmitter des Nervensystems. Es spielt eine wichtige Rolle im vegetativen Nervensystem (Sympathikus und Parasympathikus) und im zentralen Nervensystem des Menschen. ACh wird im Cytosol enzymatisch aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert und anschließend in Vesikeln gespeichert. Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt und Rezeptorbindung erfolgt der Abbau enzymatisch durch die Acetylcholinesterase. Hieraus ergeben sich zwei Möglichkeiten die Konzentration von ACh im synaptischen Spalt zu erhöhen 1. Vermehrte Transmitterfreisetzung 2. Hemmung des Abbaus durch die Acetylcholinesterase. Die Acetylcholinrezeptoren werden in zwei Gruppen unterteilt: Nikotinerge Rezeptoren, welche ionotrope Rezeptoren sind und zum Beispiel an der motorischen Endplatte vorhanden sind und membranständige muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, welche metabotrope Rezeptoren sind. Die muskarinergischen Rezeptoren werden in 5 Subtypen M1 - M5 unterteilt, wovon alle ihre Wirkung über G-Proteine vermitteln. Im Falle von M1, M3 und M5 ist diese G_q Protein gekoppelt, nach Rezeptoraktivierung erfolgt die enzymatische Abspaltung von IP_3 . Die Aktivierung der Subtypen M2 und M4 führt zur Auslösung einer G_i Protein vermittelten Kaskade, welche eine durch einen Kaliumkanal vermittelte Hyperpolarisation der Zelle auslöst. Ein pharmakologischer Antagonismus an den muskarinergen Acetylcholinrezeptoren wird über den unspezifischen kompetitiven Rezeptorblocker Atropin vermittelt. Im Hippocampus des Menschen finden sich prädominant M1 Rezeptoren (53). Studien an humanem hippocampalen Gewebe konnten zeigen, dass M1 Rezeptoren prädominant in den Regionen CA2 und CA3 im Bereich der Pyramidenzellen lokalisiert sind. Die Autoren schlussfolgerten, dass dieses Verteilungsmuster einen Einfluss auf die durch ACh vermittelte Mediation glutamaterger Erregung suggeriert. Im Neocortex der Ratte finden sich mAChR positive Zellen vorwiegend in den Schichten II/III und der Schicht V (54).

Unter physiologischen Bedingungen *in vivo* werden im Hippocampus (CA3/CA1) durch den cholinergen Input Oszillationen im Gamma und Theta Frequenzbereich erzeugt

(55, 56). *In vitro* wurden unter Carbachol Applikation im EC langsame periodische, 0.1 - 4.0 s anhaltende Entladungen gesehen, welche von den Autoren als epileptiforme Aktivität interpretiert wurde. Pharmakologisch war diese auf Atropin sensibel, sodass diese als durch muskarinerge Rezeptoraktivierung vermittelt eingeschätzt wurde (57).

Hinsichtlich der cholinergen Pathophysiologie konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von cholinergen Agonisten im Tiermodell und auch beim Menschen prolongierte Anfälle induziert werden können (32, 58) und somit möglicherweise zur Erhaltung epileptiformer Aktivität benötigt werden. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung von Anfällen im Rahmen von SE Modellen ein massiver Anstieg von extrazellulärem ACh hippocampal vorliegt (59). In chronischen Modellen (Amygdala Kindling, Elektrokonvulsive Anfälle) konnte eine verminderte Expression des M1 und M3 Rezeptors im Bereich von CA1, CA3 und DG 24 Stunden nach dem letzten Anfall nachgewiesen werden, gefolgt von einer verstärkten Expression 28 Tage nach dem letzten Anfall, der für bestimmte Regionen des Hippocampus spezifisch war (60). Weiterhin haben cholinerge Imbalancen einen negativen Einfluss auf die Integrität der BHS. Bei transgenen Tieren konnte eine BHSS mit einer Überexpression der synaptischen Acetylcholinesterase nachgewiesen werden (61).

Zusammenfassend laufen im Bereich des Hippocampus und auch im Bereich des EC zahlreiche cholinerge Verbindungen zusammen. Wie beschrieben ergeben sich in experimentellen Arbeiten zahlreiche Hinweise auf die Schlüsselrolle von ACh als Neurotransmitter, der sowohl physiologische als auch pathologische oszillatorische Aktivität auslöst und für deren Aufrechterhaltung von Bedeutung ist. Die wechselnde Rolle von ACh in diesem Zusammenhang stellt möglicherweise die Verbindung zwischen erstem Anfall und rezidivierenden Anfällen dar, was auch durch die erhöhte Suszeptibilität gegenüber ACh im Pilocarpin-Modell *ex vivo* belegt ist. Weiterhin sind im Pilocarpin-Modell hippocampale Sklerosen als Korrelat einer TLE beschrieben, welche möglicherweise mit der hohen muskarinergen ACh-Rezeptordichte im Bereich des Hippocampus assoziiert sind. In chronischen Modellen (Kainat, Pilocarpin) wurde *ex vivo* bereits eine Anfallsauslösung durch ACh beschrieben, interessanterweise konnte die höchste Sensitivität gegenüber sowohl stimulus- als auch ACh-induzierter epileptiformer Aktivität hierbei im Bereich des EC nachgewiesen werden (62). Unter Berücksichtigung

dieser Ergebnisse ist der EC als Zielstruktur cholinergere Afferenzen und als Komponente von multiplen exzitatorischen Schleifen Fokus der vorliegenden Arbeit.

Das Wissen um die Pathophysiologie bei Vorliegen einer BHSS im Zusammenhang mit der Epileptogenese eröffnet Perspektiven zur Entwicklung neuer Therapieansätze. Diese Therapieansätze beziehen sich zum einen auf die Entwicklung eines präventiven Ansatzes, um nach einem „*first hit*“ die Epileptogenese zu verhindern, zum anderen auf die Entwicklung möglicher Strategien bei einer bereits pathologisch veränderten BHS zu entwickeln. Wie oben umrissen gibt es mittlerweile Ansätze diese Zusammenhänge in Folge einer BHSS umfassender zu verstehen, hierzu tragen auch tierexperimentelle Ansätze in chronischen Epilepsiemodellen bei.

Konträr hierzu ist jedoch nicht gut untersucht, welche Veränderungen insbesondere unter Berücksichtigung der immer wichtiger erscheinenden Rolle des veränderten cholinergen *signalings* im Rahmen einer akuten BHSS zum Auftreten des ersten Anfalls führen.

2.6 Arbeitshypothesen

In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Veränderungen der Elektrolytzusammensetzungen, wie sie im Falle einer akuten BHSS vorliegen, erhöhen die die Suszeptibilität des ECs gegenüber ACh.
2. Die durch ACh und Physostigmin hervorgerufene Aktivität wird unter allen Bedingungen einer BHSS über muskarinerge Rezeptoren vermittelt.
3. Die durch ACh und Physostigmin hervorgerufene Aktivität kann durch die Applikation von Carbamazepin als Antikonvulsivum pharmakologisch moduliert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Zur Wahl der Methodik

Zur Beantwortung der unter 2.6 beschriebenen Hypothesen wurden folgende Anforderungen an die Methodik bedacht:

1. Es sollen akute Effekte im Bereich der BHS nachgestellt werden.
2. Es sollen unter anderem pharmakologische Effekte untersucht werden.
3. Es handelt sich bei der zu untersuchenden Aktivität um Netzwerkaktivität größerer neuronaler Verbände.

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen wurde für die hier vorliegende Arbeit ein *in vitro* Modell an akuten Schnitten naiver Ratten gewählt, da es sich um eine Simulation des sogenannten „*first hit*“ im Rahmen einer BHSS handeln soll. *In vitro* lassen sich verschiedene Elektrolytveränderungen unkompliziert nachstellen. Zudem handelt es sich um eine etablierte, ressourcenschonende Methode um pharmakologische Effekte zu untersuchen. Da es sich bei epileptiformer Aktivität um die Aktivität größerer neuronaler Verbände handelt, wurde mit extrazellulären Feldpotentialmessungen (Feld-exzitatorisches postsynaptisches Potential, im Folgenden F-EPSP abgekürzt) eine Methode gewählt, die diese Aktivität gut abbildet.

3.2. Präparation der Tiere und Gehirnschnitte

Die Präparationen der Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Union durchgeführt und waren durch tierethische Kommissionen in Berlin geprüft und genehmigt (LAGeSo Berlin, T0228/04). Wistar Ratten männlichen Geschlechts mit einem Gewicht von 160-240 g wurden zunächst mittels Inhalationsnarkose durch ein Gemisch von 1 % Isofluran mit 70 % N₂O und 30 % O₂ tief anästhesiert und dekapitiert. Daran anschließend erfolgte die sofortige, schonende Präparation und Entnahme des Gehirns, welches dann in gekühlten und oxygenierten künstlichen Liquor (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) transferiert wurde. Die Temperatur des verwendeten aCSFs lag zwischen 2 und 4 °C. Dieses aCSF enthielt folgende Konzentration an Ionen (in mM): NaCl 129, NaHCO₃ 21, KCl 3, CaCl₂ 1,6, MgSO₄ 1,8, NaH₂PO₄ 1,25 und Glucose 10. Die Osmolarität des aCSF betrug 300 ± 5 mOsmol/l. Die Oxygenierung erfolgte mittels Gasmischung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂. Die Präparation von 400 µm dicken, horizontalen Gehirnschnitte von Hippocampus und EC erfolgte

mittels Vibratom von Leica (Wetzlar, Deutschland) in einer gekühlten Kammer, die mit gekühlten und präoxygeniertem aCSF (2 - 4 °C) befüllt wurde. Anschließend wurden die Hirnschnitte sofort in eine spezialanfertigte Messkammer (Interface Kammer, Abbildung 5) überführt, welche mit aCSF perfundiert wurde (Flussrate 1,6 - 2,0 ml/min). Die Temperatur in der Kammer betrug 36 °C ± 1 °C. Eine Oxygenierung erfolgte analog zur Präparation mit einem Gasmisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂. Nach der Präparation erfolgte eine mindestens 60-minütige Erholungsphase vor Messbeginn.

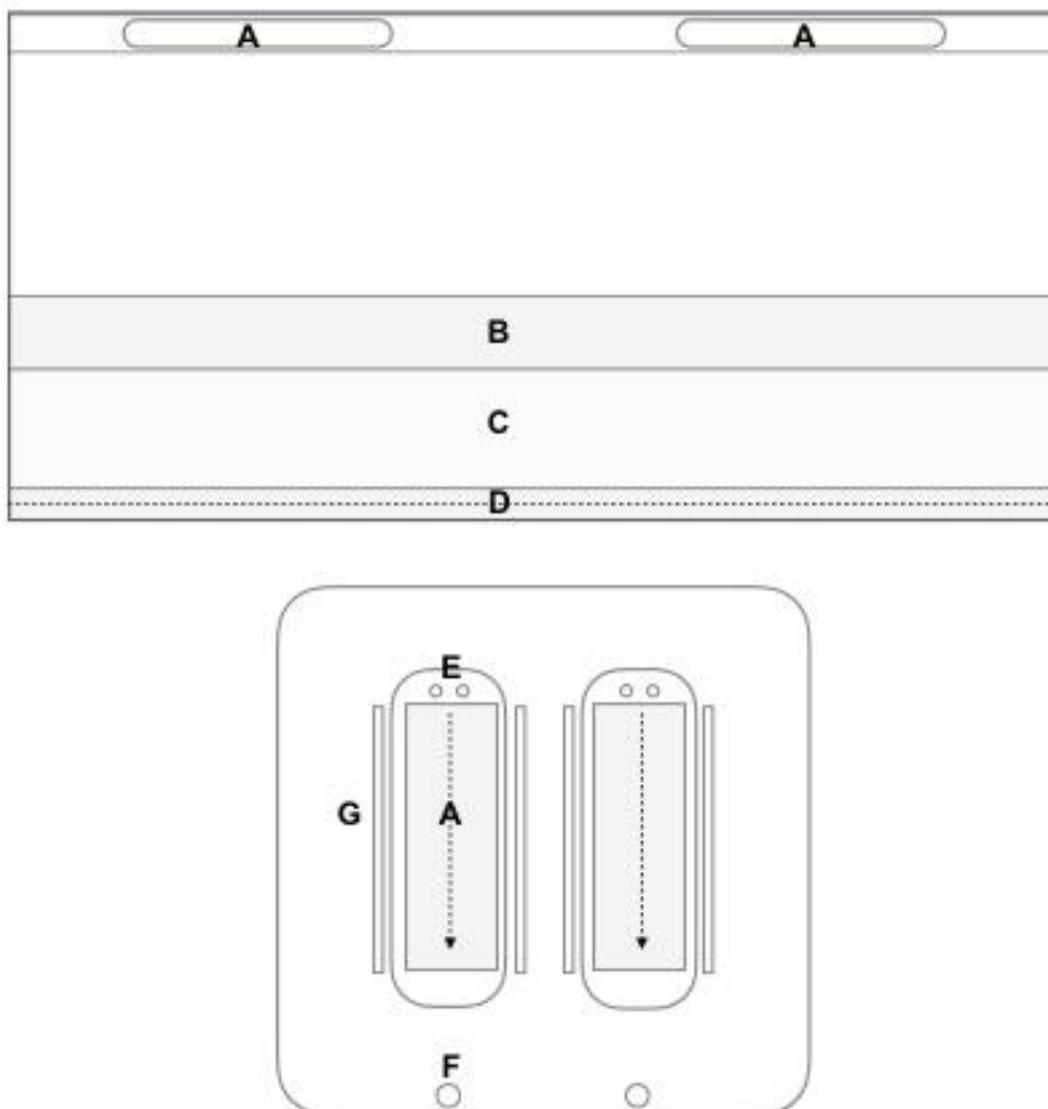


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Interface Kammer: Oben abgebildet ist eine schematische Darstellung der Interface Kammer von vorn. **A:** die beiden Messkammern, **B:** Füllung der Kammer mit Aqua bidest **C:** Bandförmige Folien- Heizung die der Kammer inwendig anliegt und von Aqua bidest umströmt wird. **D:** Als gestrichelte Linie dargestellt ist hier die Zuleitung des Gasmisches in die Kammer. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier nicht mit

abgebildet die Zuleitung des präoxygenierten *aCSFs* und der Verlauf der Leitung durch die untere Kammer. Die untere Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Messkammer von oben **E**: Zuleitung des präoxygenierten *aCSFs* **A** (unteres Bild): Messkammer, in grau unterlegt die mögliche Positionierung der Hirn Schnitte in der Kammer, der Pfeil zeigt die Flussrichtung des *aCSFs* an. **F**: Ablauf des *aCSFs* aus der Kammer **G**: seitlich an der Messkammer liegende Verbindung zwischen unterer und oberer Kammer die den Durchtritt von Gasen erlaubt.

3.3 Chemikalien und Lösungen

Die Aufbewahrung und Regenerierung der Schnitte erfolgte in *aCSF* (Ionen Konzentrationen s.o.). Die Lösung, welche den Serumkonzentrationen an Elektrolyten von Ratten angepasst war (modifizierte Elektrolyt Lösung, mEL) enthielt folgende Zusammensetzung an Elektrolyten (in mM) NaCl 129, NaHCO₃ 21, NaH₂ PO₄ 1,25, MgSO₄ 0,8, CaCl₂ 1,3, KCl 5,7, Glucose 10. Die Osmolarität der Lösung betrug 305 – 312 mOsmol/l. Zur Untersuchung eines zusätzlichen Effektes von Albumin im Rahmen wurde Bovines Serum Albumin in einer Konzentration von 0,2 mM (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in mEL gelöst verwendet, entsprechend ca. 50 % der Albumin Konzentration im Ratten Serum (10, 63). Die epileptiforme Aktivität wurde durch die Badapplikation von ACh 10 µM (Sigma Aldrich) und Physostigmin 2 µM (Sigma Aldrich) induziert. Diese Konzentrationen werden üblicherweise zur Induktion von hippocampalen Oszillationen im Gamma-Frequenz-Bereich verwendet (56). Zur weiteren Charakterisierung der Aktivität wurden 1 µM Atropin (57, Sigma Aldrich) und 50 µM Carbamazepin (26, Sigma Aldrich) verwendet.

3.4 Elektrophysiologie

Die *in vitro* Messungen des extrazellulären Feldpotentials erfolgten in den Schichten V/VI des EC und teilweise in der Region CA3 des Hippocampus.

Für die Ableitung der Feldpotentiale wurden mit *aCSF* gefüllte Glaselektroden verwendet (Durchmesser an der Spitze 2 - 3 µm, Widerstand 2 - 4 MΩ).

In den Kontrollexperimenten und den Experimenten mit Atropin erfolgte eine Stimulation des EC (Schicht V/VI) für 1 Stunde mit kurzen, gepaarten Pulsen alle 30 Sekunden (Puls à 100 µs, Abstand 50 ms, 70 - 90 % der Stimulation die für die maximale Reizantwort benötigt wird). Die Stimulation wurde über eine bipolare Stimulationselektrode (Durchmesser 25 µm, Abstand zwischen den Polen ca. 100 µm) im EC Schicht II/III appliziert. Die Elektrode wurde so ausgerichtet, dass die beiden Pole der

Stimulationselektrode die cortikale Säule, welche senkrecht zur Cortex Oberfläche in die Tiefe verläuft, einschließt. Die Ableitelektrode wurde in den Schichten V/VI des EC platziert. Aufgrund des Faserverlaufs der Neurone erfolgte durch diese Platzierung der Stimulationselektrode eine synaptische Aktivierung der Nervenzellen in den Schichten V/VI des EC. Die so abgeleiteten Signale wurden mittels eines spezialangefertigten, hauseigenen Verstärkers mit Offset- und Kapazitätskompensation verstärkt. Die Daten wurden mit 1 kHz gefiltert und mittels CED 1401 (Cambridge electronics, Cambridge UK) mit einer Aufzeichnungsrate von 5 kHz digitalisiert. Die Aufzeichnung und Erfassung der Daten erfolgte computergestützt mittels Spike2 Software (Cambridge electronic design, Cambridge, UK). Analysiert wurden Amplitude und Ereignisdauer der epileptiformen Aktivität, sowie das *Intereventintervall* (zeitlicher Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden REEs oder *SLEs*). Diese wurden jeweils mittels Cursorfunktion (Spike2 Software) ermittelt. Ereignisse ab 5 s Ereignisdauer wurden hierbei als *SLEs* bezeichnet. Als REEs wurde epileptiforme Aktivität mit einer Ereignisdauer < 5 s bezeichnet. Die entsprechenden Parameter, die zur Analyse herangezogen wurden, sind in Abbildung 6 erläutert. Für die Auswertung wurden pro Messung bei *SLEs* mindestens drei Ereignisse und bei REEs bzw. gemischter Aktivität (REEs und *SLEs*) mindestens 10 Ereignisse herangezogen. Aufgrund der hohen Variabilität der Inzidenz der Ereignisse betrug die Analysedauer zwischen 10 s und 10 min. Es wurden immer die letzten Ereignisse vor der nächsten pharmakologischen Intervention bzw. am Interventionsende (Applikation der nächsthöheren Konzentration bzw. Atropin oder Carbamazepin, Ende Applikationsphase Carbamazepin oder Atropin) ausgewertet. Im Falle von Atropin wurden die letzten 120 Sekunden der Applikationsphase zur Auswertung herangezogen. In diesem Zeitfenster wurde das *Intereventintervall* als zeitlicher Abstand zum letzten (und nicht wie sonst zum nächsten) Ereignis definiert, wobei das letzte Ereignis bereits nicht mehr im Analysezeitfenster lag. Analog hierzu war die Vorgehensweise für die Bestimmung des *SLE-Intereventintervalls* bei Auftreten von gemischter Aktivität aus *SLEs* und REEs vor pharmakologischer Intervention mit Carbamazepin oder Atropin sowie beim Vorliegen von *SLEs* nach pharmakologischer Intervention mit Carbamazepin.

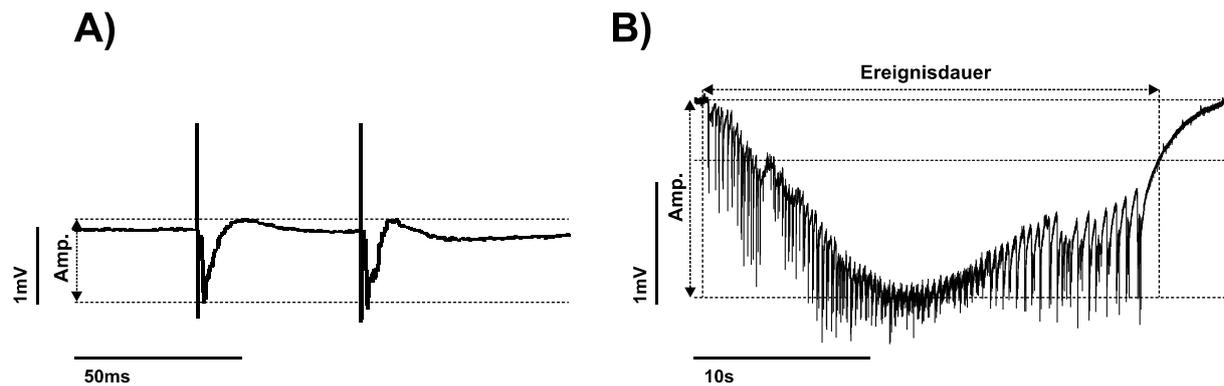


Abbildung 6: Zur Auswertung herangezogene Parameter. A) Hier exemplarisch dargestellt sind Reizantworten auf submaximale Stimulation im EC Schicht II/III abgeleitet im EC Schicht V/VI. Die Amplitude (Amp.) war hierbei definiert als Differenz zwischen Minimum und Maximum des F-EPSPs nach dem Stimulus. **B)** Hier exemplarisch abgebildet sind die Parameter, die zur Analyse eines SLEs herangezogen wurden. Hierbei ist die Amplitude (Amp.) als Differenz zwischen *baseline* und Minimum der Feldpotentialänderung ohne Berücksichtigung der kurzen Ereignisse bzw. *spikes* definiert. Die Ereignisdauer ist als der zeitliche Abstand zwischen Beginn der negativen Feldpotentialänderung und der Rückkehr des Feldpotentials auf 33 % der maximalen Amplitude definiert.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Die Daten wurden jeweils mehrfach mittels *D`agostino & Pearson omnibus normality Test*, *Shapiro-Wilk-normality-Test* und *Kolmogorow-Smirnow-Test* auf Normalverteilung untersucht. Wenn in einem der Tests eine nicht-Normalverteilung gefunden wurde oder $n \leq 6$ war, wurden die Daten als nicht-normalverteilt angenommen.

In der Kontrollgruppe wurde bei Vorhandensein von mehr als zwei Gruppen und gepaarten Werten bei Normalverteilung ein *Repeated measures one way ANOVA Test* verwendet, gefolgt von *Tukey's multiple comparisons* als *post-hoc* Test. War der zu untersuchende Parameter nicht normalverteilt, wurde ein *Friedman-Test* gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* als *post-hoc* Test verwendet.

Für den Vergleich zwischen der Kontroll Gruppe vs. mEL vs. mEL + Albumin (nach Stimulation, s. Kapitel 4.2) wurde bei nicht-gepaarten Experimenten und nicht-normalverteilten zu untersuchenden Parametern ein *Kruskal-Wallis-Test* gefolgt von *Dunn's multiple comparison Test* verwendet, für den Vergleich der SLEs ein *Mann-Whitney-Test*.

In der mit Atropin behandelten Gruppe war die Aktivität in einigen Schnitten komplett geblockt und es traten nicht in allen Schnitten REEs auf, sodass die Experimente nicht als gepaart untersucht wurden. Da keiner der untersuchten Parameter normalverteilt war wurde für die statistische Untersuchung ein *Mann-Whitney-Test* verwendet.

In der mit Carbamazepin behandelten Gruppe traten im Falle von Präinkubation mit mEL nicht in allen Schnitten REEs auf, sodass die Werte vor der Behandlung nicht mit Werten nach Behandlung mit Carbamazepin gepaart waren. Keiner der untersuchten Parameter war normalverteilt, sodass zur weiteren statistischen Untersuchung ein *Mann-Whitney-Test* verwendet wurde. Nach Präinkubation mit mEL + Albumin traten in allen Schnitten REEs auf, sodass die Werte vor Behandlung mit den Werten nach Carbamazepin Applikation gepaart waren. War der untersuchte Parameter nicht normalverteilt, wurde die statistische Untersuchung mittels *Wilcoxon matched pairs signed rank Test* vorgenommen. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte die Untersuchung mittels *gepaartem t-test*. Für den Vergleich der Aktivität vor und nach Applikation von Carbamazepin zwischen den beiden Präinkubationen (s. Kapitel 4.7) wurde bei nicht normalverteilten Parametern der *Mann-Whitney-Test* verwendet.

Für signifikante Änderungen wurde ein p-Wert < 0.05 als signifikant akzeptiert. Alle Daten werden als arithmetisches Mittel \pm SEM angegeben, wobei die Mittelwerte und SEM Werte für die Angabe im Text nach der 2. Dezimalstelle gerundet wurden (letzte Ziffer nach der beizubehaltenden Ziffer 1 - 4: abgerundet, letzte Ziffer nach der beizubehaltenden Ziffer 5 - 9: aufgerundet). Für sehr kurze Zeiten wurde die Darstellung in ms gewählt. Die n- Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der Experimente, pro Gruppe wurden mindestens 3 Tiere verwendet.

3.6 Versuchsaufbau

3.6.1 Kontrollgruppe

In den Kontrollen wurde zunächst eine einstündige Stimulation wie unter 3.4 beschrieben durchgeführt um die Vitalität der Schnitte zu prüfen. Die Experimente wurden nur dann fortgesetzt, wenn die Amplitude der Reizantwort nach einstündiger Stimulation noch mindestens 75 % der Ausgangsamplitude betrug. Anschließend erfolgte die Badapplikation von ACh 10 μ M, nach 29 – 33 min wurde die Konzentration von ACh auf 20 μ M erhöht. Nach weiteren 30 – 32 min wurde die Konzentration von ACh von 20 μ M auf 50 μ M erhöht für wiederum 29 – 31 min. In einem Schnitt wurde die Konzentration 10 μ M ACh nur 20 min appliziert, bei jedoch bereits stabiler Aktivität zu diesem Zeitpunkt

wurde der Schnitt dennoch eingeschlossen. Von Beginn der Einwaschphase an wurde zu jeder Konzentration von ACh der Acetylcholinesterasehemmer Physostigmin in einer Konzentration von 2 μM verwendet, um den Abbau des ACh im synaptischen Spalt zu verlangsamen. In einer Untergruppe ($n = 7$) wurde zusätzlich 1 μM Atropin nach dem Konzentrationsschritt ACh 50 μM verwendet (siehe Abbildung 7).

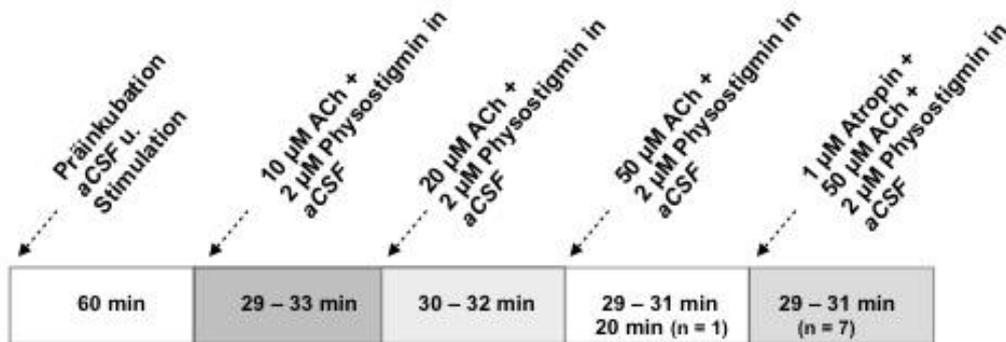


Abbildung 7: Präinkubationsschema Kontrollen

3.6.2 Präinkubation in Testlösungen und Effekte von Atropin

Es erfolgte zunächst eine einstündige Präinkubation in mEL oder in mEL gelöstem Albumin in einer Konzentration von 0,2 mM. Während dieser Phase erfolgte eine Stimulation wie unter 3.4 beschrieben. Die Experimente wurden nur dann fortgesetzt, wenn die Amplitude der Reizantwort nach einstündiger Stimulation noch mindestens 75 % der Ausgangsamplitude betrug. Anschließend erfolgte die Applikation von 10 μ M ACh und 2 μ M Physostigmin zur Induktion epileptiformer Aktivität. Die *wash-in* Phase dauerte 17 – 24 min (n = 12) bzw. 13 min (n = 2). Daran anschließend erfolgte bei mindestens über 2 min stabiler epileptiformer Aktivität die Badapplikation von Atropin 1 μ M, hierbei betrug die *wash-in* Zeit 15 – 25 min (siehe Abbildung 8).

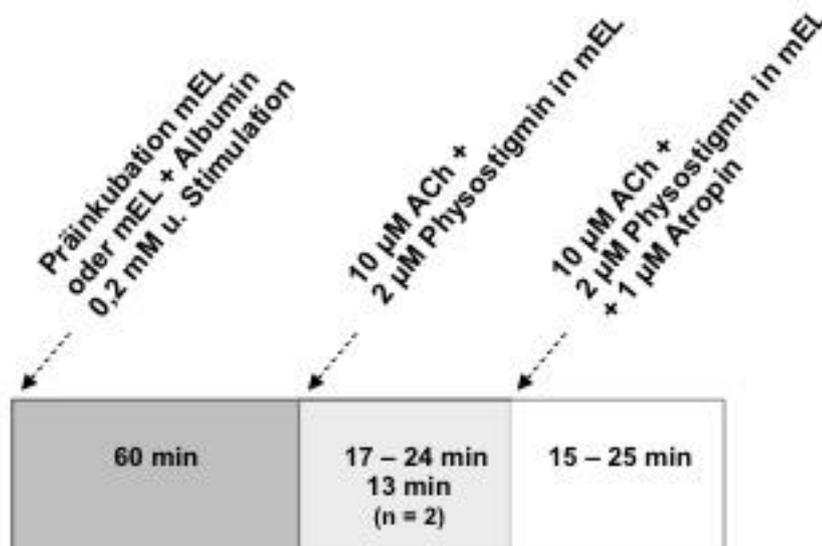


Abbildung 8: Präinkubationsschema mEL vs. mEL + Albumin und Applikation von Atropin

3.6.3 Präinkubation in Testlösungen und Effekte von Carbamazepin

Zur Untersuchung der Frage, ob die epileptiforme Aktivität auf das Antikonvulsivum Carbamazepin sensibel ist, erfolgte zunächst eine einstündige Präinkubation in mEL oder in Albumin 0,2 mM gelöst in mEL. Die Positionierung der Ableitelektroden erfolgte spätestens 60 s vor Ablauf der Präinkubationszeit. Zur Induktion epileptiformer Aktivität erfolgte anschließend die Applikation von ACh 10 μ M und Physostigmin 2 μ M für 30 – 34 min. Die Applikationszeit von ACh betrug hierbei etwa 30 min (gegenüber ca. 20 min in der mit Atropin behandelten Gruppe), um bei teils paralleler Messung mehrerer Schnitte in allen eine stabile epileptiforme Aktivität zu erreichen. Anschließend erfolgte die Badapplikation von 50 μ M Carbamazepin für 29 – 32 min (siehe Abbildung 9).

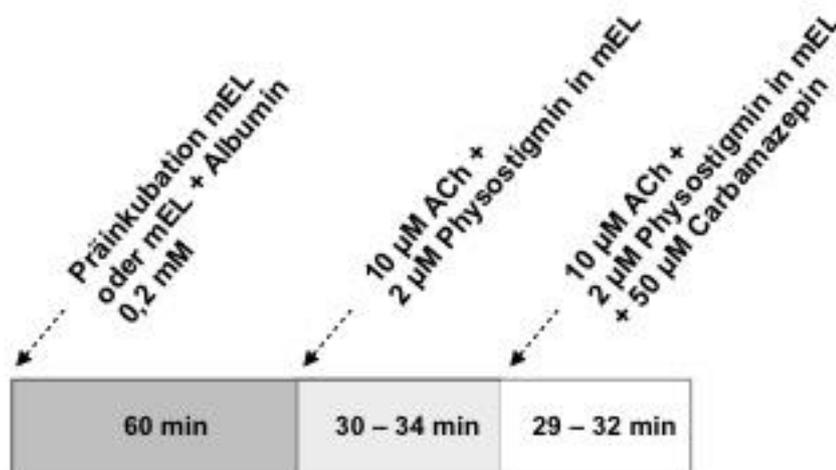


Abbildung 9: Präinkubationsschema mEL vs. mEL + Albumin und Applikation von Carbamazepin

4. Ergebnisse

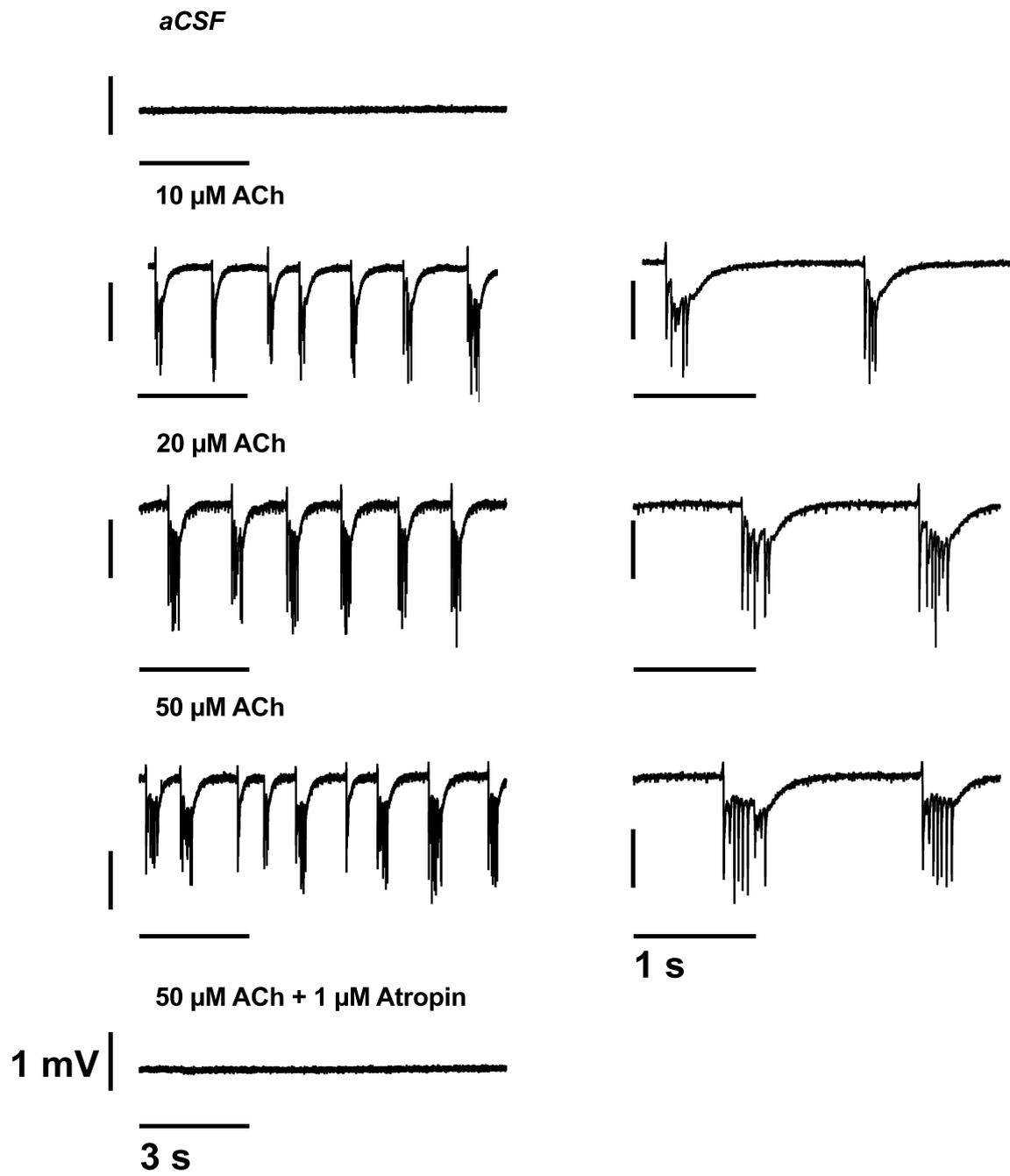
4.1. Kontrollgruppe

In den Kontrollschnitten ($n = 8$) wurde durch die Badapplikation von ACh $10 \mu\text{M}$ und Physostigmin $2 \mu\text{M}$ in $a\text{CSF} < 5 \text{ s}$ anhaltende Negativierungen des Feldpotentials (REEs) mit einer Ereignisdauer von $0,15 \text{ s} \pm 23,36 \text{ ms}$ ($n = 8$) und einer Amplitude von $0,67 \pm 0,12 \text{ mV}$ ($n = 8$) ausgelöst, während unter *baseline* Bedingungen ohne Zugabe von ACh und Physostigmin keine Aktivität ableitbar war. Das *Intereventintervall* betrug $1,08 \pm 0,10 \text{ s}$ ($n = 8$). Zur Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften wurden aufsteigende Dosen von ACh nach dem unter 3.6.1 erläuterten Schema verwendet; in allen Experimenten wurden zusätzlich $2 \mu\text{M}$ Physostigmin verwendet. Es wurden zusätzlich die Konzentrationen $20 \mu\text{M}$ ACh plus $2 \mu\text{M}$ Physostigmin sowie $50 \mu\text{M}$ ACh plus $2 \mu\text{M}$ Physostigmin getestet. Die Applikation von ACh $20 \mu\text{M}$ plus $2 \mu\text{M}$ Physostigmin löste Feldpotentialänderungen mit einer Ereignisdauer von $0,22 \text{ s} \pm 33,36 \text{ ms}$ ($n = 8$) aus, welche in einem *Intereventintervall* von $0,99 \text{ s} \pm 77,51 \text{ ms}$ ($n = 8$) auftraten und eine Amplitude von $0,71 \pm 0,14 \text{ mV}$ ($n = 8$) hatten. Eine weitere Dosissteigerung des ACh auf $50 \mu\text{M}$ in Kombination mit $2 \mu\text{M}$ Physostigmin resultierte in einer Ereignisdauer von $0,23 \text{ s} \pm 35,98 \text{ ms}$ ($n = 8$) bei einem *Intereventintervall* von $0,88 \pm 0,13 \text{ s}$ ($n = 8$). Die Amplitude betrug $0,65 \pm 0,12 \text{ mV}$ ($n = 8$). Im Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Amplituden zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von ACh. Im *Friedman-Test* waren die *Intereventintervalle* verschieden ($p = 0,038$, *Friedman-Test ANOVA*, $10 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$ vs. $20 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$ vs. $50 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$), es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bei *post-hoc* Analyse mittels *Dunn`s multiple comparison Test*, sodass dieser Unterschied als nicht signifikant gewertet wurde. Die Ereignisdauer der Feldpotentialänderungen zeigte sich mit höheren Konzentrationen von ACh signifikant verlängert ($p = 0,034$, *Repeated measures one way ANOVA*, $10 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$ vs. $20 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$ vs. $50 \mu\text{M}$ ACh: $n = 8$), bei vergleichender *post-hoc* Analyse der einzelnen Gruppen zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen $10 \mu\text{M}$ ACh und $50 \mu\text{M}$ ACh (*adjusted p* = $0,045$, *Tukey`s multiple comparison*). Die Amplituden der Reizantwort auf submaximale Stimulation betrugen $1,04 \pm 0,12 \text{ mV}$ ($n = 8$) zu Beginn der Stimulation und $0,90 \pm 0,09 \text{ mV}$ ($n = 8$) zum Ende der einstündigen Stimulation. In sieben von acht Schnitten wurde zusätzlich Atropin $1 \mu\text{M}$ appliziert, die *wash-in* Dauer betrug 29 – 30 min. Die Applikation von Atropin $1 \mu\text{M}$ führte zum Sistieren der epileptiformen Aktivität.

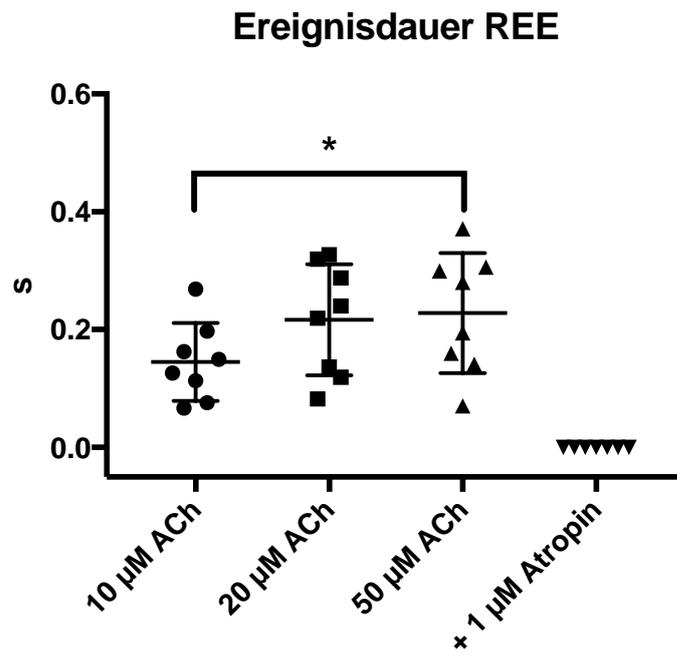
Da sich bereits mit einer Konzentration von 10 μM ACh eine ausgeprägte, stabile Aktivität auslösen ließ und sich durch diese Konzentrationen üblicherweise Oszillationen im Gamma-Frequenzspektrum im Hippocampus auslösen lassen, wurde für die weiteren Experimente die kleinste hier getestete Dosis von ACh (10 μM) verwendet.

Zusammenfassend kam es in den Kontrollen durch die Applikation von ACh zu kurzen, epileptiformen Ereignissen im Sinne von REEs. Die Aktivität mit höheren Konzentrationen von ACh (20 μM , 50 μM) unterschied sich nicht signifikant hinsichtlich *Intereventintervall* und Amplitude, die Ereignisdauer war jedoch nach Applikation von 50 μM ACh signifikant länger als nach der Applikation von 10 μM ACh (siehe Abbildung 10). Die epileptiforme Aktivität sistierte nach Applikation von Atropin 1 μM .

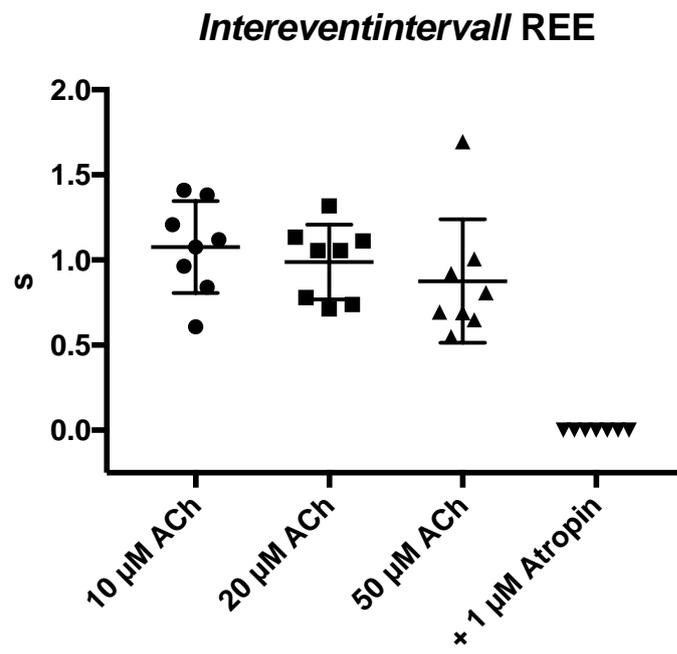
A)



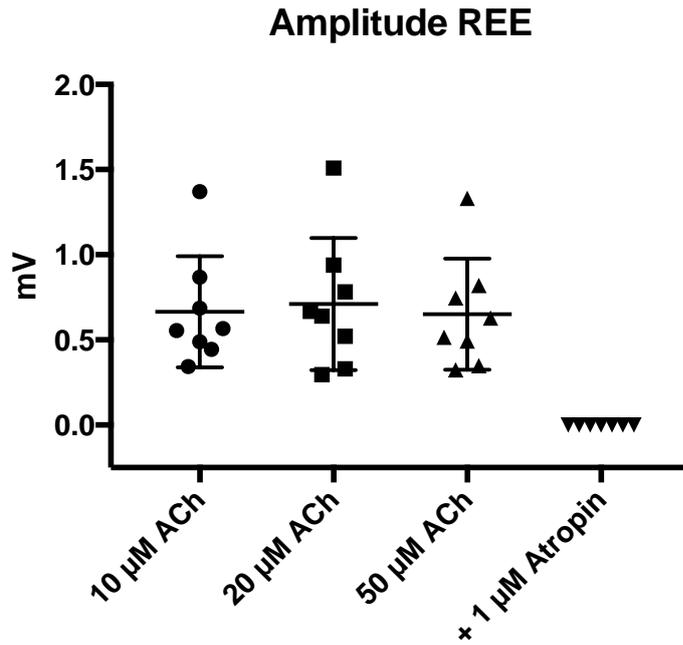
B)



C)



D)



E)

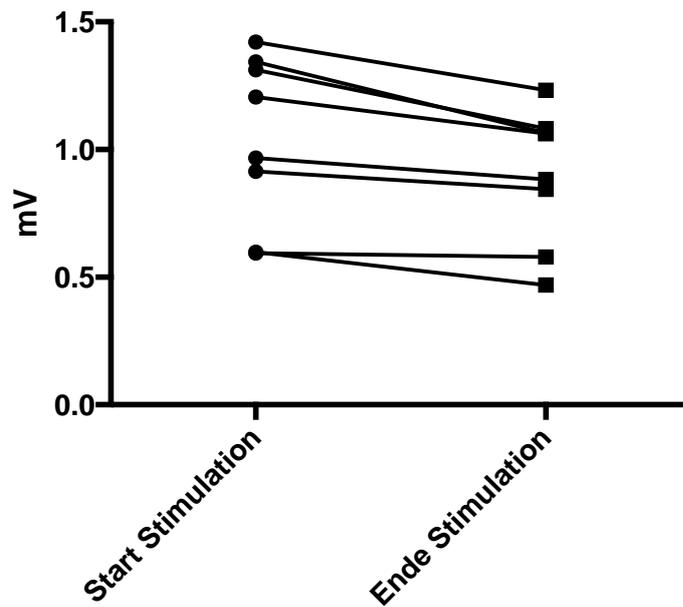


Abbildung 10: Charakterisierung der Aktivität in der Kontrollgruppe A) Exemplarisch dargestellte Feldpotentiale abgeleitet im EC Schicht V/VI in naiven Rattenhirnschnitten oben unter *baseline* Bedingungen in *aCSF*, darunter mit aufsteigenden Konzentrationen von ACh 10 µM, 20 µM und 50 µM + jeweils 2 µM Physostigmin auf der linken Seite und auf der rechten Seite in höherer zeitlicher Auflösung. Ganz unten nach Applikation von zusätzlich 1 µM Atropin. Um zu veranschaulichen, dass nach der zusätzlichen Applikation von 1 µM Atropin (n = 7) keine

Aktivität mehr auftrat, wurden Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude für die Abbildung **B) - D)** gleich null gesetzt und ohne SEM abgebildet. **B)** Ereignisdauer unter den unterschiedlichen Konzentrationen von ACh 10 μM , 20 μM und 50 μM + jeweils 2 μM Physostigmin. (*) Signifikant verlängerte Ereignisdauer mit ACh 50 μM im Vergleich zu ACh 10 μM ($p = 0,034$, *Repeated measures one way ANOVA*, gefolgt von *Tukey's multiple comparison*, adjusted $p = 0,045$) **C)** *Intereventintervall* unter den aufsteigenden Konzentrationen von ACh 10 μM , 20 μM und 50 μM + jeweils 2 μM Physostigmin. **D)** Amplitude unter den unterschiedlichen Konzentrationen von ACh 10 μM , 20 μM und 50 μM + jeweils 2 μM Physostigmin **E)** Amplituden der Reizantworten auf submaximale Stimulation in Schicht II/III abgeleitet im EC Schicht V/VI zu Beginn und Ende der Stimulation.

4.2. Effekte von Acetylcholin und Physostigmin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung oder mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin

Hier wurden die durch ACh und Physostigmin induzierten Veränderungen in Kontrollen vs. Präinkubation mEL vs. Präinkubation mEL + Albumin (und nach jeweils einstündiger Stimulation) verglichen.

Hinsichtlich des Musters der epileptiformen Aktivität ließen sich mehrere Gruppen unterscheiden. In den Kontrollen traten ausschließlich REEs auf (siehe Kapitel 4.1, zusammenfassende tabellarische Aufstellung der Aktivitätsmuster siehe Tabelle 1). In der Gruppe die mit mEL vorbehandelt wurde (siehe auch Kapitel 4.3) kam es in fünf von sieben Schnitten zum gleichzeitigen Auftreten von *SLEs* und hochfrequenten REEs. In zwei von sieben Schnitten kam es zum ausschließlichen Auftreten von REEs. Nach der Präinkubation mit mEL + Albumin (siehe auch Kapitel 4.4) kam es in vier von sieben Schnitten zum gleichzeitigen Auftreten von *SLE* und REEs, in einem von sieben Schnitten kam es zum ausschließlichen Auftreten von REEs und in zwei von sieben Schnitten traten ausschließlich *SLEs* auf.

Im Folgenden werden REEs und *SLEs* getrennt voneinander betrachtet. Da REEs das vorherrschende Aktivitätsmuster waren, wird in der weiteren Analyse auf REEs fokussiert.

Die Ereignisdauer der REEs nach Präinkubation mit mEL ($0,81 \pm 0,39$ s, $n = 7$) war im Vergleich zu den REEs in den Kontrollen ($0,15 \text{ s} \pm 23,36$ ms, $n = 8$) statistisch signifikant länger ($p = 0,007$, *ANOVA*, *Kruskal-Wallis-Test*, *aCSF*: $n = 8$ vs. mEL: $n = 7$ vs. mEL + Alb.: $n = 5$, gefolgt von *Dunn's multiple comparison test*, adjusted $p = 0,010$ für *aCSF* vs. mEL). Die Ereignisdauer nach Präinkubation in mEL war nicht statistisch

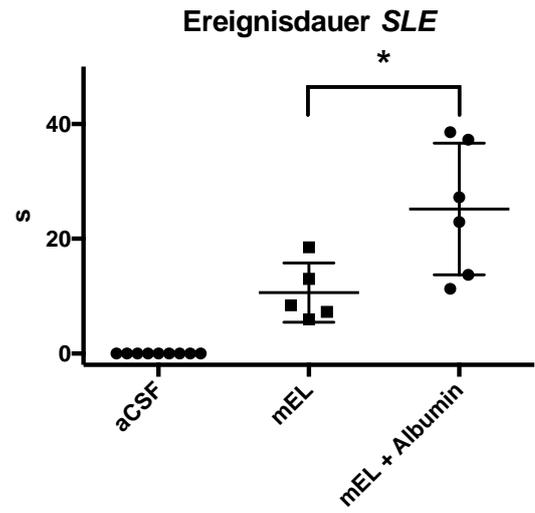
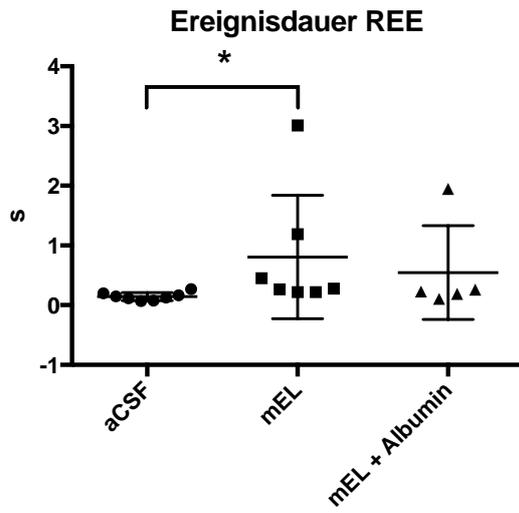
signifikant anders als die nach Präinkubation in mEL + Albumin ($0,55 \pm 0,35$ s, $n = 5$). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Ereignisdauer der REEs nach Präinkubation mit mEL + Albumin und der Ereignisdauer unter Kontrollbedingungen (aCSF) gefunden werden. Die Amplituden der Ereignisse betragen unter Kontrollbedingungen in aCSF $0,67 \pm 0,12$ mV ($n = 8$) und $0,94 \pm 0,12$ mV ($n = 7$) nach Präinkubation mit mEL, während die Amplituden nach Präinkubation mit mEL + Albumin $0,74 \pm 0,12$ mV ($n = 5$) betragen. Der Vergleich der Amplituden zwischen den Gruppen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das REE-*Intereventintervall* in den Kontrollschnitten nach Präinkubation in aCSF betrug $1,08 \pm 0,10$ s ($n = 8$), nach mEL Präinkubation $2,05 \pm 0,44$ s ($n = 7$) und nach mEL + Albumin Präinkubation $2,01 \pm 0,30$ s ($n = 5$). Im *Kruskal-Wallis-Test* waren die Gruppen voneinander verschieden ($p = 0,014$, *ANOVA Kruskal-Wallis-Test*, aCSF: $n = 8$ vs. mEL: $n = 7$ vs. mEL+ Alb.: $n = 5$), was sich jedoch in der *post-hoc* Analyse mittels *Dunn's multiple comparison Test* nicht bestätigt hat. Daher wurden die *Intereventintervalle* als nicht unterschiedlich gewertet.

SLEs traten ausschließlich nach Vorbehandlung mit mEL und mEL + Albumin auf. Die Ereignisdauer der *SLEs* nach mEL-Vorbehandlung betrug $10,63 \pm 2,30$ s ($n = 5$), während die Amplitude $1,10 \pm 0,06$ mV ($n = 5$) betrug. Das *Intereventintervall* zwischen den *SLEs* nach mEL-Vorbehandlung betrug $65,32 \pm 26,08$ s ($n = 5$). Die *SLEs* nach Vorbehandlung mit mEL + Albumin hatten eine Ereignisdauer von $25,18 \pm 4,69$ s ($n = 6$) und eine Amplitude von $1,64 \pm 0,37$ mV ($n = 6$), während das *Intereventintervall* $81,55 \pm 19,07$ s ($n = 6$) betrug. Im Vergleich der *SLEs* zwischen mEL vs. mEL + Albumin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Amplitude und *Intereventintervall*. Die Ereignisdauer der *SLEs* nach Präinkubation mit mEL + Albumin war signifikant länger ($p = 0,030$, *Mann-Whitney-Test*, $n = 5$ vs. $n = 6$) als nach Vorbehandlung mit mEL.

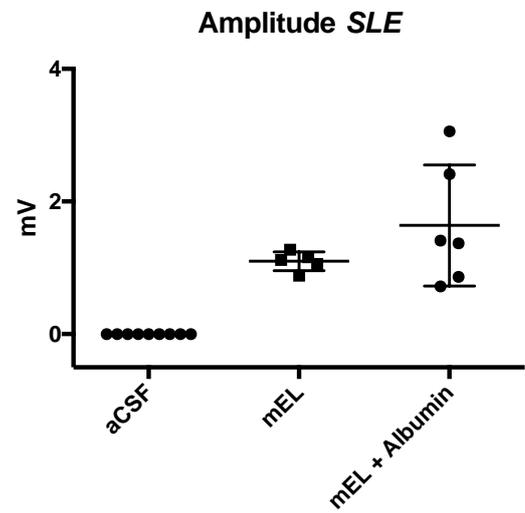
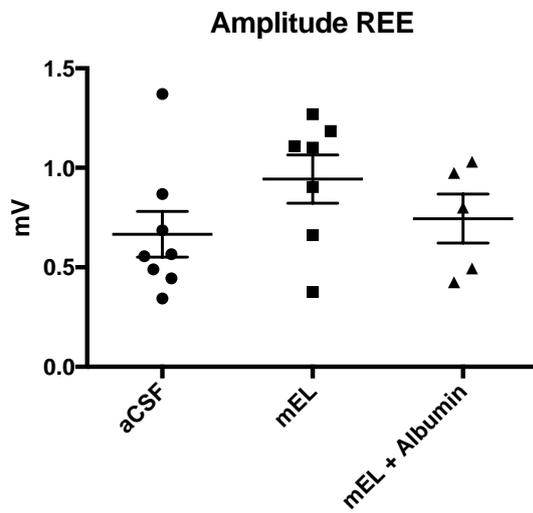
Zusammenfassend kam es in den Kontrollen durch die Applikation von ACh und Physostigmin zu kurzen epileptiformen Ereignissen im Sinne von REEs, während es nach Präinkubation in mEL oder mEL + Albumin zum Auftreten von REEs und *SLEs* kam. Hierbei war die Ereignisdauer der REEs nach Präinkubation mit mEL signifikant länger als in den Kontrollen. *SLEs* waren signifikant länger nach Vorbehandlung mit mEL + Albumin im Vergleich zu mEL allein, es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der *SLE-Intereventintervalle*. Die *Intereventintervalle* zwischen den REEs nach Präinkubation in mEL und mEL + Albumin unterschieden sich nicht

signifikant von den *Intereventintervallen* in den Kontrollen (siehe Abbildung 11, Tabelle 1 und 2).

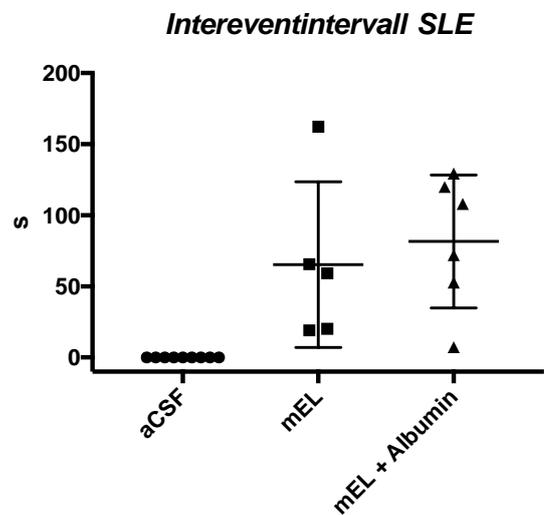
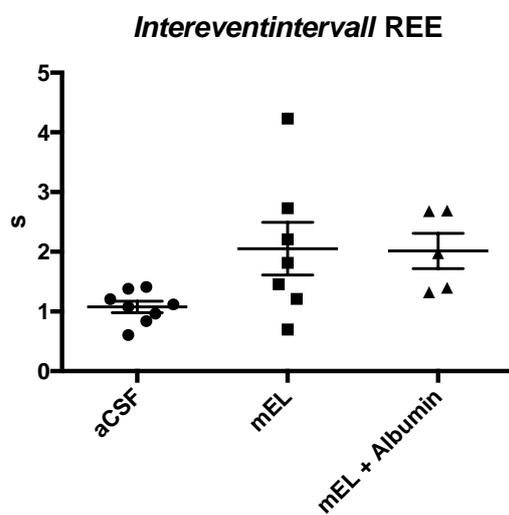
A)



B)



C)



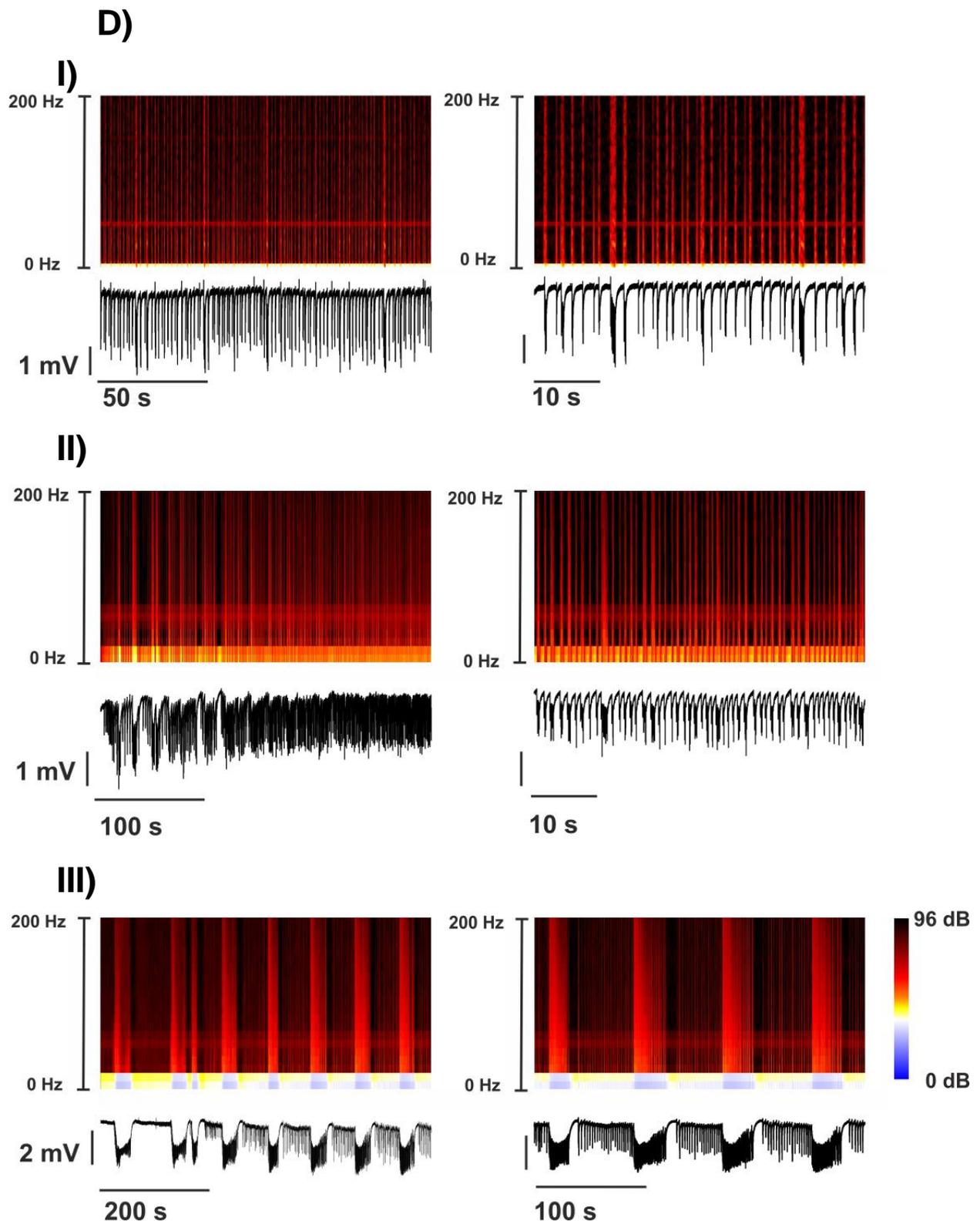


Abbildung 11: Vergleich der Aktivität in der Kontrollgruppe vs. mEL vs. mEL + Albumin

A) Vergleich der Ereignisdauer zwischen aCSF vs. mEL vs. mEL + Albumin nach Aktivitätsformen unterteilt: Linksseitig dargestellt ist die Ereignisdauer der REEs nach den unterschiedlichen Präinkubationen und in Anwesenheit von 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin, auf der rechten Seite ist die Ereignis Ereignisdauer der SLEs abgebildet. Die Ereignisdauer der REEs war nach

Präinkubation mit mEL signifikant länger als unter *aCSF* (*, $p = 0,007$, ANOVA, *Kruskal-Wallis-Test* gefolgt von *Dunn's multiple comparison Test*, *adjusted p* = 0,010), während die Unterschiede zwischen mEL vs. mEL + Albumin und zwischen *aCSF* vs. mEL + Albumin nicht signifikant waren. *SLEs* traten nur nach Vorbehandlung mit mEL und nach Vorbehandlung mit mEL + Albumin auf, hierbei war die Ereignisdauer der *SLEs* im Vergleich signifikant länger (*) nach Vorbehandlung mit mEL + Albumin ($p = 0,030$, *Mann-Whitney-Test*). Um zu veranschaulichen, dass es in den Kontrollen nicht zu epileptiformer Aktivität in Form von *SLEs* kam wurde die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für *SLEs* in den Kontrollen für die Abbildung gleich null gesetzt und ohne SEM abgebildet. **B)** Vergleich der Amplituden zwischen den einzelnen Vorbehandlungen, linksseitig der REEs und rechtsseitig der *SLEs*. Es zeigten sich bei vergleichender Betrachtung keine signifikanten Unterschiede. **C)** Das REE-*Intereventintervall* unterschied sich nach mEL Präinkubation und nach Präinkubation mit mEL + Albumin nicht signifikant von den Kontrollen. Auf der rechten Seite das *Intereventintervall* zwischen den *SLEs*, welches sich ebenfalls nicht signifikant unterschied. **D)** Links: Exemplarische Darstellung längerer Abschnitte mit verschiedenen Aktivitätstypen und korrespondierendem Sonogramm (farbcodierte Darstellung der Frequenzverteilung und *Power* der jeweiligen Frequenzen in den Ereignissen in dB), rechts in höherer zeitlicher Auflösung unter **I)** Kontrollbedingungen **II)** nach Präinkubation mit mEL + Albumin **III)** nach Präinkubation mit mEL. Die durchgehende Linie bei 50 Hz ist durch Rauschsignale bedingt. Die unterschiedlichen Zeitachsen sind den verschiedenen Aktivitätsformen geschuldet und wurden so gewählt, dass die Anschaulichkeit der Frequenzverteilung gewahrt wird.

Präinkubation	REEs	<i>SLEs</i>	REEs u. <i>SLEs</i>	n total
<i>aCSF</i>	8/8	-	-	8
mEL	2/7	-	5/7	7
mEL+ Albumin	1/7	2/7	4/7	7

Tabelle 1: Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen der Kontrollgruppe vs. mEL vs. mEL + Albumin Tabellarische Aufstellung der auftretenden Aktivitätsmuster nach den unterschiedlichen Präinkubationen

Präinkubation	REEs	SLEs
<i>aCSF</i>	0,15 s ± 23,36 ms, n = 8	-
mEL	0,81 ± 0,39 s, n = 7	10,63 ± 2,30 s, n = 5
mEL + Albumin	0,55 ± 0,35 s, n = 5	25,18 ± 4,69 s, n = 6

Tabelle 2: tabellarische Zusammenfassung der Ereignisdauer in der Kontrollgruppe sowie nach Präinkubation mEL und mEL + Albumin (vor Applikation von Atropin)

4.3 Effekte von Atropin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung

Um zu evaluieren, ob die durch ACh und Physostigmin ausgelöste epileptiforme Aktivität muskarinerg vermittelt ist, erfolgte eine Behandlung mit Atropin. Nach einer einstündigen Präinkubation in mEL (n = 7) und Stimulation wurde durch die Badapplikation von ACh 10 µM und Physostigmin 2 µM in mEL epileptiforme Aktivität im EC ausgelöst. Wie in Kapitel 4.2 dargestellt unterschied sich die so induzierte Aktivität von den Kontrollen in *aCSF*.

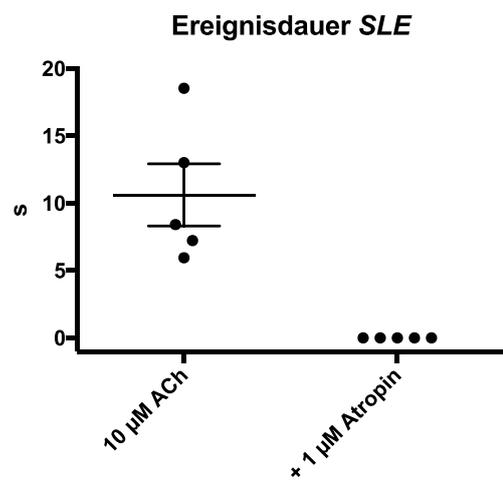
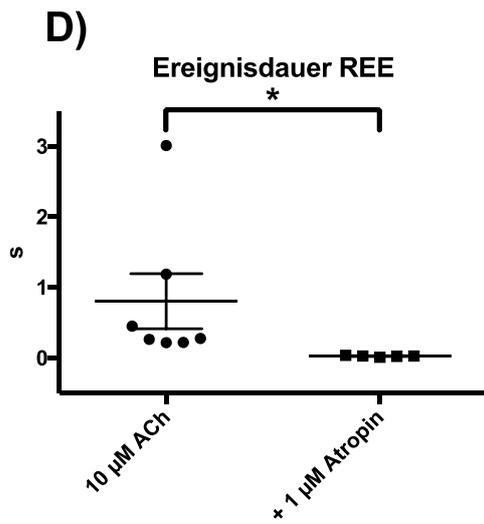
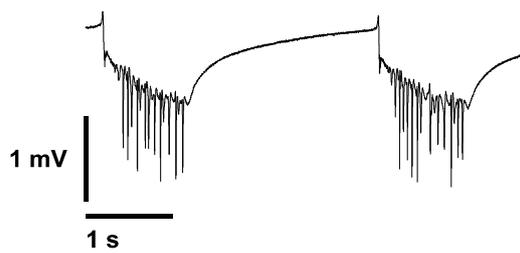
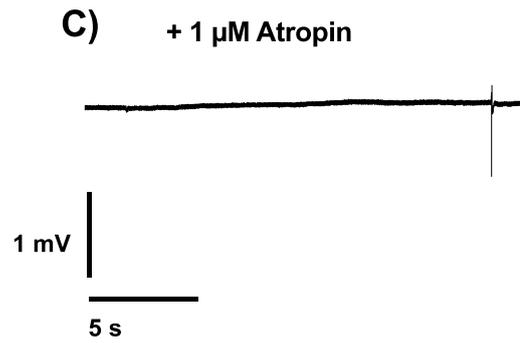
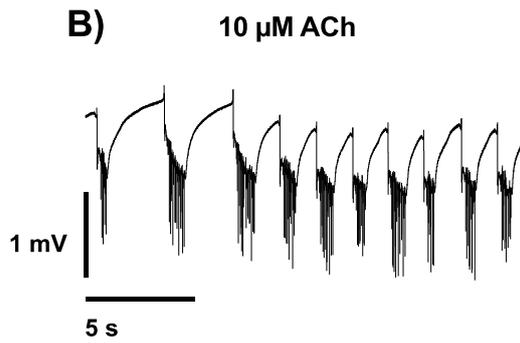
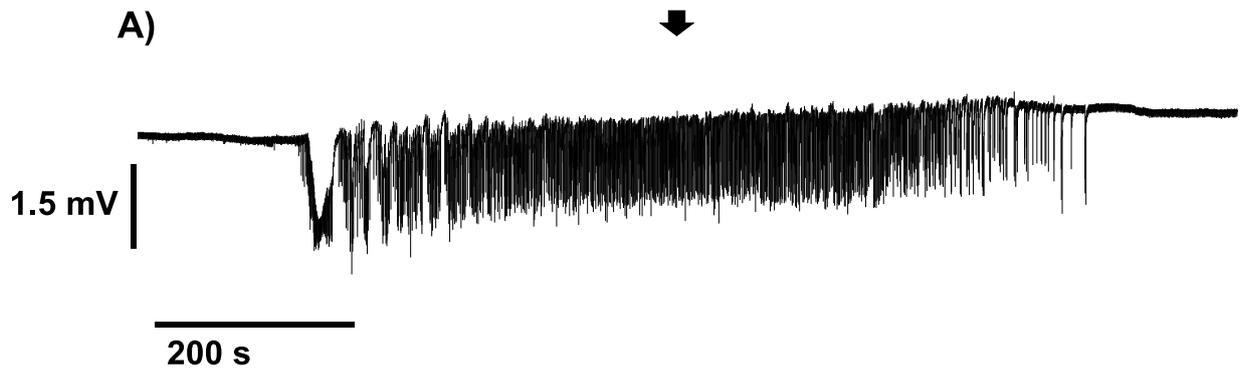
Hinsichtlich des Musters der epileptiformen Aktivität ließen sich zwei Gruppen unterscheiden: In fünf von sieben Schnitten konnten *SLEs* gemischt mit *REEs* beobachtet werden; in zwei von sieben Schnitten kam es zum Auftreten von *REEs* (siehe Tabelle 3).

Die induzierten *REEs* hatten eine Amplitude von $0,94 \pm 0,12$ mV (n = 7) und eine Ereignisdauer von $0,81 \pm 0,39$ s (n = 7). Das *Intereventintervall* zwischen den *REEs* betrug $2,05 \pm 0,44$ s (n = 7). Die Dauer der *wash-in* Phase betrug 17 – 22 min, in n = 2 betrug diese 13 min. Die induzierten *SLEs* hatten eine Ereignisdauer von $10,63 \pm 2,30$ s (n = 5) und eine Amplitude von $1,10 \pm 0,06$ mV (n = 5), während das *Intereventintervall* $65,32 \pm 26,08$ s (n = 5) betrug. Zur näheren pharmakologischen Charakterisierung der epileptiformen Aktivität erfolgte nach Erreichen einer stabilen Aktivität die Badapplikation von 1 µM Atropin in mEL (+ 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin).

Nach einer 15 – 25 min dauernden *wash-in* Phase von Atropin 1 µM zeigte sich die Ereignisdauer der *REEs* auf $26,87 \pm 4,28$ ms (n = 5) reduziert, in zwei von sieben Schnitten konnte die Aktivität (*SLEs* und *REEs*) komplett geblockt werden. Die Reduktion der Ereignisdauer war statistisch signifikant (p = 0,003, *Mann-Whitney-Test*, n = 7 vs. n = 5). Die Amplitude der Ereignisse betrug nach dem *wash-in* $1,03 \pm 0,17$ mV (n = 5). Das *Intereventintervall* war mit $67,24 \pm 18,92$ s (n = 5, p = 0,003, *Mann-Whitney-Test*,

n = 7 vs. n = 5) signifikant verlängert. *SLEs* traten nach der Applikation von Atropin nicht mehr auf. Die Amplituden der Reizantwort auf submaximale Stimulation während der einstündigen Präinkubation betragen $1,05 \pm 0,21$ mV (n = 7) zu Beginn der Stimulation und $1,65 \pm 0,33$ mV (n = 7) am Ende der Stimulation.

Zusammenfassend kam es nach Präinkubation in mEL durch die Applikation von ACh und Physostigmin zum Auftreten epileptiformer Aktivität in Form von REEs und *SLEs* (siehe Abbildung 12). Durch die Applikation von Atropin war die Ereignisdauer der REEs signifikant verkürzt und das *Intereventintervall* signifikant verlängert. *SLEs* wurden durch die Applikation von Atropin vollständig blockiert.



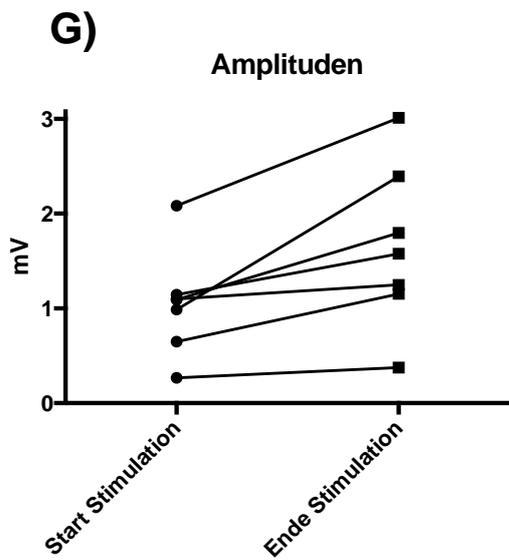
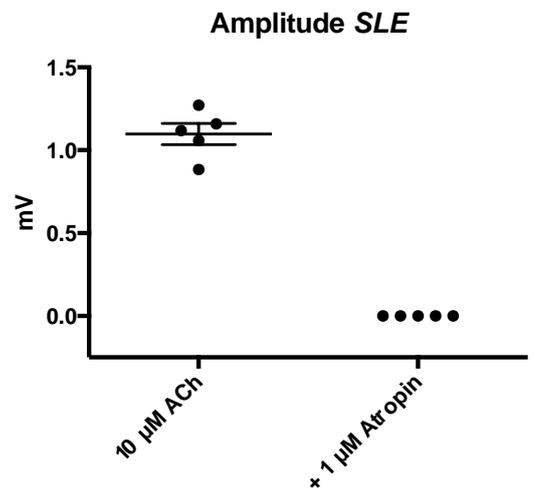
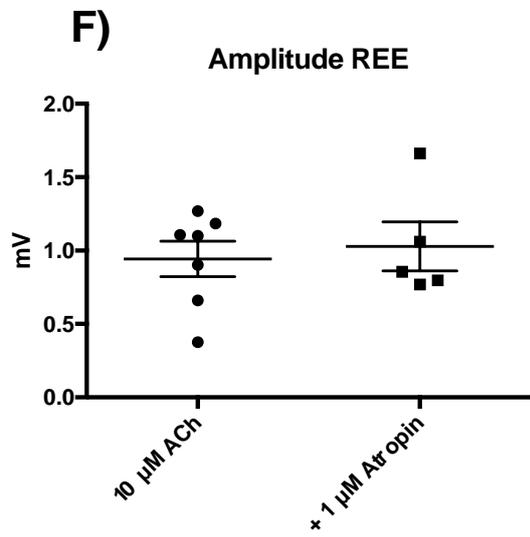
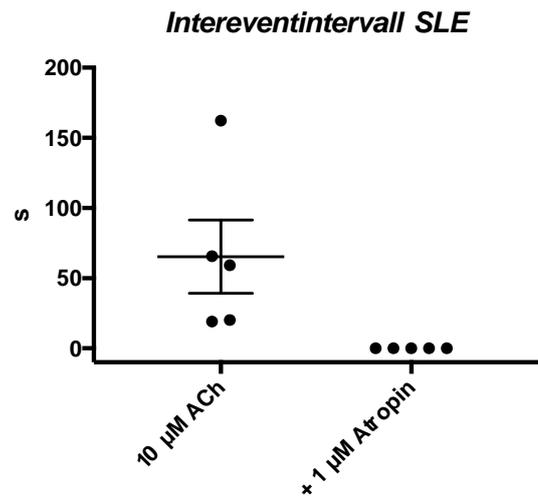
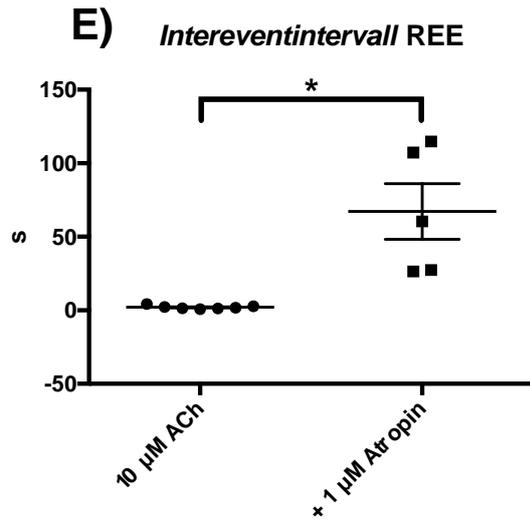


Abbildung 12: Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL, Applikation von ACh und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Atropin

A) Exemplarisch abgebildet ein längerer Ausschnitt aus einem Experiment, abgebildet ist epileptiforme Aktivität in Form von REEs im EC (Schicht V/VI), der Pfeil markiert den *wash-in* von Atropin 1 µM. **B- C)** Beispiele für Änderungen des Feldpotentials im EC (Schichten V/VI) in naiven Rattenhirnschnitten nach Präinkubation in mEL und nach anschließender Badapplikation von 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin (gelöst in mEL) (**B**) sowie nach zusätzlicher Applikation von 1 µM Atropin (**C**). Die untere Abbildung in **B)** zeigt eine höhere zeitliche Auflösung. **D) - F)** zeigen den Vergleich der Parameter Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude vor und nach zusätzlicher Atropinapplikation unterteilt nach Aktivitätsform (links REEs und rechts *SLEs*) Wenn die epileptiforme Aktivität in Form von *SLEs* nach Applikation von Atropin nicht mehr auftrat wurde aus Gründen der Anschaulichkeit die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für *SLEs* nach Applikation von Atropin für die Abbildung gleich null gesetzt und der entsprechende Parameter jeweils ohne SEM abgebildet. **D)** Signifikante (*) Reduktion der Ereignisdauer der REEs (links, $p = 0,003$, *Mann-Whitney-Test*) mit 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin sowie nach Applikation von 1 µM Atropin. Auf der rechten Seite ist die Ereignisdauer der *SLEs* abgebildet. Unter **E)** links abgebildet ist die signifikante (*) Verlängerung des *REE-Intereventintervalls* ($p = 0,003$, *Mann-Whitney-Test*) nach der zusätzlichen Applikation von Atropin 1 µM. Rechts sind die *SLE-Intereventintervalle* abgebildet. Unter **F)** linksseitig dargestellt ist die Amplitude der REEs mit 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin und nach Applikation von 1 µM Atropin, während rechtsseitig die Amplitude der *SLEs* mit 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin sowie nach zusätzlicher Atropinapplikation abgebildet ist. **G)** Amplituden der Reizantworten auf submaximale Stimulation in Schicht II/III des EC abgeleitet im EC (Schicht V/VI) zu Beginn und Ende der Stimulation.

Präinkubation	REEs	<i>SLEs</i>	REEs u. <i>SLEs</i>	n total
mEL	2/7	-	5/7	7
+ Atropin	5/7	-	-	7

Tabelle 3: Aktivitätsmuster in der mEL Gruppe vor und nach Applikation von Atropin Tabellarische Aufstellung der auftretenden Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL und vor Applikation von Atropin

4.4 Effekte von Atropin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin

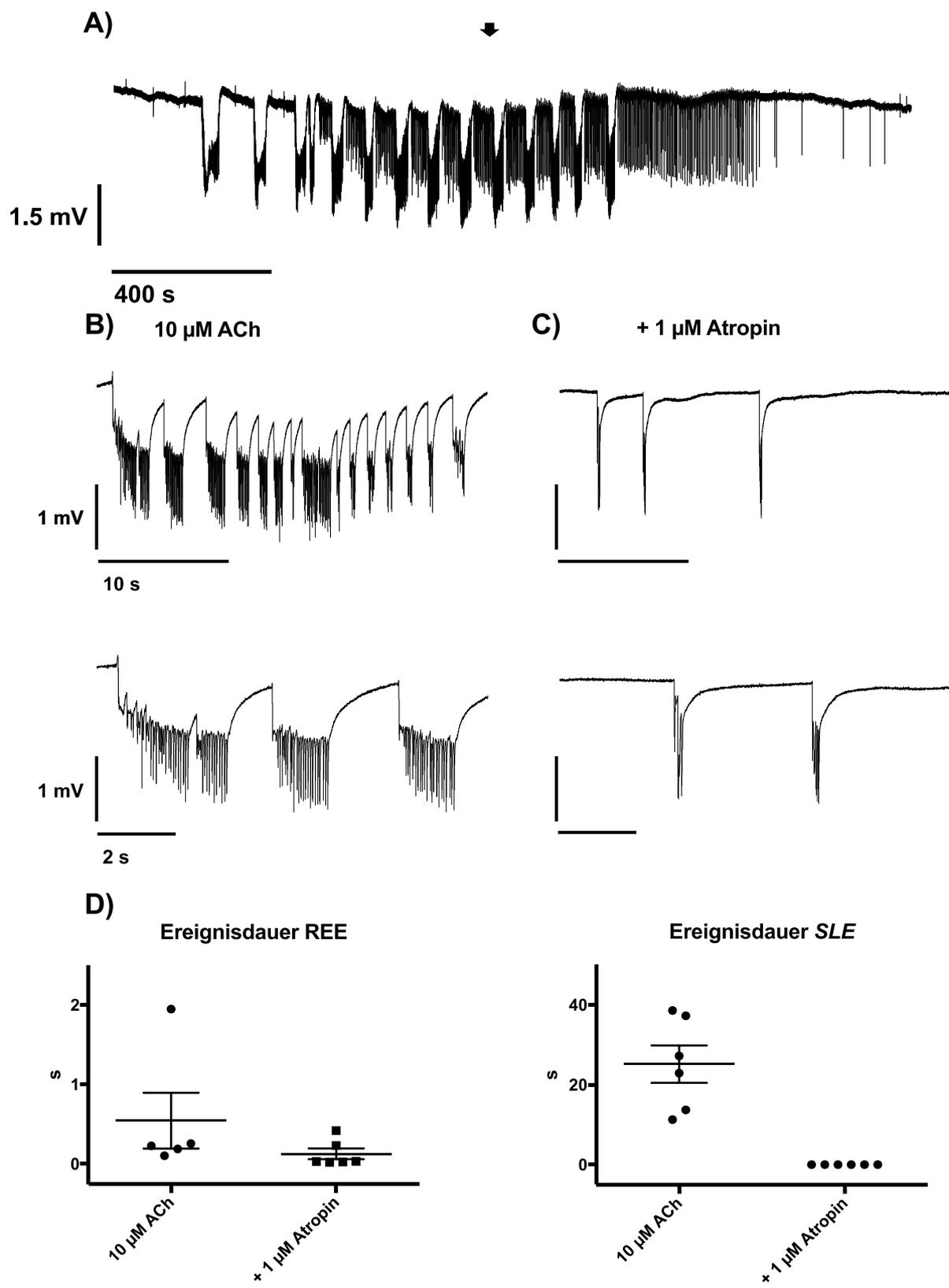
Um einen zusätzlichen Effekt von Albumin während einer akuten BHSS zu evaluieren erfolgte eine Koapplikation von Albumin und eine anschließende Behandlung mit Atropin. Hierzu erfolgte zunächst eine einstündige Präinkubation und Stimulation der Hirnschnitte in 0.2 mM Albumin gelöst in mEL (n = 7). Anschließend erfolgte die Badapplikation von ACh in einer Konzentration von 10 μ M und Physostigmin 2 μ M gelöst in mEL. Hierdurch wurde epileptiforme Aktivität (REEs und SLEs) im EC Schicht V/VI ausgelöst, welche sich von der Aktivität unter Kontrollbedingungen unterschied (siehe Kapitel 4.2).

Nach der Präinkubation in mEL + Albumin kam es in vier von sieben Schnitten zum Auftreten von SLE gemischt mit REEs, in einem von sieben Schnitten kam es zum Auftreten von REEs und in zwei von sieben Schnitten traten ausschließlich SLEs auf (siehe Tabelle 4).

Die induzierten REEs hatten eine Ereignisdauer von $0,55 \pm 0,35$ s (n = 5) und eine Amplitude von $0,74 \pm 0,12$ mV (n = 5). Das *Intereventintervall* zwischen den REEs betrug $2,01 \pm 0,30$ s (n = 5). Die SLEs hatten eine Ereignisdauer von $25,18 \pm 4,69$ s (n = 6) und eine Amplitude von $1,64 \pm 0,37$ mV (n = 6), während das *Intereventintervall* zwischen den SLEs $81,55 \pm 19,07$ s (n = 6) betrug. Die Dauer der *wash-in* Phase betrug 18 – 24 min, daran anschließend erfolgte die Badapplikation von 1 μ M Atropin in mEL (+ 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin). Nach einer 18 – 23 min andauernden *wash-in* Phase von Atropin 1 μ M betrug die Ereignisdauer $0,13$ s \pm 67,51 ms (n = 6), es kam nicht mehr zum Auftreten von SLEs. In einem Schnitt, in dem zuvor nur SLEs auftraten, traten nach Applikation von Atropin weder SLEs noch REEs auf. Im Vergleich war die Ereignisdauer der REEs vor *wash-in* ($0,55 \pm 0,35$ s, n = 5) und nach *wash-in* ($0,13$ s \pm 67,51 ms, n = 6) nicht signifikant verändert. Die Amplitude betrug nach dem *wash-in* $0,78 \pm 0,20$ mV (n = 6), während das REE-*Intereventintervall* $109,7 \pm 63,58$ s (n = 6) betrug und damit signifikant verlängert war (p = 0,004, *Mann-Whitney-Test*, n = 5 vs. n = 6). Die Amplituden der Reizantwort auf submaximale Stimulation während der einstündigen Präinkubation betragen $1,25 \pm 0,21$ mV (n = 7) zu Beginn der Stimulation und $1,69 \pm 0,18$ mV (n = 7) am Ende der Stimulation.

Zusammenfassend kam es auch nach Präinkubation in mEL + Albumin durch die Applikation von ACh und Physostigmin zum Auftreten epileptiformer Aktivität in Form von REEs und SLEs (siehe Abbildung 13). Durch die Applikation von Atropin wurde diese Aktivität moduliert und das *Intereventintervall* signifikant verlängert. Eine prolongierte

epileptiforme Aktivität in Form von *SLEs* trat nach der Applikation von Atropin nicht mehr auf.



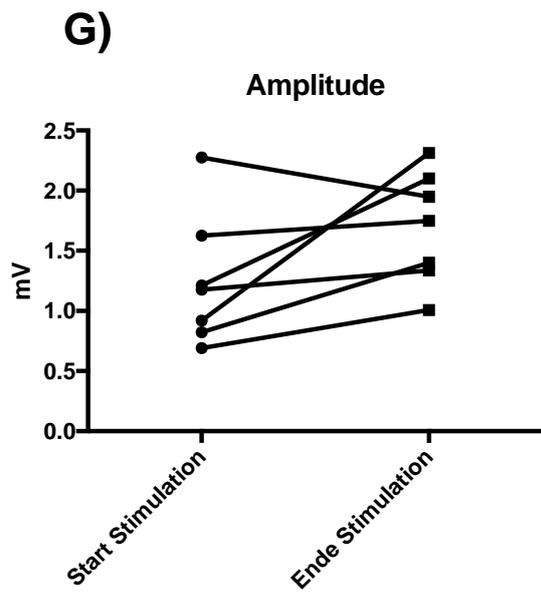
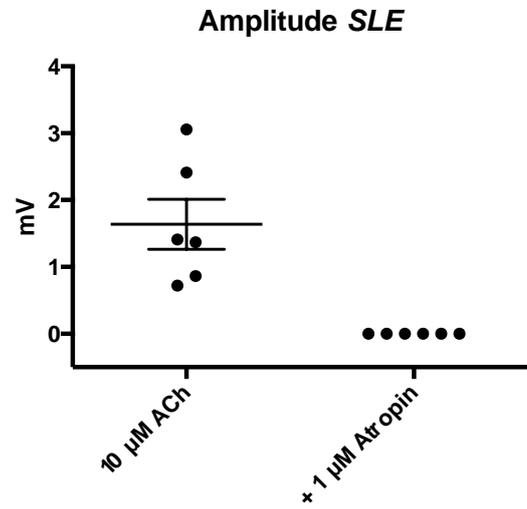
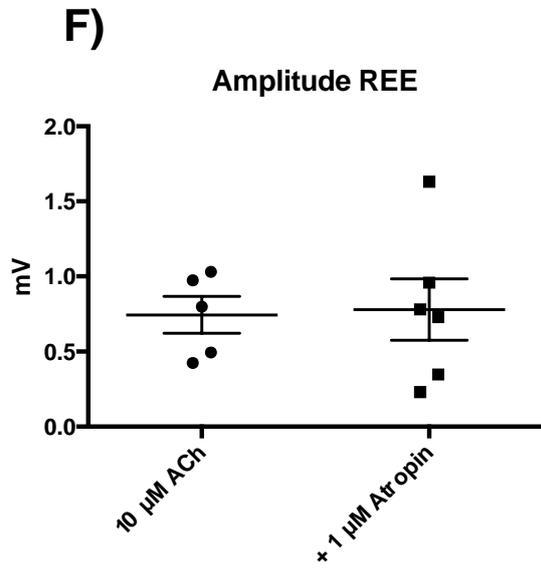
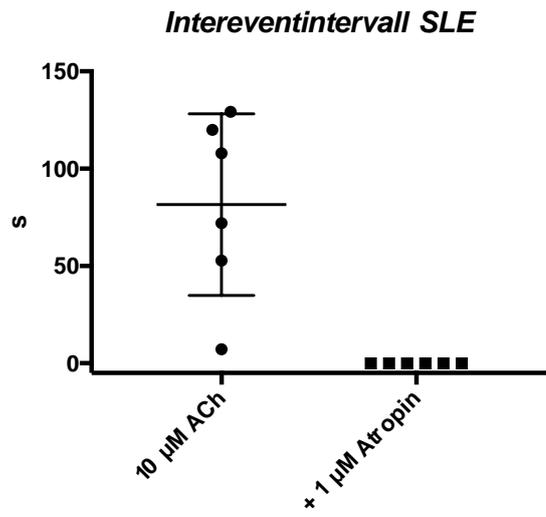
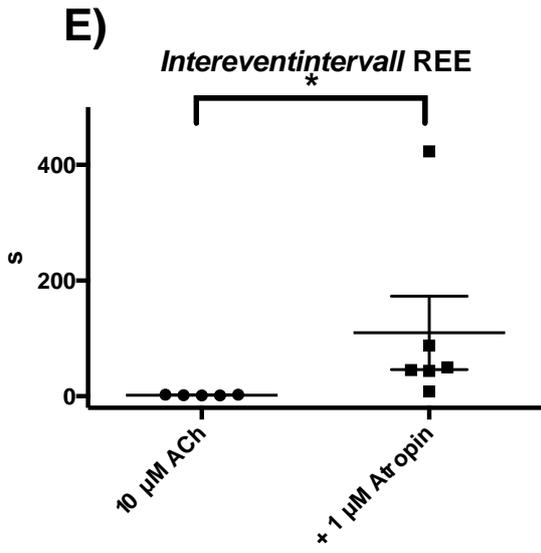


Abbildung 13: Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL+ Albumin, Applikation von ACh und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Atropin.

A) Exemplarisch abgebildet ein längerer Ausschnitt aus einem Experiment, abgebildet ist epileptiforme Aktivität in Form von REE gemischt mit SLEs im EC (Schicht V/VI), der Pfeil markiert den *wash-in* von Atropin 1 μ M. **B) - C)** Beispiele für Änderungen des Feldpotentials im EC (Schichten V/VI) in naiven Rattenhirnschnitten nach Präinkubation in mEL + Albumin und anschließender Badapplikation von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin (gelöst in mEL) (**B**) sowie nach zusätzlicher Applikation von 1 μ M Atropin (**C**). Untere Abbildungen in **B)** und **C)** zeigen eine höhere zeitliche Auflösung. **D) - F)** zeigen den Vergleich der Parameter Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude vor und nach zusätzlicher Atropinapplikation unterteilt nach Aktivitätsform (links REEs und rechts SLEs) Wenn die epileptiforme Aktivität in Form von SLEs nach Applikation von Atropin nicht mehr auftrat wurde aus Gründen der Anschaulichkeit die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für SLEs nach Applikation von Atropin für die Abbildung gleich null gesetzt und der entsprechende Parameter jeweils ohne SEM abgebildet. **D)** Ereignisdauer der REEs mit 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin und nach Applikation von 1 μ M Atropin, auf der rechten Seite Ereignisdauer der SLEs in Anwesenheit von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin sowie nach zusätzlicher Atropinapplikation **E)** Signifikante (*) Verlängerung der REE-*Intereventintervalle* nach der zusätzlichen Applikation von 1 μ M Atropin ($p = 0,004$, *Mann-Whitney-Test*). Auf der rechten Seite abgebildet ist das *Intereventintervall* zwischen den SLEs. **F)** Linksseitig abgebildet sind die Amplituden der REEs in Anwesenheit von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin, sowie nach der anschließenden zusätzlichen Applikation von 1 μ M Atropin. Rechtsseitig dargestellt sind die Amplituden der SLEs in Anwesenheit von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin. **G)** Amplituden der Reizantworten auf submaximale Stimulation in Schicht II/III des EC abgeleitet im EC (Schicht V/VI) zu Beginn und Ende der Stimulation.

Präinkubation	REEs	SLEs	REEs u. SLEs	n total
mEL+ Albumin	1/7	2/7	4/7	7
+ Atropin	6/7	-	-	7

Tabelle 4: Aktivitätsmuster in der mEL + Albumin Gruppe vor und nach Applikation von Atropin Tabellarische Aufstellung der auftretenden Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL+ Albumin und vor Applikation von Atropin

4.5 Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung

Zur Weiteren pharmakologischen Einordnung der epileptiformen Aktivität erfolgte die Applikation von Carbamazepin auf die durch ACh und Physostigmin ausgelöste Aktivität. Hierzu wurden die Rattenhirnschnitte analog zu oben beschriebenem Modell für eine Stunde in mEL (n = 7) präinkubiert, anschließend wurde durch die Badapplikation von ACh 10 μ M und Physostigmin 2 μ M in mEL epileptiforme Aktivität im EC Schicht V/VI ausgelöst. In zwei von sieben Schnitten kam es zum Auftreten von gemischter Aktivität (*SLEs* und *REEs*), in einem von sieben Schnitten traten *SLEs* auf und in vier von sieben Schnitten traten *REEs* auf (siehe Tabelle 5). Die ausgelösten *REEs* hatten eine Ereignisdauer von $1,10 \pm 0,48$ s (n = 6) und eine Amplitude von $0,71 \pm 0,10$ mV (n = 6). Das *Intereventintervall* zwischen den *REEs* betrug $1,75 \pm 0,45$ s (n = 6). Die *SLEs* hatten eine Ereignisdauer von $33,81 \pm 3,54$ s (n = 3) und eine Amplitude von $1,25 \pm 0,30$ mV (n = 3), während das *Intereventintervall* $96,28 \pm 9,65$ s (n=3) betrug. Nach einer 30 – 32 min andauernden *wash-in* Phase von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin erfolgte die zusätzliche Badapplikation von 50 μ M Carbamazepin in mEL (+10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin). Die *wash-in* Phase von Carbamazepin 50 μ M dauerte 29 – 32 min, es zeigte sich nach der Applikation von Carbamazepin ein Übergang der Aktivität in *LRDs*. Diese hatten eine Ereignisdauer von $0,21$ s \pm 37,45 ms (n = 7), während die Amplitude der Ereignisse $0,55 \pm 0,10$ mV (n = 7) betrug. Das *LRD-Intereventintervall* betrug nach dem *wash-in* von Carbamazepin $0,95$ s \pm 79,89 ms (n = 7). Kein Parameter (Ereignisdauer, *Intereventintervall*, Amplitude) war durch die Applikation von Carbamazepin signifikant verändert. In einem von sieben Schnitten kam es nach Applikation von Carbamazepin zum gemischten Auftreten von *LRDs* mit *SLEs*. Die *SLE* hatten eine Ereignisdauer von 40,73 s (n = 1) und eine Amplitude von 0,92 mV (n = 1) und traten mit einem *Intereventintervall* von 140,5 s (n = 1) auf. Die Angabe eines SEM ist für die *SLEs* nach Applikation von Carbamazepin bei n = 1 nicht möglich, ebenso wurde bei n = 1 kein statistischer Vergleich von Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude der *SLEs* vor und nach Applikation von Carbamazepin angestellt.

Zusammenfassend wurden nach Präinkubation in mEL durch die Applikation von ACh und Physostigmin *REEs* und *SLEs* ausgelöst (siehe Abbildung 14). Durch die Applikation von Carbamazepin kam es zum Übergang der Aktivität in eine hochfrequente epileptiforme Aktivität in Form von *LRDs*, in einem Schnitt kam es nach Applikation von Carbamazepin zum Auftreten einer gemischten Aktivität aus *SLEs* und *LRDs*.

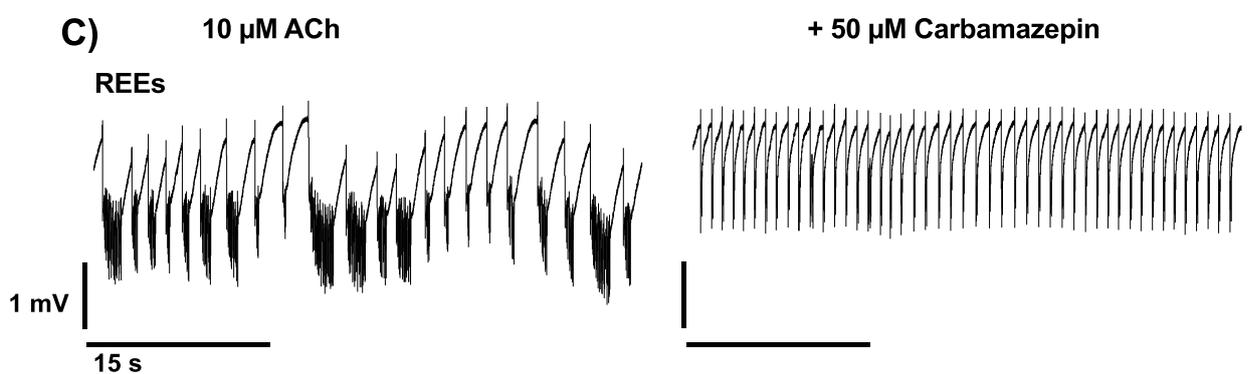
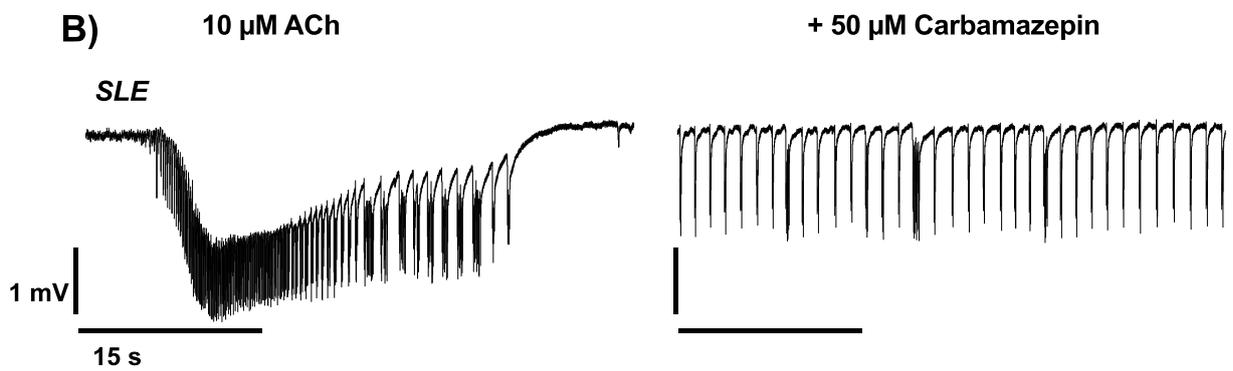
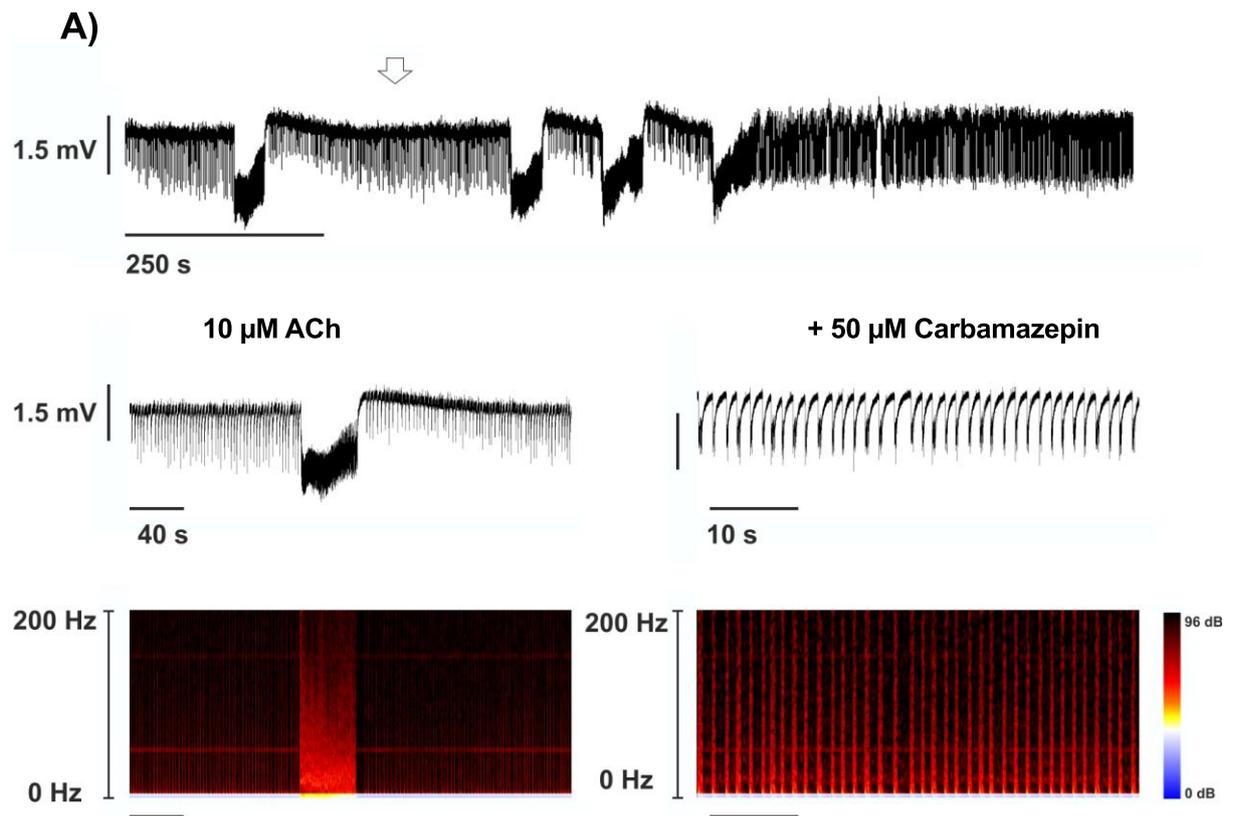


Abbildung 14: Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL, Applikation von ACh und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Carbamazepin

A) - C) Beispiele für Feldpotentialänderungen im EC (Schicht V/VI) in naiven Rattenhirnschnitten nach einer einstündigen Präinkubation in mEL, anschließender Badapplikation von 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von 50 μM Carbamazepin. Unter **A)** abgebildet ein längerer Ausschnitt aus einem Experiment, der Pfeil markiert den *wash-in* von Carbamazepin. Darunter finden sich Ausschnitte der Aktivität in höherer zeitlicher Auflösung mit korrespondierendem Sonogramm (farbcodierte Darstellung der Frequenzverteilung und *Power* der jeweiligen Frequenzen in den Ereignissen in dB). Links nach Applikation von 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin, rechts nach zusätzlicher Carbamazepinapplikation. Die durchgehende Linie bei 50 Hz ist durch Rauschsignale bedingt. Die unterschiedlichen Zeitachsen sind den verschiedenen Aktivitätsformen geschuldet und wurden so gewählt, dass die Anschaulichkeit der Frequenzverteilung gewahrt wird. Unter **B)** linksseitig abgebildet sind *SLEs*, auf der rechten Seite *LRDs* nach zusätzlicher Applikation von 50 μM Carbamazepin **C)** REEs (links) und *LRDs* (rechts) nach zusätzlicher Applikation von 50 μM Carbamazepin **D) - F)** zeigen den Vergleich der Parameter Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude vor und nach zusätzlicher Carbamazepinapplikation unterteilt nach Aktivitätsform (links REEs und rechts *SLEs*). Wenn die epileptiforme Aktivität in Form von *SLEs* nach Carbamazepinapplikation nicht mehr auftrat wurde aus Gründen der Anschaulichkeit die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für die Abbildung gleich null gesetzt und der entsprechende Parameter jeweils ohne SEM abgebildet. **D)** Ereignisdauer in Anwesenheit von 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin sowie nach der zusätzlichen Applikation von 50 μM Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts). **E)** *Intereventintervalle* mit 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin sowie nach der zusätzlichen Applikation von 50 μM Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts) **F)** Vergleich der Amplituden mit 10 μM ACh + 2 μM Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von 50 μM Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts)

Präinkubation	REEs/ LRDs	SLEs	REEs/LRDs SLEs	u. n total
mEL	4/7	1/7	2/7	7
+ CBZ	6/7		1/7	7

Tabelle 5: Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL vor und nach Behandlung mit Carbamazepin Tabellarische Aufstellung der auftretenden Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL sowie vor und nach Applikation von Carbamazepin

4.6 Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und Albumin

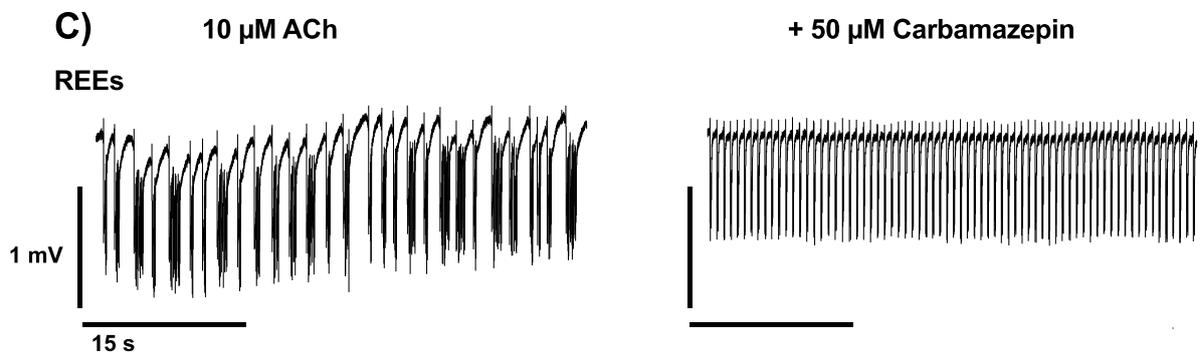
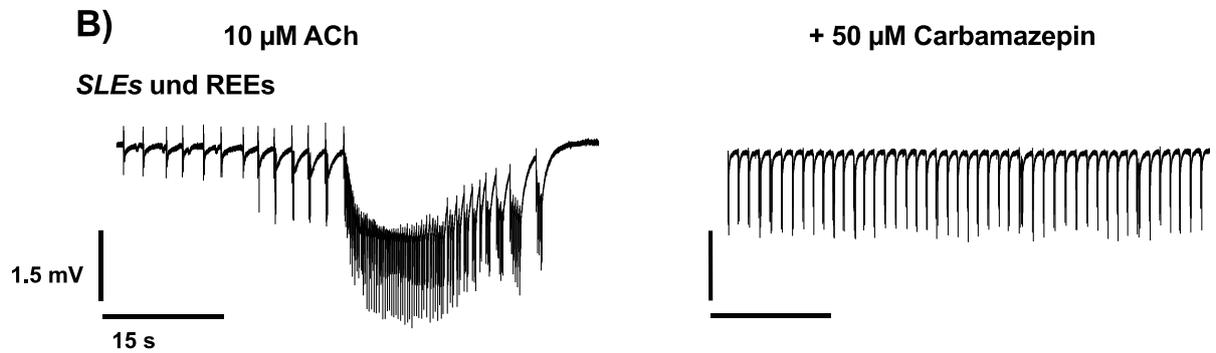
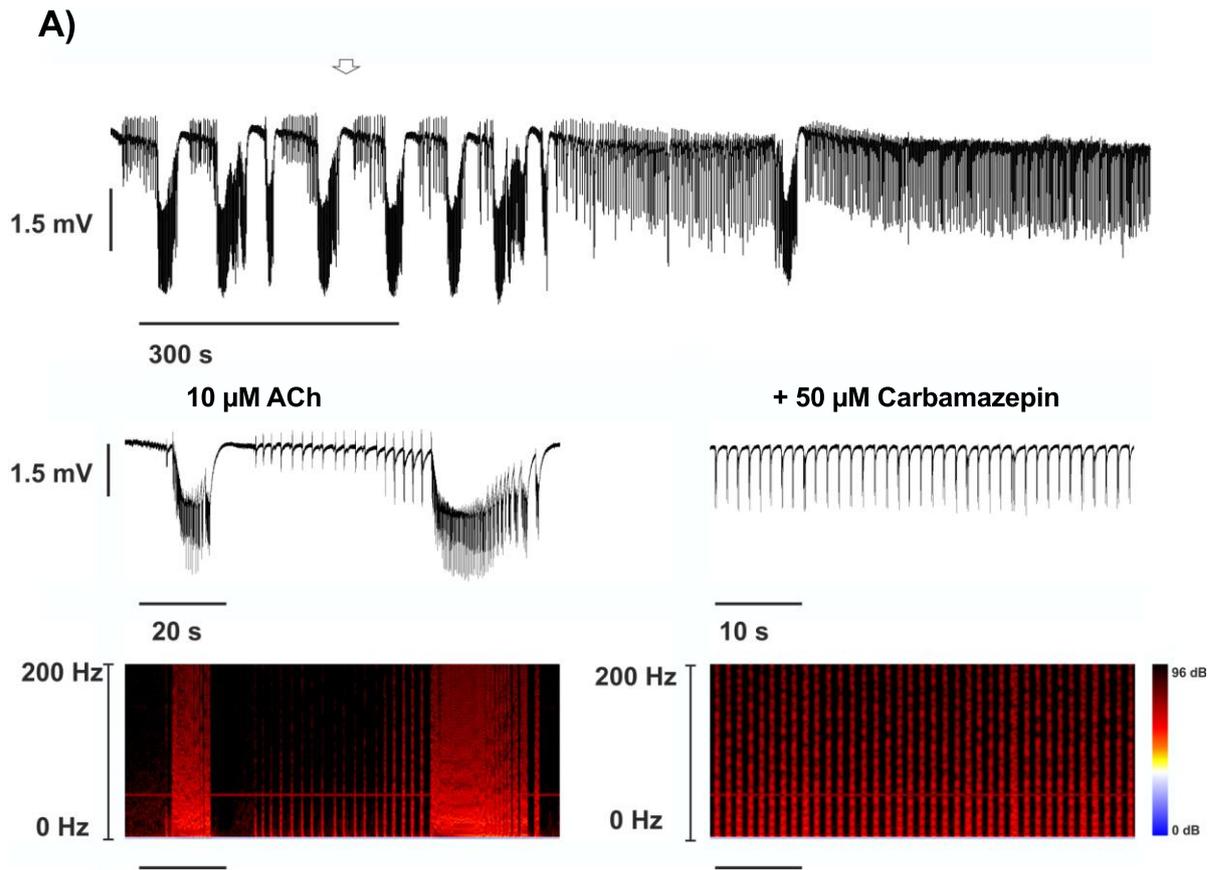
Nach einer einstündigen Präinkubation in 0.2 mM Albumin gelöst in mEL (n = 9) wurde durch die Badapplikation von ACh 10 µM und Physostigmin 2 µM in mEL epileptiforme Aktivität ausgelöst.

Hierbei kam es in vier von neun Schnitten zum Auftreten einer gemischten Aktivität aus SLEs und REEs während in fünf von neun Schnitten REEs ausgelöst wurden (siehe Tabelle 6).

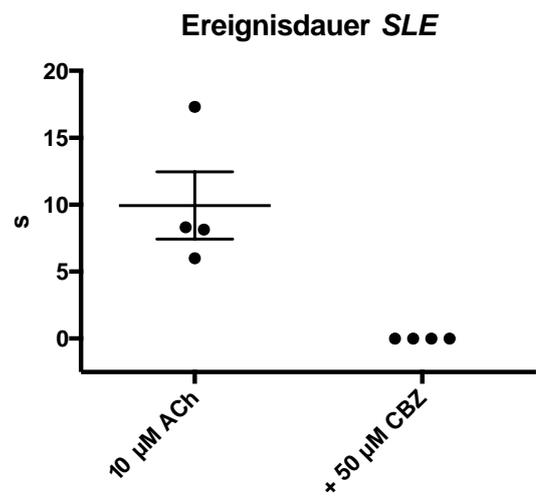
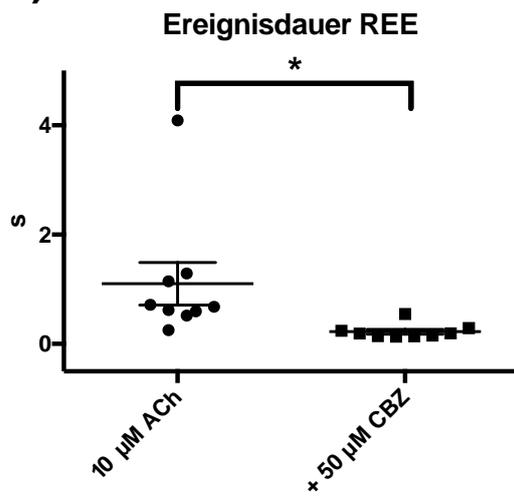
Die REEs hatten eine Ereignisdauer von $1,10 \pm 0,39$ s (n = 9) und eine Amplitude von $0,78 \pm 0,12$ mV (n = 9). Das REE-*Intereventintervall* betrug $2,21 \pm 0,75$ s (n = 9). Die SLEs hatten eine Ereignisdauer von $9,94 \pm 2,51$ s (n = 4) und eine Amplitude von $2,04 \pm 0,40$ mV (n = 4). Das SLE-*Intereventintervall* betrug $21,19 \pm 7,34$ s (n = 4). Nach einer 30 – 34 min andauernden *wash-in* Phase von 10 µM ACh + 2 µM Physostigmin erfolgte die zusätzliche Badapplikation von 50 µM Carbamazepin in mEL (+ 10 µM Ach + 2 µM Physostigmin). Nach einer 29 – 32 min dauernden *wash-in* Phase von Carbamazepin 50 µM zeigte sich die Ereignisdauer auf $0,23$ s \pm 43,59 ms (n = 9) reduziert; diese Reduktion war statistisch signifikant ($p = 0,004$, *Wilcoxon matched pairs signed rank Test*, n = 9 vs. n = 9). Die Amplituden der Ereignisse betrugen nach Applikation von Carbamazepin $0,64 \pm 0,08$ mV (n = 9). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des *Intereventintervalls* auf $0,79$ s \pm 66,54 ms (n = 9, $p = 0,004$, *Wilcoxon matched pairs signed rank Test*, n = 9 vs. n = 9).

Zusammenfassend wurden auch nach Präinkubation in mEL + Albumin durch die Applikation von ACh und Physostigmin epileptiforme Aktivität (REEs und SLEs) ausgelöst (siehe Abbildung 15). Durch die Applikation von Carbamazepin kam es zum Übergang

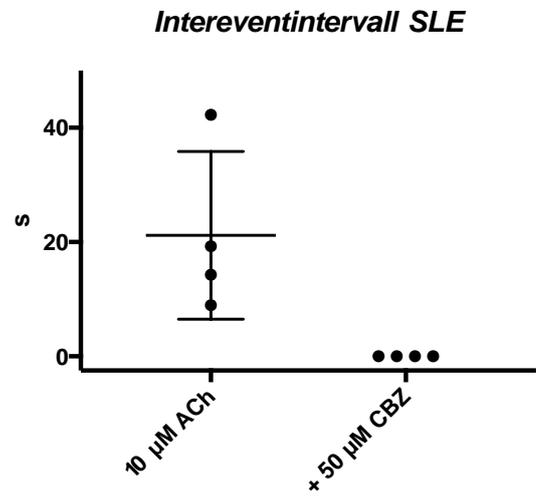
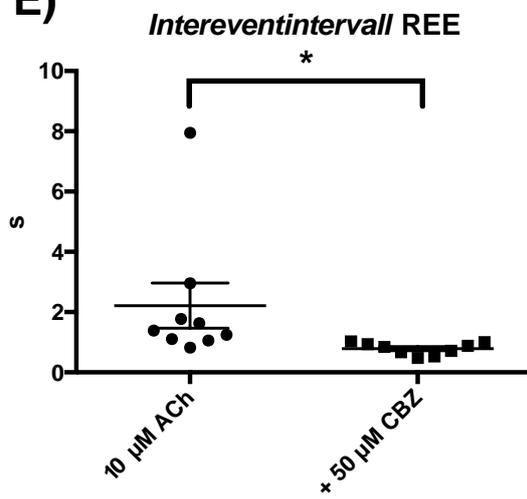
der Aktivität in *LRDs*. Hierbei waren Ereignisdauer der *LRDs* und das *LRD-Intereventintervall* nach Applikation von Carbamazepin signifikant reduziert.



D)



E)



F)

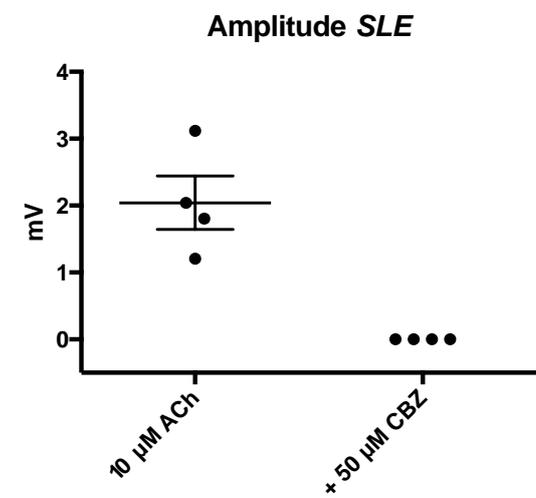
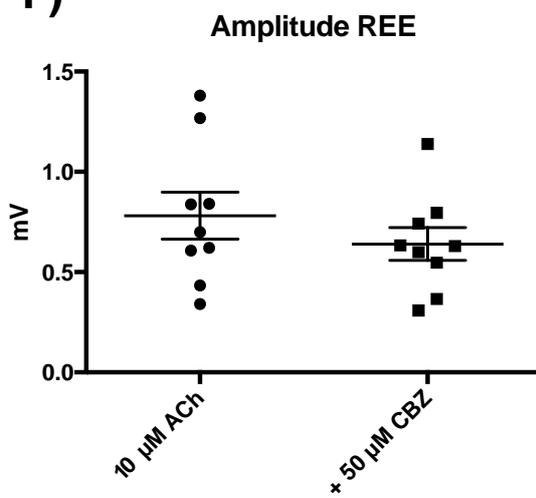


Abbildung 15: Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL + Albumin, Applikation von ACh und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Carbamazepin A) - C) Beispiele für Feldpotentialänderungen im EC (Schicht V/VI) in naiven Rattenhirnschnitten nach einer einstündigen Präinkubation in mEL + Albumin, anschließender Badapplikation von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von 50 μ M Carbamazepin. Unter **A)** abgebildet ein längerer Ausschnitt aus einem Experiment, der Pfeil markiert den *wash-in* von Carbamazepin. Darunter finden sich Ausschnitte der Aktivität in höherer zeitlicher Auflösung mit korrespondierendem Sonogramm (farbcodierte Darstellung der Frequenzverteilung und *Power* der jeweiligen Frequenzen in den Ereignissen in dB). Linksseitig nach Applikation von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin, rechts nach zusätzlicher Carbamazepinapplikation. Die durchgehende Linie bei 50 Hz ist durch Rauschsignale bedingt. Die unterschiedlichen Zeitachsen sind den verschiedenen Aktivitätsformen geschuldet und wurden so gewählt, dass die Anschaulichkeit der Frequenzverteilung gewahrt wird. Unter **B)** linksseitig abgebildet sind *SLEs* gemischt mit *REEs*, auf der rechten Seite *LRDs* nach zusätzlicher Applikation von 50 μ M Carbamazepin. **C)** *REEs* (links) und *LRDs* (rechts) nach zusätzlicher Applikation von 50 μ M Carbamazepin **D) - F)** zeigen den Vergleich der Parameter Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude vor und nach zusätzlicher Carbamazepinapplikation unterteilt nach Aktivitätsform (links *REEs* und rechts *SLEs*). Wenn die epileptiforme Aktivität in Form von *SLEs* nach Carbamazepinapplikation nicht mehr auftrat wurde aus Gründen der Anschaulichkeit die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für die Abbildung gleich null gesetzt und der entsprechende Parameter jeweils ohne SEM abgebildet. **D)** Ereignisdauer in Anwesenheit von 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin sowie nach der zusätzlichen Applikation von 50 μ M Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts). Die Reduktion der *REE*-Ereignisdauer nach Carbamazepinapplikation war signifikant (*, $p = 0,004$, *Wilcoxon matched pairs signed rank Test*). **E)** *Intereventintervalle* mit 10 μ M ACh + 2 μ M Physostigmin sowie nach der zusätzlichen Applikation von 50 μ M Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts). Die Reduktion des *Intereventintervalls* nach Carbamazepinapplikation war signifikant (*, $p = 0,004$, *Wilcoxon matched pairs signed rank Test*). **F)** Vergleich der Amplituden 10 μ M ACh + 2 μ M sowie nach zusätzlicher Applikation von 50 μ M Carbamazepin unterteilt nach Aktivitätsform (*REEs* bzw. *LRDs* links und *SLEs* rechts).

Präinkubation	REEs/ LRDs	SLEs	REEs u. SLEs	n total
mEL + Albumin	5/9	-	4/9	9
+ CBZ	9/9	-	-	9

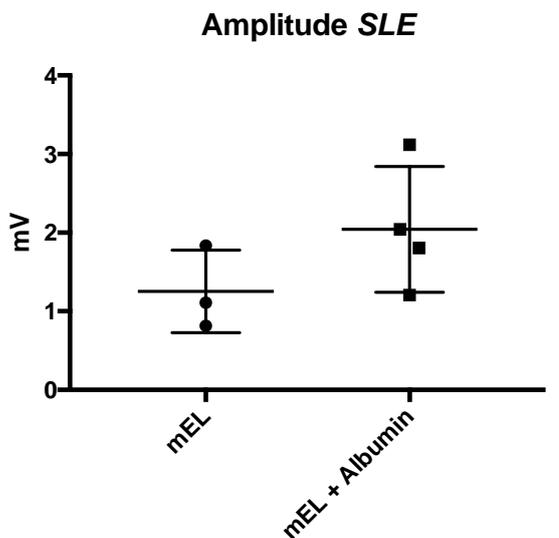
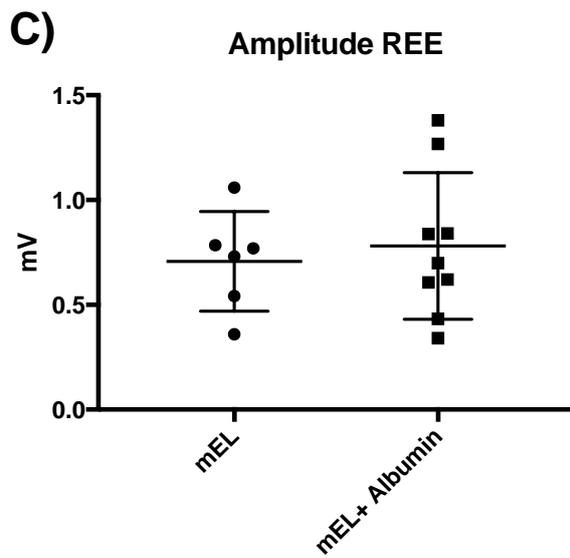
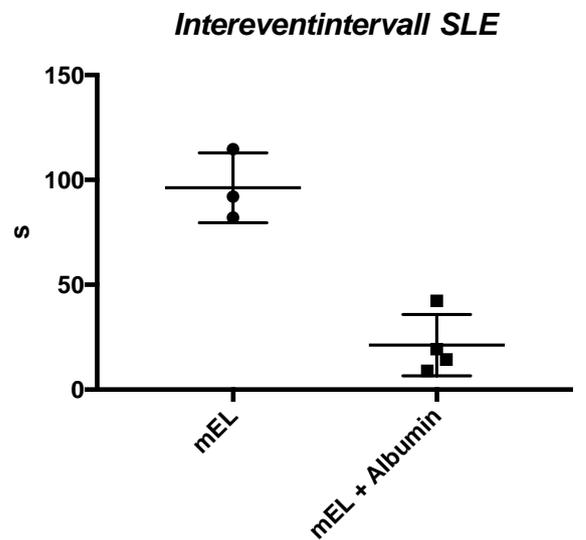
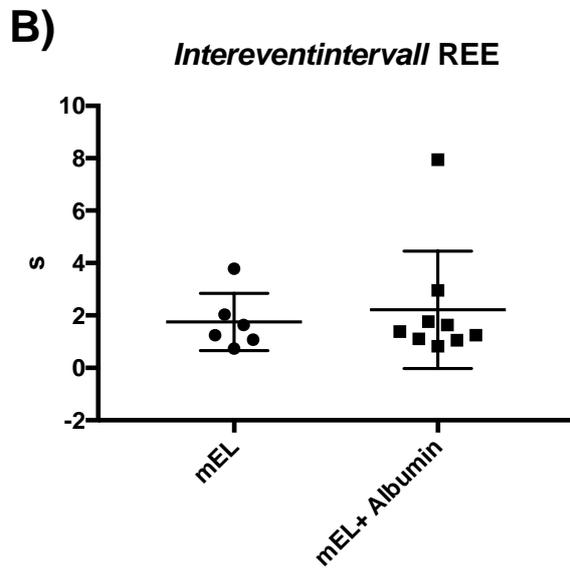
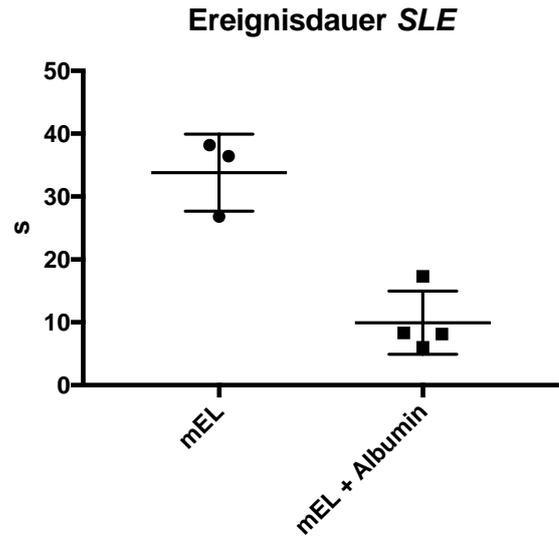
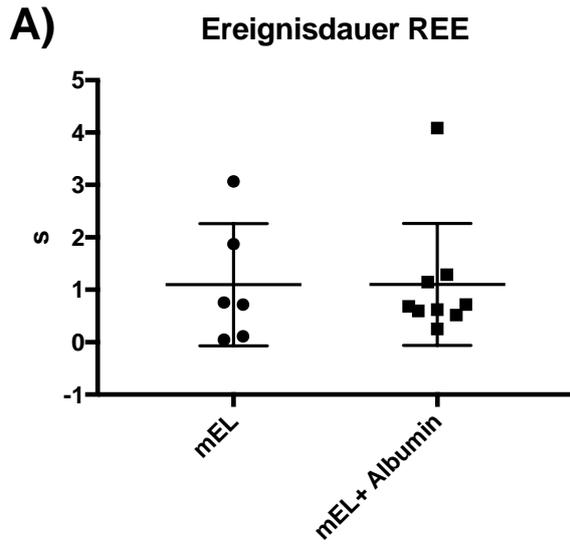
Tabelle 6: Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL + Albumin vor und nach Behandlung mit Carbamazepin Tabellarische Aufstellung der auftretenden Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL + Albumin und vor und nach der Applikation von Carbamazepin

4.7 Vergleich der Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit modifizierter Elektrolytlösung und modifizierter Elektrolyte und Albumin

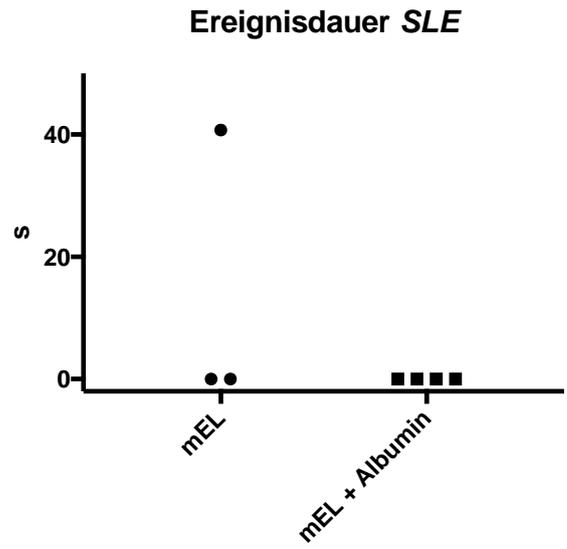
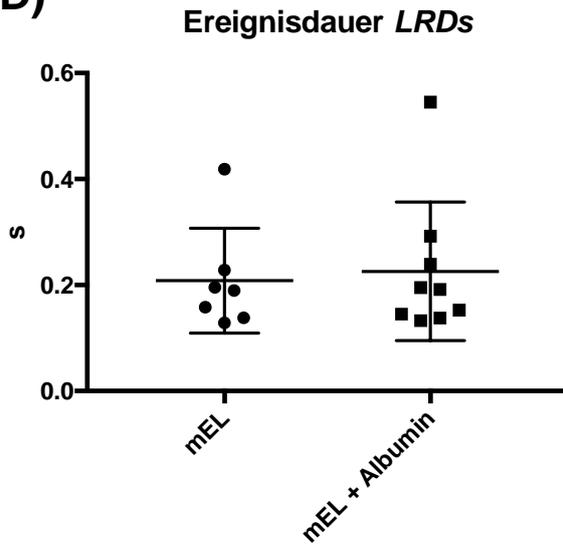
Hier werden die Effekte von Carbamazepin und die Aktivität nach Präinkubation in mEL (siehe auch Kapitel 4.5) und mEL + Albumin (siehe auch Kapitel 4.6) verglichen. Die Ereignisdauer der REE nach Präinkubation in mEL ($1,10 \pm 0,48$ s, $n = 6$) und mEL + Albumin ($1,10 \pm 0,39$ s, $n = 9$) unterschied sich nicht signifikant voneinander. Die Ereignisdauer der SLEs nach Präinkubation mit mEL ($33,81 \pm 3,54$ s, $n = 3$) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Ereignisdauer der SLEs nach Präinkubation mit mEL + Albumin ($9,94 \pm 2,51$ s, $n = 4$). Die Amplituden der REEs nach mEL Präinkubation ($0,71 \pm 0,10$ mV, $n=6$) und nach mEL + Albumin Präinkubation ($0,78 \pm 0,12$ mV, $n= 9$) sowie die *Intereventintervalle* zwischen den REEs nach mEL Vorbehandlung ($1,75 \pm 0,45$ s, $n = 6$) und nach mEL + Albumin Vorbehandlung ($2,21 \pm 0,75$ s, $n = 9$) waren jeweils nicht signifikant unterschiedlich (siehe auch Tabelle 7). Auch der Vergleich der Amplituden der SLEs nach Vorbehandlung mit mEL ($1,25 \pm 0,30$ mV, $n = 3$) und mEL + Albumin ($2,04 \pm 0,40$ mV, $n = 4$) ergab keine signifikanten Unterschiede. Das *Intereventintervall* zwischen den SLEs vor Applikation von Carbamazepin nach mEL Vorbehandlung ($96,28 \pm 9,65$, $n = 3$) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von dem *Intereventintervall* der SLEs nach mEL + Albumin Vorbehandlung ($21,19 \pm 7,34$ s, $n = 4$). Die LRDs nach Applikation von Carbamazepin hatten nach Präinkubation mit mEL eine Ereignisdauer von $0,21$ s \pm $37,45$ ms ($n = 7$), während die Ereignisdauer nach Präinkubation mit mEL + Albumin $0,23$ s \pm $43,59$ ms ($n = 9$) betrug. Die Amplituden der LRDs betragen nach Präinkubation mit mEL $0,55 \pm 0,10$ mV ($n = 7$) und $0,64 \pm 0,08$ mV ($n = 9$) nach Präinkubation mit mEL + Albumin, während das *Intereventintervall* der LRDs nach Präinkubation mit mEL $0,95$ s \pm $79,89$ ms ($n = 7$) gegenüber $0,79$ s \pm $66,54$ ms ($n = 9$) nach mEL + Albumin betrug. Im statistischen Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall*

der *LRDs* zwischen den beiden Präinkubationen. In einem Schnitt kam es nach mEL Vorbehandlung und nach der Applikation von Carbamazepin zum Fortbestehen von *SLEs* gemischt mit *LRDs*. Die Ereignisdauer betrug 40,73 s (n = 1), die Amplitude 0,92 mV (n = 1) und das *Intereventintervall* 140,5s (n = 1). Bei n = 1 kann hier kein SEM angegeben werden.

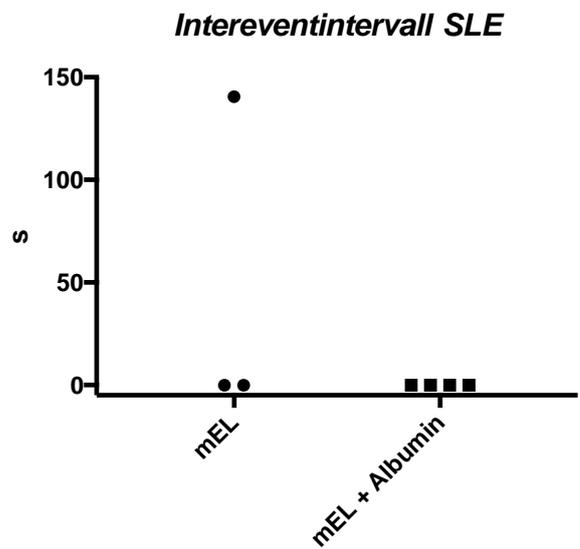
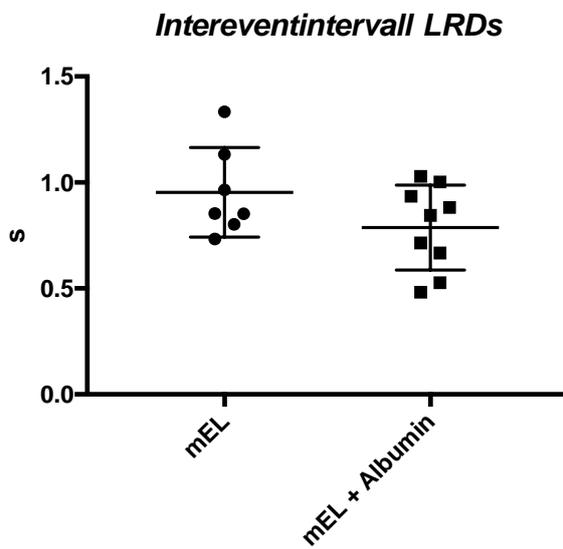
Zusammenfassend kam es nach Präinkubation in mEL oder mEL + Albumin zum Auftreten epileptiformer Aktivität in Form von REEs und *SLEs* in beiden Gruppen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplituden der REEs und *SLEs* nach Präinkubation in mEL und mEL + Albumin. Die *LRDs* nach zusätzlicher Applikation von Carbamazepin wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich Ereignisdauer, *Intereventintervall* oder Amplitude zwischen den beiden Vorbehandlungen auf.



D)



E)



F)

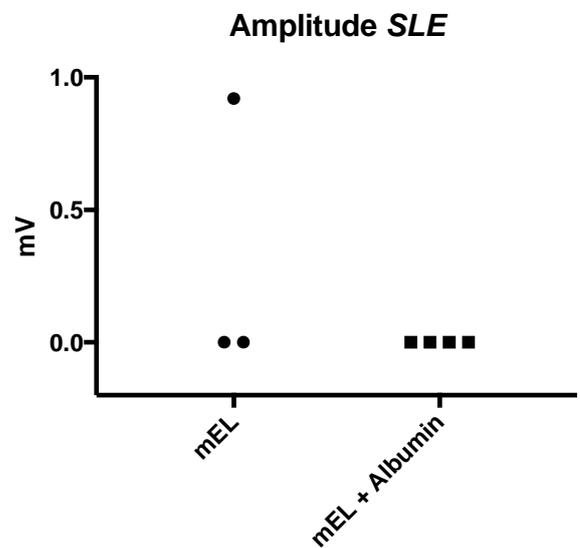
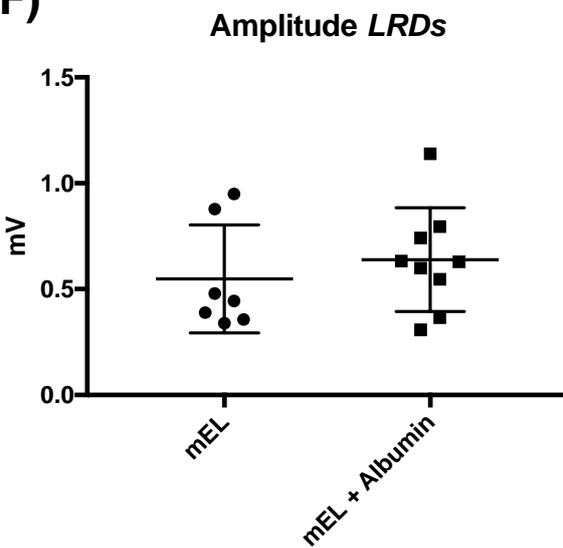


Abbildung 16: Vergleich der Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit mEL und mEL + Albumin **A)** Auf der linken Seite dargestellt ist die Ereignisdauer der REEs nach Präinkubation in mEL vs. mEL + Albumin, auf der rechten Seite die Ereignisdauer der SLEs nach Präinkubation mit mEL vs. mEL + Albumin. Unter **B)** abgebildet sind die *Intereventintervalle* der REEs nach Präinkubation mit mEL vs. Präinkubation in mEL + Albumin, rechts die *SLE-Intereventintervalle* **C)** Linksseitig dargestellt ist die Amplitude der REEs nach Präinkubation mit mEL und nach Präinkubation mit mEL + Albumin, rechts die Amplituden der SLEs nach mEL vs. nach mEL + Albumin. **D)** Ereignisdauer der LRDs nach Präinkubation mit mEL vs. Präinkubation mit mEL + Albumin nach Applikation von Carbamazepin, rechts die Ereignisdauer der SLEs. Unter **E)** dargestellt sind die *Intereventintervalle* der LRDs nach Präinkubation mit mEL vs. Präinkubation mit mEL + Albumin und nach Carbamazepinapplikation, rechts das *Intereventintervall* der SLEs. **F)** Amplituden der LRDs nach Präinkubation mit mEL vs. mEL + Albumin und Carbamazepinapplikation, rechts die Amplituden der SLEs. Wenn die epileptiforme Aktivität in Form von SLEs nach Carbamazepinapplikation nicht mehr auftrat wurde aus Gründen der Anschaulichkeit die Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* für SLEs nach Carbamazepinapplikation für die Abbildung gleich null gesetzt und der entsprechende Parameter jeweils ohne SEM abgebildet. In einem Schnitt kam es auch nach Carbamazepinapplikation zu SLEs, bei n = 1 wurde für Ereignisdauer, *Intereventintervall* und Amplitude nach Carbamazepinapplikation kein SEM angegeben.

Präinkubation	REEs	SLEs
mEL + Albumin	1,10 ± 0,39 s n = 9	9,94 ± 2,51 s n = 4
mEL	1,10 ± 0,48 s n = 6	33,81 ± 3,54 s n = 3

Tabelle 7: tabellarische Aufstellung der Ereignisdauer nach Präinkubation in mEL + Albumin sowie nach Präinkubation in mEL vor Behandlung mit Carbamazepin

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse:

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst in Übereinstimmung mit vorherigen Studien gezeigt werden, dass durch die Applikation von ACh und Physostigmin im EC naiver Ratten unter physiologischen Bedingungen epileptiforme Entladungen mit kurzer Ereignisdauer, jedoch keine *SLEs* ausgelöst werden können (57,64). Hingegen bewirkte die Präinkubation mit mEL eine epileptiforme Aktivität in Form von REEs und *SLEs*, dabei war nicht relevant, ob die Präinkubation mit oder ohne Albumin erfolgte.

Somit konnten die initial aufgestellten Hypothesen wie folgt beantwortet werden:

1. Veränderungen der Elektrolytzusammensetzungen, wie sie im Falle einer akuten BHSS vorliegen, erhöhen die die Suszeptibilität des ECs gegenüber ACh.

Im Rahmen von Veränderungen des extrazellulären Milieus wie sie bei einer BHSS vorliegen, konnte eine erhöhte Suszeptibilität des ECs gegenüber ACh nachgewiesen werden. Die so induzierten Veränderungen unterschieden sich gegenüber der durch ACh in Kontrollen induzierten Aktivität dahingehend, dass es auch zum Auftreten von *SLEs* kam. Es konnte durch Albumin kein eindeutiger zusätzlicher Effekt auf die durch ACh induzierte Aktivität nachgewiesen werden.

2. Die durch ACh und Physostigmin hervorgerufene Aktivität wird über muskarinerge Rezeptoren vermittelt.

Die durch ACh induzierten Veränderungen konnten durch den muskarinergen Rezeptorblocker Atropin modifiziert werden. Unter mEL Bedingungen wurde die Aktivität (REEs und *SLEs*) in zwei von sieben Schnitten komplett geblockt, in den übrigen Schnitten zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ereignisdauer. Des Weiteren war das REE-*Intereventintervall* signifikant verlängert. In der Gruppe mit einer Vorbehandlung mit mEL + Albumin wurde die Aktivität durch Atropin in einem von sieben Schnitten komplett geblockt, sodass nach der Applikation von Atropin weder REEs noch *SLEs* auftraten. Das REE-*Intereventintervall* war signifikant verlängert. *SLEs* traten nach der Applikation von Atropin weder in der mit mEL noch in der mEL + Albumin vorbehandelten Gruppe auf.

3. Die durch ACh und Physostigmin hervorgerufene Aktivität kann durch die Applikation von Carbamazepin als Antikonvulsivum pharmakologisch moduliert werden.

Die durch ACh induzierten Veränderungen konnten durch Carbamazepin pharmakomoduliert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Es zeigte sich ein Übergang der Aktivität in *LRDs*. Nach einer Vorbehandlung mit mEL und anschließender Behandlung mit Carbamazepin unterschied sich kein untersuchter Parameter (Ereignisdauer, *Intereventintervall*, Amplitude) signifikant vor und nach Behandlung mit Carbamazepin. In einem Schnitt kam es zum Fortbestehen von *SLEs* und *LRDs* nach Applikation von Carbamazepin, während in allen weiteren Schnitten ein Übergang in *LRDs* stattfand. Nach einer Vorbehandlung mit mEL + Albumin und Behandlung mit Carbamazepin waren Ereignisdauer und das *Intereventintervall* der REEs bzw. *LRDs* nach Applikation von Carbamazepin signifikant reduziert. Die *LRDs* nach Applikation von Carbamazepin unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich Ereignisdauer, Amplitude und *Intereventintervall* im Vergleich zwischen den beiden Vorbehandlungen mEL und mEL + Albumin.

5.2. Bezugnahme zu wissenschaftlichen Vorarbeiten

Die durch Carbachol induzierten Veränderungen in der Arbeit von Dickson und Alonso (57) unterschieden sich dahingehend von der Aktivität in den Kontrollen, dass die Ereignisdauer der Feldpotentialänderungen in der hier vorliegenden Untersuchung $0,15 \text{ s} \pm 23,36 \text{ ms}$ ($n = 8$, ACh $10 \mu\text{M}$) betrug, während in der Vorstudie zwischen zwei verschiedenen Formen der Aktivität unterschieden wurde: Einer länger andauernden Aktivität ($10,6 \pm 7,4 \text{ s}$) und einer kürzer andauernden ($1,06 \pm 0,85 \text{ s}$). Damit waren beide vorbeschriebene Aktivitäten länger als die in der vorliegenden Untersuchung. Dieser Unterschied ist möglicherweise über eine veränderte Zusammensetzung des aCSFs in der Studie erklärbar; die Autoren hatten eine höhere Konzentration von Kalium im aCSF verwendet (5 mM KCl), sodass die Zusammensetzung des aCSFs eher den mEL Bedingungen der vorliegenden Studie entspricht. Naheliegend ist also der Vergleich der Aktivität aus der Vorstudie von Dickson und Alonso mit der mEL Gruppe. Hier zeigen sich folgende Übereinstimmungen hinsichtlich der Befunde: Es kam zum Auftreten einer kürzeren, in der vorliegenden Studie REE genannten und einer längeren, *SLE* genannten Aktivität. Die in der vorliegenden Studie unter mEL Bedingungen (mit Stimulation, s.

Kapitel 4.3) auftretenden REEs ($0,81 \pm 0,39$ s, $n = 7$) und SLEs ($10,63 \pm 2,30$ s, $n = 5$) ähneln also der von Dickson und Alonso induzierten Aktivität.

Die variable Ereignisdauer der REEs vor Applikation von Carbamazepin (Präinkubation in mEL: $1,10 \pm 0,48$ s, $n = 6$ und mEL + Albumin: $1,10 \pm 0,39$ s, $n = 9$) und vor Applikation von Atropin (Präinkubation in mEL: $0,81 \pm 0,39$ s, $n = 7$ und mEL+ Albumin: $0,55 \pm 0,35$ s, $n = 5$) hängt möglicherweise mit der etwa 10 min längeren Applikationszeit von ACh und Physostigmin in der Carbamazepingruppe zusammen (Carbamazepingruppe: mEL: 30 – 32 min, mEL + Albumin: 30 – 34 min; Atropingruppe: mEL: 17 – 22 min ($n = 2$: 13 min); mEL + Albumin: 18 – 24 min). Ein Effekt, der in dieser Gruppe nicht durchgeführten Stimulation ist als unwahrscheinlich zu erachten, da es sich 1) um keine tetanische Stimulation gehandelt hat, welche u.a. interiktale Aktivität auslösen kann und 2) bei Doppelpulsstimulation im Abstand von 30 s langfristige Effekte als unwahrscheinlich zu erachten sind (*persönliche Kommunikation mit meinem Dissertationsbetreuer PD Dr. Pawel Fidzinski*).

Weitere potentielle Gründe für Unterschiede in den Aktivitätsmustern sind 1) die variable Schnitthöhe entlang der dorsoventralen Achse und 2) die Variabilität der Elektrodenposition in Bezug auf den perirhinalen Sulcus.

In einer weiteren Studie, die das Auftreten durch ACh ausgelöster epileptiformer Aktivität in chronischen Modellen untersucht hatte, kam es in den Kontrollschnitten zu einer mit der in der hier vorliegenden Studie vergleichbaren Aktivität im EC unter Kontrollbedingungen; die Autoren dieser Studie hatten ein mit dem in der vorliegenden Studie vergleichbares aCSF verwendet (62). In den Kontrollen kam es durch die Applikation von aufsteigenden Konzentrationen von ACh in der hier vorliegenden Studie lediglich zu einer signifikanten Verlängerung der epileptiformen Aktivität im Vergleich von $10 \mu\text{M}$ ACh vs. $50 \mu\text{M}$ ACh. Die übrigen Parameter waren nicht signifikant verändert. Es zeigte sich insbesondere kein Übergang der periodischen Aktivität in eine prolongierte epileptiforme Aktivität in Form von SLEs, wie sie in der o.g. Studie unter Verwendung von 5 mM KCl (57) vorbeschrieben war. In einer Vorarbeit, die den Zusammenhang zwischen muskarinerge Aktivierung und freiem intrazellulären Calcium untersucht hat (64), lag die durch muskarinerge Aktivierung an den Neuronen der Schicht V ausgelösten intrazellulären Depolarisation unter der Schwelle um Aktionspotentiale auszulösen. Die Autoren vermuteten, dass dieser Zelltyp nicht primär die Entstehung von SLEs triggert, jedoch eine wichtige Rolle für deren Erhaltung spielt. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit indirekt bestätigt werden: Funktionierende inhibitorische

Mechanismen und die Fähigkeit der Zellen geordnet zu repolarisieren sind Voraussetzung um den Übergang epileptiformer Aktivität in *SLEs* zu verhindern, welche maßgeblich von einer funktionierenden Elektrolyt-Homöostase abhängig ist. Unter der Annahme, dass unter Bedingungen, die einer akuten BHSS *in vitro* (auch hinsichtlich der vorbeschriebenen gestörten Elektrolyt- Homöostase) ähneln, die Suszeptibilität des ECs gegenüber ACh erhöht ist, erfolgte eine Vorbehandlung mit mEL. Um zu untersuchen, ob es einen akuten Effekt einer Albuminextravasation gibt, erfolgte in einer Gruppe eine Koapplikation von Albumin in der Vorbehandlungsphase. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit Elektrolyten, die in den Konzentrationen dem Rattenserum angeglichen sind (65, 66) die Suszeptibilität des ECs gegenüber ACh erhöht und für die Generierung von *SLEs* ausreichend ist. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede bei einem Vergleich der epileptiformen Aktivität zwischen den Vorbehandlungen mit mEL + Albumin oder mEL hinsichtlich der REEs gezeigt werden, jedoch eine längere Dauer der induzierten *SLEs* nach mEL + Albumin Präinkubation (nach Stimulation). Es lässt sich hieraus mutmaßen, dass im Falle der hier simulierten BHSS *in vitro* die Elektrolytveränderungen und nicht die Extravasation und astrozytäre Aktivierung durch Albumin zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber ACh führen. In Anbetracht der Tatsache, dass Albumin transkriptionelle Veränderungen durch die Aktivierung von Astrozyten verursacht, die erst mit einer Latenz von einigen Stunden einsetzen, erscheint dies plausibel (8). Des Weiteren konnte in einem Modell der osmotischen Öffnung der BHS die Latenz zwischen der BHSS und dem Anfallsereignis auf Minuten eingegrenzt werden (36), sodass auch hier transkriptionelle Veränderungen als Auslöser des Anfalls nachrangig scheinen. In der modifizierten Elektrolytlösung sind im Vergleich zu *aCSF* mit physiologischen Konzentrationen drei Ionen in veränderter Konzentration vorhanden, die möglicherweise prokonvulsive Effekte haben. Hierbei handelt es sich um Kalium mit einer vergleichsweise erhöhten Konzentration von 5,7 mM gegenüber 3 mM in *aCSF*, des Weiteren Magnesium in einer Konzentration von 0,8 mM gegenüber 1,8 mM in *aCSF* und Calcium in einer Konzentration von 1,3 mM in mEL im Vergleich zu 1,6 mM in *aCSF*. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten von Kaliumelektrolyten zwischen extra- und intrazellulär entscheidend für die Erhaltung des Ruhemembranpotentials, welches bei Neuronen typischerweise zwischen - 60 und - 70 mV liegt (67). Da die Repolarisation der Zellen von einem Transport der Kaliumelektrolyten nach extrazellulär entlang eines Konzentrationsgefälles durch spannungsabhängige Kaliumkanäle abhängig ist, ist die

Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles auch für die physiologische Repolarisation der Zellen und die geordnete Funktion des neuronalen Netzwerkes wichtig. Weiterhin führt ein extrazellulär erhöhtes Kalium zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials hin zu positiveren Werten, sodass die Schwelle für die Entstehung eines Aktionspotentials erniedrigt ist und kann somit zu einer hypersynchronen Netzwerkaktivität beitragen. Während durch 4- AP ausgelösten Anfällen konnte im EC sekundär durch hohe neuronale Aktivität ein höherer Anstieg des extrazellulären Kaliums als beispielsweise in der Region CA 3 gezeigt werden (68), was die Autoren auf den vergleichsweise kleineren Extrazellulärraum zurückführen. Dies könnte auch zu der relativ niedrigen Toleranz von Nervenzellen gegenüber Kaliumschwankungen beitragen. Darüber hinaus macht dieser lokale Unterschied der Kaliumakkumulation bei epileptiformer Aktivität auch deutlich, wie wichtig die Fähigkeit der neurovaskulären Einheit zur „räumlichen“ Pufferung von lokalen Kalium Schwankungen ist (9). Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (69,70), dass eine höhere Kaliumkonzentration in hippocampalen Schnittpräparationen *in vitro* prokonvulsiv wirkt. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration von 3,5 mM auf 8,5 mM resultierte in einer erhöhten *Burst*- Frequenz von Aktionspotentialen der Pyramidenzellen der Regionen CA3. Bei der Konzentration von 8,5 mM Kalium konnten in intrazellulären Messungen in Pyramidenzellen der Region CA3 große spontane, exzitatorische postsynaptische Potentiale, Nachhyperpolarisationen und rhythmischen Schwankungen im Membranpotential beobachtet werden (71).

Das Auftreten von hypersynchroner Netzwerkaktivität in Zusammenhang mit mEL könnte weiterhin durch eine reduzierte Konzentration von Magnesium in der modifizierten Elektrolyt Lösung begünstigt werden. In magnesiumfreier Lösung ist das Auftreten spontaner epileptischer Ereignisse und auch von *SLEs* im EC und der hippocampalen Formation beschrieben (72,73). Als mechanistisch wird hierbei ein fehlender spannungsabhängiger Block des NMDA Rezeptors durch Magnesium Ionen angenommen, was eine höhere Aktivität des NMDA Rezeptors zur Folge hat. In den vorliegenden Experimenten ist es nicht sicher auszuschließen, dass die beobachtete Übererregbarkeit teilweise auf die im Vergleich zu normalem *aCSF* niedrigere Magnesiumkonzentration zurückzuführen ist. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass dies der Hauptmechanismus der hier beobachteten Aktivität ist, da während der einstündigen Präinkubation (und Stimulation) keine epileptiforme Aktivität im EC aufgetreten ist, anders als in den hier zitierten Arbeiten, welche kein Magnesium

verwendeten. Eine weitere denkbare Elektrolytveränderung, die zur erhöhten Erregbarkeit im Gewebe beitragen kann, ist die im Vergleich zu *aCSF* minimal erniedrigte Calciumkonzentration von 1,3 mM. In Vorstudien wurde gezeigt, dass eine Erniedrigung des Calciums auf 0,2 mM spontane *SLEs* im Hippocampus ausgelöst hat, wobei bereits eine minimale Erhöhung der Konzentration auf 0,3 mM zu sistieren der spontanen epileptiformen Aktivität geführt hat (74). Als mechanistisch für diese Veränderungen werden einerseits Veränderungen der Oberflächenladung von Membranen angenommen. Zusätzlich konnte eine erleichterte Aktivierung von NMDA Rezeptoren unter erniedrigten Calcium Konzentrationen nachgewiesen werden (75).

In der vorliegenden Studie wurden höhere Konzentrationen als 0,3 mM von Calcium verwendet. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass die in dieser Untersuchung beobachtete epileptiforme Aktivität auf die erniedrigte Calcium Konzentration zurückzuführen ist. Weiterhin konnte in einer neueren Studie mittels *in vivo* Mikrodialyse die Zusammensetzung der Flüssigkeit im Extrazellulärraum des Hippocampus von Sprague Dawley Ratten untersucht werden, hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zu der Ionen Zusammensetzung im Liquor (76). Hierbei konnte eine höhere Konzentration von Kalium (4.3 ± 0.067 mM), eine niedrigere Konzentration von Calcium (0.718 ± 0.072 mM) und eine niedrigere Konzentration von Magnesium (0.4 ± 0.036 mM) nachgewiesen werden. Die größte Differenz in der Konzentration besteht im Vergleich zu *aCSF* hierbei in der Konzentration von Kalium, sodass dies in Zusammenschau der Befunde die Tendenz zur neuronalen Hypersynchronisation unter den mEL/mEL + Albumin Bedingungen am ehesten begünstigt. Gegebenenfalls könnte eine Anpassung der Rezeptur des verwendeten *aCSFs* an die in dieser Studie gemessenen Konzentrationen im *aECF* eine bessere Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Bedingungen ermöglichen.

Die Tatsache, dass ACh unter oben beschriebenen Bedingungen prolongierte Anfälle in naiven Tieren induziert, erlaubt Einsichten in einen möglichen Entstehungsmechanismus von Anfallsereignissen während der akuten Phase einer BHSS. Bis dato war bekannt, dass ACh eine wesentliche Rolle in chronischen Epilepsie Modellen und auch *in vivo* spielt. Vorhergehende Studien konnten im Pilocarpin-Modell und im Kainat-Modell zeigen, dass eine Exposition gegenüber ACh bei chronisch epileptischen Tieren zur Auslösung von *SLEs* im EC *in vitro* führt (62, 77). Hierbei wurde im chronischen Kainat- und Pilocarpin-post-Status Modell die Suszeptibilität gegenüber ACh getestet und im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Sensitivität nachgewiesen (62). Da in beiden

Modellen epileptiforme Aktivität ausgelöst werden konnten, mutmaßten die Autoren, dass diese Reaktion in Zusammenhang mit dem epileptogenen Potential von Pilocarpin und Kainat steht und nicht auf einen muskarinergen Agonismus durch Pilocarpin zurückzuführen sei. In einigen Fällen war hierbei die endogene Freisetzung von ACh ausreichend, um die ictale Aktivität auszulösen. Diese Beobachtungen suggerieren, dass in chronisch epileptischen Tieren im Pilocarpin Modell 1. Ein verändertes cholinerges Signaling vorliegt und 2. ACh als endogener Neurotransmitter, der physiologischerweise eine Bedeutung bei der Generierung von Rhythmen im EC und hippocampal innehat zur Induktion einer hypersynchronen Netzwerkaktivität beiträgt. In der vorliegenden Untersuchung konnte einerseits gezeigt werden, dass die cholinerge Aktivität unter BHSS Bedingungen in eine pathologische, epileptiforme übergeht und andererseits, dass die epileptiformen Ereignisse durch den muskarinergen Rezeptorblocker Atropin fast vollständig blockiert werden konnten und somit muskarinerg vermittelt sind. Dies zeigt auch, dass die Beobachtungen aus den chronisch epileptischen Tieren zumindest teilweise auf *in vitro* Versuche in naiven Ratten übertragbar sind und sich dieses als Modell zur Untersuchung von Anfällen bei BHSS eignet. Eine genauere Zuordnung bezüglich der Rezeptorspezifität und pharmakologischer Charakterisierung der Aktivität sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. *In vivo* konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass ACh die BHSS über proinflammatorische Prozesse unterhalten kann und somit zur Epileptogenese beiträgt (78). Neben dem gut bekannten immunomodulatorischen Effekt von ACh auf das periphere Nervensystem (79) konnte auch ein immunomodulatorischer Effekt im zentralen Nervensystem belegt werden. Nach einem SE kam es in diesen Studien zu einer massiven Hochregulation der Expression von Acetylcholinesterase, in transgenen Tieren die eine veränderte Variante der Acetylcholinesterase überexprimierten wurden nach einem SE erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen, eine beschleunigte Epileptogenese und eine verstärkte Mikroglia Aktivierung nachgewiesen. *Ex vivo* war der muskarinerge Agonist Carbachol in der Lage die Expression der inflammatorischen Zytokine TNF alpha und IL1 β signifikant zu reduzieren. Eine Zugabe des Natriumkanalblockers TTX hatte auf diese Veränderungen keinen Effekt, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass es sich hierbei um einen von neuronalem Signaling unabhängigen Effekt handelt. Hierdurch wird deutlich, dass die Funktion von ACh im Organismus deutlich über die Mediation von neuronalem Signaling hinausgeht und betont die Bedeutung von ACh als Immunmodulator im Bereich des ZNS. Die in obiger Studie nachgewiesenen Effekte auf

die Expression von Zytokinen, die Einfluss auf die Integrität der BHS haben lässt auf einen möglichen Mechanismus der Fehlregulation der BHS im Pilocarpin Modell schließen und stellen eine Schlüsselstelle für das Verständnis der Epileptogenese dar. Inwiefern es sich bei oben beschriebenen Veränderungen um protektive Regulationsmechanismen handelt ist bisher unklar und sollte Ziel neuer Studien sein. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die durch ACh ausgelösten epileptiformen Ereignisse durch Anwendung eines Antikonvulsivums pharmakomoduliert werden können, erfolgte die Behandlung der epileptiformen Aktivität mit Carbamazepin. Hierbei zeigte sich, dass die Ereignisse zwar moduliert werden konnten, jedoch nicht vollständig blockiert. Es zeigte sich hierbei ein Übergang der Aktivität in *LRDs*. Es gab hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Formen von Aktivität nach Carbamazepin Behandlung zwischen Vorbehandlungen mit mEL + Albumin oder mEL. Ergänzend sei angemerkt, dass eine Unterscheidung von REEs und *LRDs* anhand elektrophysiologischer Merkmale in der vorliegenden Untersuchung auf Feldpotentialebene nicht möglich war. Es konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass *LRDs* eine Form der epileptiformen Aktivität *in vitro* darstellt, die gegenüber den klinisch gebräuchlichen Antikonvulsiva pharmakoresistent ist, sodass diese Terminologie verwendet wurde (80). Die Beobachtungen in der vorliegenden Studie sind übereinstimmend mit Untersuchungen, in denen mit 4-AP *SLEs* induziert wurden (42), wie bereits in der Einleitung erwähnt hatte modifizierte Elektrolytlösung hier ebenfalls den Übergang von *SLEs* in *LRDs* begünstigt, welche gegenüber Carbamazepin pharmakoresistent waren. Dies und die Tatsache, dass die Aktivität in der vorliegenden Studie nach beiden Vorbehandlungen und Applikation von Carbamazepin in *LRDs* überging spricht gegen einen zusätzlichen Effekt von Albumin auf die Pharmakosensitivität in den hier vorliegenden Experimenten.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse

Die hier vorliegenden Ergebnisse können einen Hinweis auf einen mutmaßlichen Mechanismus der Entstehung eines Anfalls im Rahmen der akuten Phase der BHSS geben. Der erste Anfall in Folge einer BHSS ist möglicherweise Folge einer Elektrolytverschiebung im Extrazellulärraum in Kombination mit exzitatorischen Transmittern (wie zum Beispiel ACh). Ein zusätzlicher Effekt von Albumin auf die Art der induzierten Ereignisse konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Das in der vorliegenden Studie verwendete Modell könnte verallgemeinernd für

Elektrolytimbalancen anderer Genese, die möglicherweise zur Entstehung von akut-symptomatischen Anfällen beitragen, verwendet werden. Aus klinischen Beobachtungen heraus gibt es Hinweise, dass z.B. schwere Hypocalcämien und Hypomagnesiämien zu akut-symptomatischen Anfällen führen (81). Die durch ACh ausgelösten Veränderungen waren muskarinerg vermittelt, was für eine direkte Beteiligung des muskarinergen cholinergen Systems in der Anfallsentstehung in diesem Modell spricht. Eine weitere Charakterisierung hinsichtlich der Beteiligung der Rezeptorgruppe sollte Bestandteil weiterer Studien sein, da sich hier eine Parallele zwischen chronischem und akutem Modell zeigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die epileptiforme Aktivität durch das gängige Antikonvulsivum Carbamazepin nicht unterdrückt werden konnte und in *LRDs*, die als pharmakoresistent gelten, überging. Somit zeigt sich hier möglicherweise ein Modell für pharmakoresistente epileptiforme Aktivität *in vitro*, das für die Entwicklung neuer Antikonvulsiva relevant sein könnte. In Zukunft werden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der durch ACh ausgelösten epileptiformen Aktivität hinsichtlich Sensitivität auf weitere gängige Antikonvulsiva und zur genaueren mechanistischen Einordnung des Phänomens nötig sein. Pharmakoresistenz ist ein klinisch relevantes Phänomen, welches die Entwicklung neuer *in vitro* Modelle notwendig macht (82). Weiterhin ergeben sich aus der vorliegenden Untersuchung gute Argumente, BHS-Integrität als einen Biomarker zu nutzen, um das Risiko der Entstehung einer symptomatischen Epilepsie abzuschätzen und möglicherweise präventive Ansätze zur Verhinderung der Epileptogenese zu entwickeln. Eine vielversprechende Studie bezüglich eines präventiven neuroprotektiven Therapieansatzes nach BHSS hat kürzlich gezeigt, dass der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Losartan, der klinisch zur Behandlung des arteriellen Hypertonus verwendet wird, die Aktivierung der Astrozyten durch den TGF β Rezeptor und die Entwicklung von rekurrenten epileptischen Anfällen verhinderte (83).

5.4 Limitationen

Es sei angemerkt, dass die Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* Bedingungen aus Gründen der Komplexität der untersuchten Systeme nur bedingt möglich ist, *in vitro* Untersuchungen jedoch wertvolle Einsichten in das Verständnis der Mechanismen von Anfallsentstehung und Epileptogenese geben können und darüber hinaus von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapeutika sind. Zur genaueren Einordnung des nicht nachweisbaren zusätzlichen Effektes von Albumin wäre eine Präinkubation mit

aCSF und Albumin, sowie eine zusätzliche Versuchsreihe mit einer höheren Albumin Konzentration in den Lösungen wünschenswert gewesen. Limitierend in der Bewertung der vorliegenden Studie ist ebenfalls, dass nicht in allen Schnitten der Kontrollgruppe Atropin verwendet wurde, wobei in vorhergehenden Studien bereits gezeigt werden konnte, dass es sich bei der beobachteten Aktivität um eine cholinerg induzierte handelt (57,62). Zusätzlich wäre im Sinne der Vergleichbarkeit zwischen Atropingruppe und Carbamazepingruppe eine Stimulation während der Präinkubation in der Carbamazepingruppe sinnvoll gewesen. Weiterhin hätten vergleichbare *wash-in* Zeiten in den einzelnen Gruppen eine bessere Zuordnung der beobachteten Varianz erlaubt. Eine genauere mechanistische Einordnung der beobachteten Phänomene hinsichtlich beteiligter Zelltypen und intrazellulärer Vorgänge wie Aktionspotentialraten oder Amplituden und Frequenzen postsynaptischer Potentiale an einzelnen Neuronen und Aktivität beteiligter Ionenkanäle war in dieser Arbeit aufgrund von ausschließlich extrazellulären Messungen nicht möglich. Eine weitere Limitation liegt darin, dass ausschließlich naive Tiere verwendet wurden. Um eine bessere Übertragbarkeit der Daten auf *in vivo* Bedingungen zu erzielen, wären ergänzende *ex vivo* Untersuchungen nach BHSS *in vivo* wünschenswert gewesen. Damit wäre eine bessere Vergleichbarkeit zwischen in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen und *in vivo* Experimenten, insbesondere in Bezug auf die Latenzphase nach einem „*first hit*“, gegeben. Weiterhin ergeben sich aus Studien mit chronischen Modellen, wie oben skizziert, konkrete Hinweise auf die eine erhöhte Suszeptibilität des ECs chronisch epileptischer Ratten gegenüber ACh. In einem nächsten Schritt erwächst aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und diesen Beobachtungen die Frage, ob unter Bedingungen wie bei einer BHSS möglicherweise die endogene Freisetzung von ACh ausreichend ist, um Anfälle auszulösen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie die Bedeutung einer BHS in der Entstehung von akut symptomatischen Anfällen nachgewiesen und ein möglicher Entstehungsmechanismus identifiziert werden. Weiterhin war das Auftreten pharmakoresistenter epileptiformer Aktivität begünstigt. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie wird deutlich, dass in Zukunft weitere Studien zur Epileptogenese nach BHS nötig sind. Einerseits um frühzeitig Patienten zu identifizieren, die von einer möglichen antiepileptogenetischen Therapie profitieren, andererseits um die begleitenden pathophysiologischen Umstände zu identifizieren und therapeutische

Strategien zu entwickeln. Besondere Bedeutung dürfte hierbei *in vivo* und *ex vivo* Modellen sowie bildgebenden Studien zukommen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53.
- 2 Fabene PF, Bramanti P, Constantin G, The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol*. 2010;224(1-2):22-7.
- 3 Coisne C, Engelhardt B. Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1285-303.
- 4 Abbott NJ, Romero IA. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today*. 1996;2(3):106-13.
- 5 de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*. 1996;64(1):37-43.
- 6 Kang EJ, Major S, Jorks D, Reiffurth C, Offenhauser N, Friedman A, Dreier JP., Blood-brain barrier opening to large molecules does not imply blood-brain barrier opening to small ions. *Neurobiol Dis*. 2013; 52:204-18.
- 7 Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett*. 1997;226(1):33-6.
- 8 Cacheaux LP, Ivens S, David Y, Lakhter AJ, Bar-Klein G, Shapira M, Heinemann U, Friedman A, Kaufer D. Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci* 2009; 29:8927–35.

- 9 Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007; 130:535–47.
- 10 David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis. *J Neurosci* 2009; 29:10588–99.
- 11 Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGFβ signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia*. 2012 Aug;60(8):1251-7.
- 12 Herman ST, Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology*. 2002;59(9 Suppl 5): S21-6.
- 13 Sander JW, Shorvon SD., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;61(5):433-43.
- 14 AWMF Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; www.awmf.de Stand 30.09.2012; 030/041
- 15 Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30(4):389-99.
- 16 Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017 Apr;58(4):512-521.
- 17 Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy:

Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017 Apr;58(4):522-530.

18 Walker M, Chan D, Thom M. Hippocampus and Human Disease, In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The Hippocampus Book*, 1st ed. New York, Oxford University Press, 2007: 769-801.

19 Kwan P, Brodie MJ., Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 2000;342(5):314-9.

20 Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies., *Epilepsia*. 2010;51(6):1069-77.

21 Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M; Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*. 2001;345(5):311-8.

22 Wiebe S, Jetté N., Epilepsy surgery utilization: who, when, where, and why? *Curr Opin Neurol*. 2012;25(2):187-93.

23 Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstöck J, Stefan H, Hildebrandt M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2007;113(3):235-44.

24 AR Wyler, FC Dohan, JB Schweitzer, AD Berry. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy *J Epilepsy*, 1992;5(4):220-225

- 25 Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(7):553-64.
- 26 Qiao X, Sun G, Clare JJ, Werkman TR, Wadman WJ. Properties of human brain sodium channel α -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine. *Br J Pharmacol.* 2014;171(4):1054-67.
- 27 Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20(5):359-68.
- 28 McNamara JO, Pursuit of the mechanisms of kindling. *Trends Neurosci.* 1988;11(1):33-6.
- 29 Hellier JL, Patrylo PR, Buckmaster PS, Dudek FE. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998;31(1):73-84.
- 30 Cronin J, Dudek FE. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res.* 1988;474(1):181-4.
- 31 Furtado Mde A, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 2002;43 Suppl 5:37-9.
- 32 Turski L, Cavalheiro EA, Czuczwar SJ, Turski WA, Kleinrok Z. The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1987;39(5):545-55.
- 33 Hoss W, Woodruff JM, Ellerbrock BR, Periyasamy S, Ghodsi-Hovsepian S, Stibbe J, Bohnett M, Messer WS Jr. Biochemical and behavioral responses of pilocarpine at muscarinic receptor subtypes in the CNS. Comparison with receptor binding and low-energy conformations. *Brain Res.* 1990;533(2):232-8.

- 34 Dubé C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol*. 2000; 47:336–344.
- 35 Pitkänen A, Immonen RJ, Gröhn OH, Kharatishvili I. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*. 2009;50 Suppl 2:21-9.
- 36 Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 2007; 48:732–42.
- 37 Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A., Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2004; 24:7829–36.
- 38 van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007; 130:521–34.
- 39 Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot MC, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007; 130:1942–56.
- 40 Nag S, Takahashi JL, Kilty DW. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(8):912-21.
- 41 Michalak Z, Sano T, Engel T, Miller-Delaney SF, Lerner-Natoli M, Henshall DC. Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res*. 2013;103(2-3):167-79.

- 42 Salar S, Maslarova A, Lippmann K, Nichtweiss J, Weissberg I, Sheintuch L, Kunz WS, Shorer Z, Friedman A, Heinemann U. Blood-brain barrier dysfunction can contribute to pharmacoresistance of seizures. *Epilepsia*. 2014;55(8):1255-63.
- 43 Felleman DJ, Van Essen DC. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 1991;1(1):1-47.
- 44 Ramón y Cajal, Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Eso Hist Nat* 1893, 22 Übersetzt ins Deutsche durch von Kölliker A Beiträge zur feineren Anatomie des grossen Hirns. I. Über die feinere Struktur des Ammonshornes. in *Zeitschr Wiss Zool*.1893; 56:615-663
- 45 Amaral D, Lavenex P., Hippocampal Neuroanatomy, In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The Hippocampus Book*, 1st ed. New York, Oxford University Press, 2007: 37- 110.
- 46 Nieuwenhuys R. Telencephalon and Related Structures. In: Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C, eds. *The Human Central Nervous System*, 4th ed. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 2008: 361- 386.
- 47 Jung R. Hirnelektrische Untersuchungen über den Elektrokrampf: Die Erregungsabläufe in kortikalen Hirnregionen bei Katze und Hund. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1949; 183:206-244
- 48 Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(5):337-49.
- 49 Sean M. Montgomery, György Buzsáki. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(36): 14495–14500.
- 50 J O'Keefe, N Burgess, J G Donnett, K J Jeffery, E A Maguire. Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998; 353(1373): 1333–1340.

51 Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436(7052):801-6

52 Lewis PR, Shute CC, Silver A. Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the rat hippocampus. 1967 *Journal of Physiology* 191:215–224.

53 Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):505-14.

54 van der Zee EA1, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 1999;58(5):409-71.

55 Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*. 1998;394(6689):186-9

56 Çalışkan G, Schulz SB, Gruber D, Behr J, Heinemann U, Gerevich Z. Corticosterone and corticotropin-releasing factor acutely facilitate gamma oscillations in the hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci*. 2015;41(1):31-44.

57 Dickson C and Alonso A, Muscarinic Induction of Synchronous Population Activity in the Entorhinal Cortex, *Journal of Neuroscience*, 1997;17(17):6729-44.

58 Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 1989;3(2):154-71.

59 Hillert MH, Imran I, Zimmermann M, Lau H, Weinfurter S, Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *J Neurochem*. 2014;131(1):42-52.

- 60 Mingo NS, Cottrell GA, Mendonça A, Gombos Z, Eubanks JH, Burnham WM. Amygdala-kindled and electroconvulsive seizures alter hippocampal expression of the m1 and m3 muscarinic cholinergic receptor genes. *Brain Res.* 1998;810(1-2):9-15.
- 61 Meshorer E, Biton IE, Ben-Shaul Y, Ben-Ari S, Assaf Y, Soreq H, Cohen Y. Chronic cholinergic imbalances promote brain diffusion and transport abnormalities. *FASEB J.* 2005;19(8):910-22.
- 62 Zimmerman G, Njunting M, Ivens S, Tolner EA, Behrens CJ, Gross M, Soreq H, Heinemann U, Friedman A. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci.* 2008;27(4):965-75.
- 63 Geursen A, Grigor MR Serum albumin secretion in rat milk. *J Physiol.* 1987; 391:419–427
- 64 Egorov AV, Heinemann U, Müller W. Differential excitability and voltage-dependent Ca²⁺ signalling in two types of medial entorhinal cortex layer V neurons. *Eur J Neurosci.* 2002;16(7):1305-12.
- 65 Anthony A, Parsons J. Variation in normal sodium, potassium, and calcium levels in Wistar albino rats. *Science.* 1957;125(3253):881-3.
- 66 Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem.* 2007;388(5):547-54.
- 67 Koester J. and Siegelbaum S., Membrane Potential and the passive Electrical Properties of the Neuron In *Principles of Neural Science*, editors: Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A. J. Hudspeth, Fifth Edition, Mc Graw Hill, 2013, p 127

- 68 Barbarosie M, Louvel J, Kurcewicz I, Avoli M. CA3-released entorhinal seizures disclose dentate gyrus epileptogenicity and unmask a temporoammonic pathway. *J Neurophysiol.* 2000;83(3):1115-24.
- 69 Leschinger A, Stabel J, Igelmund P, Heinemann U. Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K⁺ and lowered Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in rat hippocampal slices. *Exp Brain Res.* 1993;96(2):230-40.
- 70 Traynelis SF, Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol.* 1988;59(1):259-76.
- 71 Korn SJ, Giacchino JL, Chamberlin NL, Dingledine R. Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol.* 1987;57(1):325-40.
- 72 Mody I, Lambert JD, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 1987;57(3):869-88.
- 73 Walther H, Lambert JD, Jones RS, Heinemann U, Hamon B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett.* 1986;69(2):156-61.
- 74 Konnerth A, Heinemann U, Yaari Y. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium. *J Neurophysiol.* 1986;56(2):409-23.
- 75 Köhr G, Heinemann U. Differences in magnesium and calcium effects on N-methyl-D-aspartate- and quisqualate-induced decreases in extracellular sodium concentration in rat hippocampal slices. *Exp Brain Res.* 1988;71(2):425-30.

- 76 McNay EC, Sherwin RS. From artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) to artificial extracellular fluid (aECF): microdialysis perfusate composition effects on in vivo brain ECF glucose measurements. *J Neurosci Methods*. 2004;132(1):35-43.
- 77 Maslarova A, Salar S, Lapilover E, Friedman A, Veh RW, Heinemann U. Increased susceptibility to acetylcholine in the entorhinal cortex of pilocarpine-treated rats involves alterations in KCNQ channels. *Neurobiol Dis*. 2013;56: 14-24.
- 78 Gnatek Y, Zimmerman G, Goll Y, Najami N, Soreq H, Friedman A. Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2012;5:66.
- 79 Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):418-28.
- 80 Zhang CL, Dreier JP, Heinemann U. Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Res*. 1995;20(2):105-11
- 81 Nardone R, Brigo F, Trinka E. Acute Symptomatic Seizures Caused by Electrolyte Disturbances. *J Clin Neurol*. 2016 Jan;12(1):21-33.
- 82 Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20(5):359-68.
- 83 Bar-Klein G, Cacheaux LP, Kamintsky L, Prager O, Weissberg I, Schoknecht K, Cheng P, Kim SY, Wood L, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Losartan prevents acquired epilepsy via TGF- β signaling suppression. *Ann Neurol*. 2014;75(6):864-75.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	erhöhte Permeabilität der BHS, modifiziert nach Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006 Jan;7(1):41-53.....	9
Abb. 2:	Vorgänge bei der Epileptogenese modifiziert nach Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF β signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. Glia. 2012 Aug;60(8):1251-7.....	11
Abb. 3:	Klassifikation epileptischer Anfälle nach Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia. 2017 Apr;58(4):522-530.	15
Abb. 4:	Schematische Darstellung eines horizontalen Rattenhirnschnittes durch den entorhinalen Cortex und die hippocampale Formation.....	22
Abb. 5:	Schematische Darstellung einer Interface Kammer.....	27
Abb. 6:	Zur Auswertung herangezogene Parameter.....	30
Abb. 7:	Präinkubationsschema Kontrollen.....	32
Abb. 8:	Präinkubationsschema mEL vs. mEL + Albumin und Applikation von Atropin.....	33
Abb. 9:	Präinkubationsschema mEL vs. mEL + Albumin und Applikation von Carbamazepin.....	34
Abb. 10:	Charakterisierung der Aktivität in der Kontrollgruppe.....	37
Abb. 11:	Vergleich der Aktivität in der Kontrollgruppe vs. mEL vs. mEL + Albumin	43
Abb. 12:	Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL, Applikation von Acetylcholin und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Atropin.....	48

Abb. 13:	Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL+ Albumin, Applikation von Acetylcholin und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Atropin.....	53
Abb. 14:	Abbildung 14: Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL, Applikation von Acetylcholin und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Carbamazepin	57
Abb. 15:	Charakterisierung der Aktivität nach Präinkubation in mEL + Albumin, Applikation von Acetylcholin und Physostigmin sowie nach zusätzlicher Applikation von Carbamazepin	62
Abb.: 16:	Vergleich der Effekte von Carbamazepin nach Präinkubation mit mEL und mEL + Albumin.....	67

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen der Kontrollgruppe vs. mEL vs. mEL + Albumin.....	45
Tab. 2:	tabellarische Zusammenfassung der Ereignisdauer in der Kontrollgruppe sowie nach Präinkubation mEL und mEL + Albumin (vor Applikation von Atropin)	46
Tab. 3:	Aktivitätsmuster in der mEL Gruppe vor und nach Applikation von Atropin.....	50
Tab. 4:	Aktivitätsmuster in der mEL + Albumin Gruppe vor und nach Applikation von Atropin.....	55
Tab. 5:	Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL vor und nach Behandlung mit Carbamazepin.....	60
Tab. 6:	Aktivitätsmuster nach Präinkubation in mEL + Albumin vor und nach Behandlung mit Carbamazepin.....	65
Tab. 7:	tabellarische Aufstellung der Ereignisdauer nach Präinkubation in mEL + Albumin sowie nach Präinkubation in mEL vor Behandlung mit Carbamazepin.....	69

9. Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4- Aminopyridin
ACh	Acetylcholin
aCSF	<i>artificial Cerebro Spinal Fluid</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHSS	Blut-Hirn-Schranken-Störung
CA1	Cornu Ammonis Region 1
CA3	Cornu Ammonis Region 3
EC	entorhinaler Cortex
EEG	Elektroencephalographie
F- EPSP	Feld- exzitatorisches postsynaptisches Potential
GD	Gyrus Dentatus
IgG	Immunglobulin G
LRDs	<i>late reccurent discharges</i>
mEL	modifizierte Elektrolytlösung
NVE	Neuro-Vaskuläre-Einheit
REEs	rekurrente epileptiforme Entladungen
Sub	Subiculum
SLEs	<i>Seizure-like-events</i>
SE	Status epilepticus
Tab.	Tabelle
TLE	Temporal-Lappen-Epilepsie
VEFG	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	<i>versus</i>

I. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Friederike Nichtweiß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Blut-Hirn-Schranken-Störung und epileptiforme Aktivität *in vitro*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE –www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

II. Lebenslauf

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

III. Danksagungen

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Heinemann, der mich für die Neurophysiologie begeistert hat. Seine wissenschaftliche Neugier und Expertise, seine Diskussionsfreude und Geduld waren für mich unersetzlich und haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Unter seiner Supervision ist der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit entstanden. Mein Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Alon Friedman, der wertvolle Ideen beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Pawel Fidzinski bedanken, der die Weiterbetreuung der Doktorarbeit übernommen und in zahlreichen konstruktiven Diskussionen zum Gelingen beigetragen hat. Ich danke außerdem Prof. Dr. Martin Holtkamp für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Anna Maslarova, Dr. Kristina Lippmann, Dr. Seda Salar, Herrn Jan- Oliver Hollnagel (PhD of Med. Neurosciences), Zin-Juan Kluft, Dr. Karl Schoknecht, Dr. Agustin Liotta, Dr. Gürsel Çalışkan und Dr. Ezequiel Lapilover für die Einarbeitung in die Methodik, konstruktive Diskussion der Daten und Experimente und stetige Hilfsbereitschaft.

Mein herzlichster Dank gilt auch meinen Eltern Dr. Michael Nichtweiß und Friederike Nichtweiß, sowie Olaf Herzig für Ihre bedingungslose Unterstützung und hilfreiche Kritik.