

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

DISSERTATION

**Faktoren der Pharmakoresistenz:  
Untersuchungen in Gewebeschnitten des Temporalen Kortex von  
chronisch epileptischen Patienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Franziska Alice Sandow

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Heinemann  
2. Prof. Dr. A. Draguhn  
3. Prof. Dr. rer. nat. T. Mittmann

Datum der Promotion: 24.02.2012

*Für Alexandra*

## Zusammenfassung

Pharmakoresistenz ist in der Behandlung fokaler Epilepsien ein häufiges Phänomen. Die genauen Mechanismen sind wenig verstanden und Gegenstand aktueller Forschungsansätze. Es wird danach gefragt, ob die Wirkung der Antikonvulsiva durch Veränderungen an ihren Zielstrukturen (Target-Hypothese) herabgesetzt ist und ob ATP-abhängige Drug-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke bzw. im Hirnparenchym verhindern, dass sich Antikonvulsiva bis zu einer therapeutisch wirksamen Konzentration im Gewebe anreichern (Transporter-Hypothese). Epilepsie-chirurgisch entferntes, epileptogenes und pharmakoresistentes Hirngewebe bietet die Möglichkeit, direkt in den erkrankten Hirnregionen nach Faktoren der Pharmakoresistenz zu suchen.

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass in Gewebeschnitten aus Hippokampus-Resektaten im Gyrus dentatus epileptiforme Aktivität ausgelöst werden kann. Diese in-vitro-Aktivität ließ sich in Resektaten von Patienten, die tumorbedingt nur kurze Zeit an Epilepsien litten, durch das Antikonvulsivum Carbamazepin unterdrücken. Im Gegensatz dazu war die Aktivität in 80 % der Resektate von Patienten mit langdauernder mesialer Temporallappen-Epilepsie resistent gegenüber Carbamazepin. Da im angewandten Modell eine antikonvulsive Behandlung des Gewebes unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke gewährleistet war, ließ sich schlussfolgern, dass parenchymal lokalisierte Mechanismen zur Pharmakoresistenz im Gyrus dentatus beitragen.

In der vorliegenden Arbeit sollte an Resektaten des vorderen Temporalpols (TP) getestet werden ob a) in Gewebeschnitten des resezierten temporalen Kortex stabile, epileptiforme Aktivität auslösbar ist, b) die induzierte Aktivität auf die in der antiepileptischen Monotherapie erprobten Antikonvulsiva Carbamazepin, Valproat und Phenytoin reagiert, c) die zusätzliche Hemmung der ektop exprimierten Multidrug-Transporter Pgp und MRP mit Verapamil (VPM) und Probenecid (PBN) die Pharmakoresistenz des Gewebes aufheben kann und d) sich eigene Effekte der Multidrugtransport-Inhibitoren (MDTI) VPM und PBN auf die epileptiforme Aktivität nachweisen lassen.

Mit dem Hochkalium-Bicucullin-Modell (Perfusion der Gewebeschnitte mit 8 mM  $[K^+]$ - und 50  $\mu$ M Bicucullin-ACSF) kann in 85% von 166 Gewebeschnitten periodische epileptiforme Aktivität induziert werden. Diese Aktivität ist durch eine Folge krampf-artiger oder spike-artiger Ereignisse charakterisiert (121 bzw. 20 Gewebeschnitte), wird durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren vermittelt und bleibt ohne Gabe von Medikamenten bis zu 80 Minuten stabil. In 37

Gewebeschnitten von Patienten mit klar definierter Kortexpathologie ist die spike-artige Aktivität häufiger zu beobachten (38%) als in 95 Gewebeschnitten von Patienten mit pathologisch „unauffälligem“ Kortex (6%).

Das Muster der krampf-artigen Aktivität wird durch die Antikonvulsiva (AED) Carbamazepin (CBZ), Valproat (VPA) und Phenytoin (PHT) überwiegend nicht verändert (81% von 76 Gewebeschnitten). Die Multidrugtransporter-Inhibitoren (MDTI) Verapamil (VPM) und Probenecid (PBN) bewirken in einem Teil der Gewebeschnitte eine Veränderung des Aktivitätstyps (Übergang von krampf-artiger in spike-artige Aktivität, 31 % von 32 Gewebeschnitten). Auch bei Koapplikation mit einem Antikonvulsivum sind häufig Veränderungen des Aktivitätstyps zu sehen (38% von 76 Gewebeschnitten), eine Suppression der krampf-artigen Aktivität erfolgt nur selten (4%).

Spike-artige Aktivität wird häufiger unterdrückt als krampf-artige Aktivität, durch Antikonvulsiva in 20% von 10 Gewebeschnitten (n.s.) und durch Koapplikation von AED und MDTI in 33% von 30 Gewebeschnitten ( $p < 0.001$ ).

Zwischen den Antikonvulsiva CBZ, VPA und PHT gibt es weder in der Phase ihrer alleinigen Applikation noch in der Phase ihrer Koapplikation mit VPM und PBN deutliche Unterschiede in der Wirkung.

Bei der Auswertung aller Gewebeschnitte eines Patienten sind teilweise heterogene Effekte der AED und der Koapplikation von AED und MDTI zu beobachten (27% von 26 Patienten bei Gabe des AED, 42% von 31 Patienten bei Koapplikation von AED und MDTI).

In unserem Modell zeigt sich unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke in den meisten Fällen eine Pharmakoresistenz gegenüber CBZ, VPA und PHT. Dies bestätigt die Annahme, dass im Parenchym lokalisierte Mechanismen eine wesentliche Rolle spielen. Die MDTI VPM und PBN verursachen Veränderungen des Musters der epileptiformen Aktivität. Dabei ist zu berücksichtigen, dass VPM Kalzium-Kanäle blockiert und neuroprotektiv wirken soll.

Die Koapplikation eines Antikonvulsivums mit VPM und PBN führt zu einer „Verstärkung“ von Effekten der Antikonvulsiva, eine komplette Suppression kann jedoch nicht signifikant häufiger erreicht werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist anzunehmen, dass auch das resezierte Kortexgewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie „Träger der Pharmakoresistenz“ ist. Die bei mehreren Patienten festgestellte Heterogenität der Behandlungseffekte in Gewebeschnitten eines Resektates stellt eine „homogene Verteilung Pharmakoresistenzvermittelnder Mechanismen“ im chronisch epileptischen Kortexgewebe in Frage.

## Abstract

Pharmacoresistance is a common phenomenon in treatment of focal epilepsies. Its mechanisms are poorly understood and a target of present investigations. The question arose, whether changes in target conformation of antiepileptic drugs (AED) may contribute to reduction in AED-efficacy (target-hypothesis). Another working-hypothesis is the reduction of AED-concentration at their place of action by ATP-dependent drug efflux pumps (MDT), located at the blood-brain-barrier and/or in the brain parenchyma (transporter-hypothesis).

Previous studies showed that epileptiform activity can be induced in the dentate gyrus of resected hippocampal tissue. Pharmacoresistance to carbamazepine occurred in 80% of the tissue. In tissue from patients with only a short period of epilepsy due to tumor, epileptiform activity became suppressed. As the investigations were performed in a model of blood-brain-barrier-deprived tissue one could conclude that mechanisms located in the brain parenchyma may play a crucial role in pharmacoresistent epilepsy. Resection of the anterior temporal pole, performed in patients suffering from temporal lobe epilepsy offers the opportunity to perform *in vitro* studies of human cortical tissue.

In the present study, we wanted to test i) whether stable epileptiform activity could be induced by ACSF with 8 mM  $[K^+]$  and 50  $\mu$ M Bicuculline, ii) whether the induced epileptiform activity is resistant to the antiepileptic drugs Carbamazepine (CBZ), Valproat (VPA) and Phenytoin (PHT), which are frequently used in antiepileptic monotherapy, iii) whether inhibition of the MDT Pgp and MRP by verapamil (VPM) and probenecid (PBN) affect the induced epileptiform activity and iv) whether co-application of one AED and both multidrug transport-inhibitors (MDTI) would reduce pharmacoresistance.

By elevation of extracellular  $[K^+]$  and application of 50  $\mu$ M bicuculline periodic epileptiform activity has been induced in 85% of 166 slices. Two pattern of activity occurred, seizure-like activity (SLE, 121 slices) or spike-like activity (IIS, 20 slices), both transmitted by AMPA-/kainate-receptors. Without further drug application, the activity was stable for a minimum of 80 minutes. In 37 slices of patients with a clear cortical pathology spike-like-activity (IIS) was significantly more often observed (38%) than in 95 slices of patients with discreet cortical pathology (6%).

Seizure-like activity was resistant to the AED CBZ, VPA or PHT in most of the slices (81% of 76 slices). MDTI alone modified the type of activity in some slices (transition of seizure-like activity to spike-like activity, 31% of 32 slices). Co-application of one AED with both MDTI

also resulted in a modification of the activity type (38% of 76 slices) but a complete suppression of seizure-like events was very rarely achieved (4%). Spike-like-activity (IIS) became more often suppressed than seizure-like-activity by one AED (20% of 10 slices, n.s.) and by co-application of one AED and both MDTI (33% of 30 slices,  $p < 0.001$ )

There was no difference between CBZ, VPA, and PHT with respect to their effects either when applied alone or together with MDTI.

In some patients, two or more slices of the resected tissue showed heterogeneous results (26% of 26 patients for application of one AED, 42% of 31 patients for co-application of one AED and both MDTI).

Our results obtained in a model of blood-brain-barrier-deprived human cortical tissue revealed pharmacoresistance of induced epileptiform activity to three major drugs (CBZ, VPA, PHT) in most of the slices. This approves the theory that resistance-mechanisms located in the brain parenchyma may play a crucial role.

The MDTI verapamil and probenecid applied in the absence of AED changed the pattern of epileptiform activity from seizure-like to spike-like. Considering that blockade of calcium channels and neuroprotection by VPM are known or in discussion, additional experiments are necessary in order to explain the effect. Co-application of one AED with both MDTI clearly enhanced the effects of AED, but a complete suppression of induced epileptiform activity was not often reached.

Regarding the latest discussion about substrate specificity of MDT, our results showed that there are no differences in substrate-specificity of Pgp and MRP for CBZ, VPA or PHT.

Our results suggest, that the resected cortical tissue of patients with pharmacoresistant focal epilepsy „carries mechanisms of pharmacoresistance“, but the heterogeneity of results in slices of one patient question the homogeneous distribution of resistance-mechanisms in the resected tissue.

### **Schlagwörter:**

Pharmakoresistenz, Epilepsie, Multidrug-Transporter, Extrazelluläre Messungen, Humane Hirngewebepräparation.

### **Key Words:**

Pharmacoresistance, epilepsy, multidrug-transporter, extracellular recordings, human brain slices.

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Der temporale Kortex: Histologie
- Abb. 2: Klassifizierung epileptischer Anfälle
- Abb. 3: Carbamazepin
- Abb. 4: Valproinsäure
- Abb. 5: Phenytoin
- Abb. 6: Schematische Darstellung von Target- und Transporter-Hypothese
- Abb. 7: Verapamil
- Abb. 8: Probenecid
- Abb. 9: Reizorte und evozierte Potentiale im Kortexgewebeschnitt
- Abb.10: Aktivitätstypen
- Abb. 11: Kaliumionen-Konzentrationsparameter und Aktivitätsparameter der induzierten epileptiformen Aktivität
- Abb. 12: Induktion epileptiformer Aktivität und Eigenschaften der induzierten Aktivität
- Abb. 13: Muster induzierter epileptiformer Aktivität in Gewebe von Patienten mit unterschiedlicher Kortexpathologie
- Abb. 14: Evozierte Feldpotentiale
- Abb. 15: Zeitverlauf der induzierten Aktivität
- Abb. 16: Applikation von MDTI
- Abb. 17: Effekte der AED auf die Aktivitätstypen
- Abb. 18: Effekte der AED: Veränderung der Aktivität bei SLE
- Abb. 19: Effekte von CBZ, VPA und PHT auf das Muster SLE und Modulationen der Aktivität resistenter SLE durch die einzelnen AED
- Abb. 19: Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf die Aktivitätstypen
- Abb. 21: Effekte und Modulationen durch die Koapplikation von AED und MDTI: Vergleich der Aktivität für Protokoll 1 und 2
- Abb. 22: Koapplikation von AED und MDTI: Vergleich zwischen Effekten der Koapplikation und der AED auf SLE
- Abb. 23: Effekte und Modulationen von SLE durch jeweils CBZ, VPA oder PHT und MDTI
- Abb. 24: Vergleich der Effekte in den Protokollgruppen AED vs. MDTI vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 20 Minuten)



- Abb. 25: Vergleich der Koapplikation mit AED und MDTI vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 40 Minuten)
- Abb. 26: Patientendaten: Häufigkeitsverteilungen und Korrelationen
- Abb. 27: Anzahl der untersuchten Kortexgewebeschnitte pro Patient
- Abb. 28: In vitro Effekte der AED auf das Gewebe der Patienten: Vergleich zur Gabe von MDTI und zu den Kontrollversuchen „ohne Substanzapplikation“
- Abb. 29: In vitro Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf das Gewebe der Patienten: Vergleich zwischen Patienten-Gruppen, in deren Gewebe die Koapplikation nach Präinkubation mit AED (PI AED) bzw. MDTI (PI MDTI) durchgeführt wurde
- 
- Tabelle 1: Pharmakodynamische Charakteristika der Antiepileptika Carbamazepin, Valproat und Phenytoin
- Tabelle 2: Verwendete Substanzen
- Tabelle 3: Patientendaten

## Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
ACSF	Artificial Cerebrospinal Fluid (Künstliche Hirnflüssigkeit)
AED	Antiepileptic drug (Antikonvulsive Medikation)
AMPA	2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionat
APV	D-2-Amino-5-Phosphonopentanoat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BICU	Bicucullin
CBZ	Carbamazepin
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
EAA	Excitatory Amino Acid (exzitatorische Aminosäure)
EEG	Elektroenzephalogramm
ESM	Ethosuximid
ILAE	International League against Epilepsy
[K <sup>+</sup> ]	extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration
[K <sup>+</sup> ] <sub>min</sub>	Minimum der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration vor dem epileptiformen Ereignis
[K <sup>+</sup> ] <sub>max</sub>	Maximum der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration
$\Delta$ [K <sup>+</sup> ]	Anstieg der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration
KYNA	Kynurensäure
MDT	Multidrug-Transporter
MDTI	Multidrug-Transport-Inhibitor
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MRP	Multi Resistentes Protein
MTLE	Mesiale Temporallappenepilepsie
nAChR	nicotinerger Acetylcholinrezeptor
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
n.s.	nicht signifikant
OAT	Organischer Anionentransporter
PET	Positronen-Emission-Tomografie
PBN	Probenecid
PGP	P-Glykoprotein

PHT	Phenytoin
TLE	Temporallappenepilepsie
TP	Temporalpol
SF	Standardfehler
SD	Spreading Depolarization
VPA	Valproat
VPM	Verapamil
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

## 1. EINLEITUNG

1.1.	Temporopolarer Kortex	1
1.2.	Epilepsie: Definition, Ätiologie und Pathogenese	2
1.3.	Antikonvulsive Medikation	4
1.3.1.	Wirkmechanismen der Antikonvulsiva	4
1.3.2.	Carbamazepin (CBZ)	5
1.3.3.	Valproat (VPA)	6
1.3.4.	Phenytoin (PHT)	7
1.4.	Pharmakoresistenz	8
1.4.1.	Target-Hypothese	10
1.4.2.	Drug-Transporter Hypothese	10
1.5.	Multidrug-Transporter-Inhibitoren (MDTI)	11
1.5.1.	Verapamil (VPM)	11
1.5.2.	Probenecid (PBN)	12
1.6.	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	14

## 2. METHODEN

2.1.	Patienten	16
2.2.	Gewebetransport, Präparation und Aufbewahrung des Gewebes	16
2.3.	Elektrophysiologische Messungen	17
2.3.1.	Messmethoden	17
2.3.2.	Ableitung und Auswertung evozierter Feldpotentiale	17
2.3.3.	Induktion und Auswertung epileptiformer Aktivität im Akutslice	18
2.3.4.	Charakterisierung der Aktivität	20
2.3.5.	Versuchsprotokolle	20
2.4.	Datenerfassung und Datenanalyse	22
2.5.	Statistik	24
2.6.	Verwendete Substanzen	24

### 3. ERGEBNISSE

- 3.1. Induktion epileptiformer Aktivität: Effektivität, Eigenschaften, Gewebepathologie und Gewebevitalität 25
- 3.2. Kontrollexperimente: Zeitverlauf der induzierten Aktivität ohne Substanzapplikation und bei Gabe von MDTI 30
- 3.3. Hauptversuche I: Reagiert das untersuchte Kortexgewebe pharmakoresistent auf die Applikation der Antiepileptika? 33
- 3.4. Hauptversuche II: Kann die Koapplikation von AED und MDTI die AED-Effektivität erhöhen? 38
- 3.5. Vergleich: Kontrollversuche – Hauptversuche 44
- 3.6. Gibt es Zusammenhänge zwischen Patientendaten und in-vitro erfassbaren Wirkungen von Antikonvulsiva (AED) und Transportinhibitoren (MDTI)? 49

### 4. DISKUSSION

- 4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse 60
- 4.2. Das Hochkalium-Bicucullin-Modell stellt ein adäquates Akutmodell zur Prüfung von Fragen zur Pharmakoresistenz im resezierten Kortexgewebe dar. 62
  - 4.2.1. Das Gewebe von Patienten mit klar definierter Kortexpathologie besitzt Eigenschaften die eine Induktion „spike-artiger“ Aktivität begünstigen. 63
  - 4.2.2. Die induzierte Aktivität wird durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren, also „glutamaterg“ vermittelt. 64
  - 4.2.3. Die Gewebevitalität bleibt erhalten. 65
  - 4.2.4. Die induzierte Aktivität bleibt über die gesamte Versuchszeit relativ stabil. 66
- 4.3. Gewebe des Temporalen Kortex von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie ist auch bei in-vitro-Behandlung mit gängigen Antikonvulsiva pharmakoresistent. 67
- 4.4. Verapamil (VPM) und Probenecid (PBN) verändern die induzierte epileptiforme Aktivität. 68
- 4.5. Die zusätzliche Blockierung der Transport-Proteine Pgp und MRP durch VPM und PBN in der Koapplikations-Phase „verstärkt“ die Effekte der AED. 68
- 4.6. Zwischen CBZ, VPA und PHT bestehen keine Unterschiede hinsichtlich der Substrateigenschaften für Pgp und MRP. 70
- 4.7. Spike-artige Aktivität ist sensitiver auf Antikonvulsiva bzw. Koapplikation von AED und MDTI als die krampf-artige Aktivität. 71

4.8. Patienten-orientierte Beziehungen zwischen verfügbaren klinischen Daten und in vitro erhobenen Befunden.	72
4.8.1. Die Befunde zu Gewebe- und Serumkonzentration der Antiepiletika im untersuchten Patientenkollektiv schließen eine an der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte Pharmakoresistenz nicht aus.	72
4.8.2. Das Gewebe von 74% der Patienten ist pharmakoresistent.	73
4.8.3. Die Koapplikation von AED und MDTI bewirkt bezogen auf die Patienten einen größeren Anteil von Veränderungen der Aktivität – Hinweise <b>für</b> einen Beitrag der MRPs zur Vermittlung der Pharmakoresistenz?	73
4.8.4. Heterogene Effekte im Gewebe eines Patienten – Ausdruck einer nicht homogenen „Verteilung“ von Pharmakoresistenz im chronisch epileptischen Gewebe?	74
5. LITERATURVERZEICHNIS	76
6. ERKLÄRUNG	88
7. DANKSAGUNG	89
8. LEBENSLAUF	90
9. PUBLIKATIONEN	91

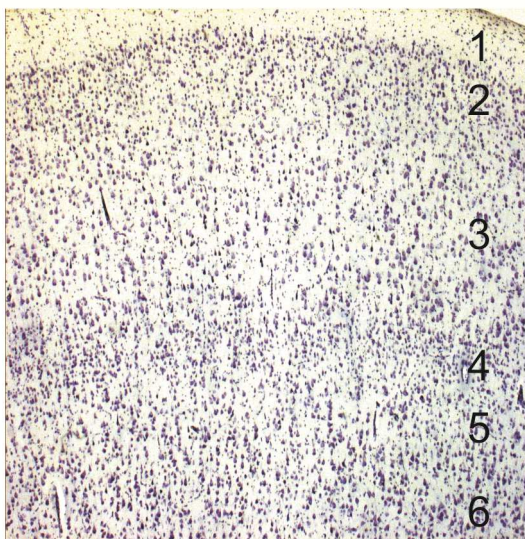
# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Temporopolarer Kortex

Der Temporopolare Kortex bedeckt das rostrale Ende des Temporalpols. Im Menschen stellt es die Area 38 und in der rostralen Verlängerung, mit Bildung der inferior-mesialen Oberfläche des Temporalpols, die Area 36 nach Brodmann dar (Brodmann 1909). Weitere zytoarchitektonische Charakterisierungen der Region erfolgten durch Economo und Ding (Economo et al. 1925, Ding et al. 2009). Der Temporopolare Kortex besteht aus sechs, für den Isocortex typischen Laminae (s. Abb. 1).

Der Temporalpol (TP) ist eng mit anderen Hirnstrukturen verbunden. Es bestehen Projektionen zum orbitofrontalen Kortex, zur Amygdala, zum Hippokampus und Hypothalamus sowie über den Fasciculus uncinatus, auch zu präfrontalen Regionen (Yasargil et al. 2004). Funktional werden dem TP vor allem die Verarbeitung emotionaler Antworten auf sensorische Stimuli zugeschrieben (Olson et al. 2007). Den TP betreffende Pathologien sind z.B. das Klüver-Bucy-Syndrom, die fronto-temporale Demenz, Hirntumore, Blutungen, Ischämien und die Temporallappenepilepsie (Klüver und Bucy 1937).

### Der temporale Kortex: Histologie



**Abb. 1 – Der temporale Kortex: Histologie.** Cresylviolett-färbung eines 25µm dicken Gewebeschnitts des temporopolaren Kortex

eines Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie (MTLE).

Lamina 1 (*Stratum moleculare*): Zellarmer Anteil des Kortex, der hauptsächlich aus Interneuronen und Fasern besteht.

Lamina 2 (*Stratum granulosum externum*): Besteht aus kleineren Körnerzellen.

Lamina 3 (*Stratum pyramidale externum*): Hier liegen locker angeordnete kleinere bis mittelgroße Pyramidenzellen.

Lamina 4 (*Stratum granulosum internum*): In dieser Schicht liegen die größeren Körnerzellen, die Projektionen aus dem Thalamus (bzw. anderen Hirnarealen) erhalten.

Lamina 5 (*Stratum pyramidale internum*): Sitz der großen Pyramidenzellen, deren Axone aus der Hirnrinde heraus projizieren.

Lamina 6 (*Stratum multiforme*): Hier finden sich verschiedene Zelltypen: Pyramiden- und Körnerzellen sowie zahlreiche Interneurone (nach Lüllman-Rauch 2006)

## 1.2. Epilepsie: Definition, Ätiologie und Pathogenese

Ein epileptischer Anfall, der Symptom verschiedenster Erkrankungen sein kann, ist vom Krankheitsbild der Epilepsie abzugrenzen.

„Ein **epileptischer Anfall** ist ein zeitlich begrenztes, paroxysmales Ereignis und durch Symptome gekennzeichnet, die auf anormale und/oder hypersynchrone neuronale Aktivität des Gehirns zurückgeführt werden können.“

„**Epilepsien** beruhen auf pathologischen Veränderungen des Gehirns, welche mit einer andauernden Prädisposition für die Entstehung epileptischer Anfälle einhergehen. Die Erkrankung ist durch neurobiologische, kognitive, psychologische und soziale Folgen geprägt. Um Epilepsie zu definieren, muss mindestens ein epileptischer Anfall aufgetreten sein.“ (Definition der “International League Against Epilepsy”, Fisher et al. 2005).

Ca. 10% der Bevölkerung erfahren mindestens einmal im Leben einen epileptischen Anfall. Ein epileptischer Anfall kann sporadisch, bei verändertem Stoffwechsel des Gehirns, wie z.B. bei Fieber, Hypoglykämie, Hypokalzämie, Hyponatriämie oder Leberfunktionsstörungen auftreten. Weiterhin kann eine neuronale Schädigung, z.B. durch Trauma, Ischämie oder Entzündung zu einem epileptischen Anfall führen oder für die Entstehung einer Epilepsie prädisponieren.

Die Prävalenz der Krankheit Epilepsie liegt bei 0.5-1% und zählt somit zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die Inzidenz liegt bei 30-50 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr (Hauser et al. 1996). Verschiedene Formen der Epilepsie werden z.B. anhand des Anfallstyps, des Erkrankungsalters, der Familienanamnese, der körperlichen Untersuchung und den Befunden in iktalem und inter-iktalem EEG sowie der Bildgebung (MRT, PET) unterschieden (Annegers et al. 1996).

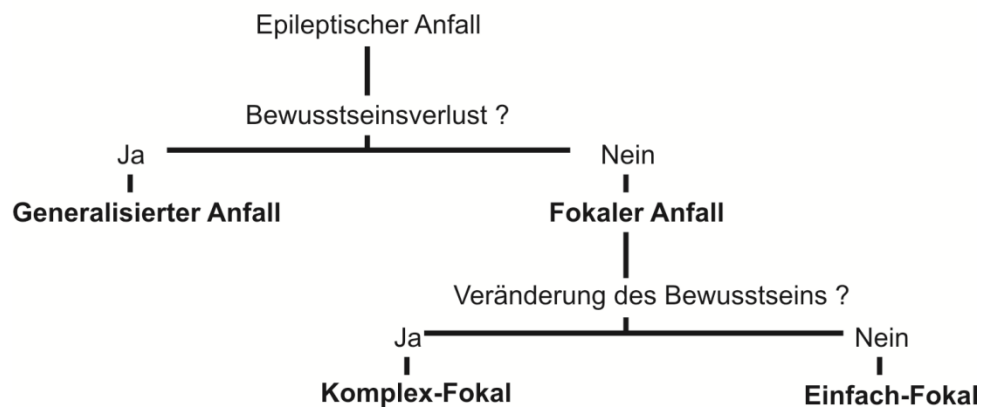
Zwei Drittel der Epileptiker leiden unter einer fokalen Epilepsie. Besonders bei Erwachsenen ist diese Form häufig. Epileptische Anfälle entstehen hier in einer umschriebenen Region des Zentralen Nervensystems (Fokus). Verschiedene Ätiologien führen zur Entstehung einer fokalen Epilepsie. Lokale Läsionen können die Ursache sein. Ein neokortikaler Fokus ist z.B. Folge einer Entwicklungsstörung, eines Tumors, eines Traumas oder einer genetischen Störung.

Ein epileptischer Anfall präsentiert sich klinisch initial mit oder ohne Bewusstseinsverlust. Es wird zwischen einem generalisierten Anfall bei Bewusstseinsverlust und einem fokalen Anfall bei initial erhaltenem Bewusstsein unterschieden. Bleibt der Patient weiter bei Bewusstsein,



handelt es sich um einen einfach-fokalen Anfall, kommt es zu einem sekundären Bewusstseinsverlust, wird von einem komplex-fokalen Anfall gesprochen (Shneker und Fountain 2003).

## Klassifizierung epileptischer Anfälle



**Abb. 2 – Klassifizierung epileptischer Anfälle.** (nach Shneker und Fountain 2003)

Der Temporallappen ist ein häufiger Ort der Anfallsgenese. Besonders die Strukturen des mesialen Temporallappens wie der Hippokampus, die Amygdala und parahippokampaler/entorhinaler Kortex sind beteiligt. Morphologische Veränderungen in Form einer hippocampalen Sklerose mit Zellverlust, reaktiver Astrozytenveränderung, Körnerzellschichtdispersion im Gyrus dentatus mit abnormen Zellverbindungen, reduziertem Metabolismus und abnormem elektrophysiologischem Aktivitätsmuster können auftreten (Engel 2001, Benbadis 2001, Heinemann 2004). Die genauen, molekularen Entstehungsmechanismen sind jedoch nicht vollständig geklärt. Zellverluste spielen im Rahmen der Epileptogenese eine Rolle und werden in Zusammenhang mit gestörter mitochondrialer Funktion und Akkumulation freier Radikale diskutiert (Kovacs et al. 2002, Vielhaber et al. 2003). Genetische Faktoren können zu veränderten Ionenkanälen führen (Escayg und Goldin 2010, Mantegazza et al. 2010). Weiterhin können Veränderungen in Expression und Konformation von GABA<sub>A</sub>- und NMDA-Rezeptoren eine Rolle spielen (Loup et al. 2000, de Moura et al. 2010).

Fokale Epilepsien sind in bis zu 50% der Fälle pharmakoresistent (Stefan et al. 2000). Eine therapeutische Option ist dann die chirurgische Fokusresektion. Typische Anfallsformen der

fokalen Epilepsie sind der einfach-fokale Anfall und der komplex-fokale Anfall mit tonisch-klonischen Muskelkrämpfen. Oft besteht vor dem Anfall eine Aura. Die Therapie der Wahl erfolgt mit Carbamazepin, Phenytoin, und Valproat, die im Folgenden näher beschrieben werden. Weiterhin kommen in den letzten Jahren „neuere“ Antikonvulsiva, wie z.B. Levetiracetam und Lamotrigin zum Einsatz.

## 1.3. Antikonvulsive Medikation

### 1.3.1. Wirkmechanismen der Antikonvulsiva

Antikonvulsiv wirkende Medikamente („antiepileptic drugs“ – AED) haben verschiedene Wirkmechanismen. Ein wichtiges Charakteristikum ist die Lipophilität, um die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden und vor allem auf neuronaler Ebene zu wirken. AED haben Effekte auf Ionenkanäle sowie auf die Transmitterwirkung und synaptische Erregungsfortleitung an GABAergen und glutamatergen Synapsen. Ziel ist es, die neuronale Erregung bzw. Übererregbarkeit zu hemmen. Es ist ein Gleichgewicht zwischen therapeutischer Dosierung und toxischen Effekten zu finden. Teilweise treten erhebliche Nebenwirkungen auf. Drei primäre Wirkmechanismen sind als Effekte der AED hervorzuheben:

- 1.) *Die Blockade spannungsabhängiger Ionenkanäle*, wie Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- oder Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, um die Auslösung oder Verbreitung von Aktionspotentialen zu verhindern.
- 2.) *Die Intensivierung GABAerger Neurotransmission*. Der inhibitorische Neurotransmitter GABA öffnet Chloridionenkanäle an der neuronalen Membran. Der resultierende Einstrom von Chloridionen in die Zelle führt zur Hyperpolarisation, einer starken Leitfähigkeitsveränderung der Membran und somit zu reduzierter Erregbarkeit.
- 3.) *Die Hemmung glutamaterger Neurotransmission*. Die Aminosäure Glutamat (GLT) ist der wichtigste erregende Neurotransmitter des Zentralen Nervensystems (ZNS) und vermittelt besonders die schnelle exzitatorische Neurotransmission über ionotrope Glutamatrezeptoren. Die drei Gruppen ionotroper Glutamatrezeptoren sind nach ihrer unterschiedlichen Affinität zu exogenen Antagonisten benannt: NMDA- (N-Methyl-D-aspartat-), AMPA- (2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionat-) und Kainatrezeptoren. Sie sind Angriffspunkte der Antikonvulsiva. Ihre Hemmung führt zur Reduktion der Erregbarkeit (Söderpalm 2002, Neels et al. 2004, Landmark 2007, Böhme und Lüddens 2007).

Ein Großteil der AED vermittelt ihren Effekt über mehr als einen Mechanismus, zum Teil bestehen synergistische Effekte. Klassische Präparate in der Monotherapie von Epilepsien sind Phenytoin (PHT), Carbamazepin (CBZ), Ethosuximid (ESM) und Valproat (VPA). Sie finden Anwendung zur Therapie der verschiedenen Epilepsietypen, aber auch im Rahmen anderer neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wie z.B. zur Therapie des neuropathischen Schmerzes. Sie haben ein breites Nebenwirkungsspektrum, sodass vermehrt auch neuere Präparate wie Gabapentin, Lamotrigin, Oxcarbamazepin, Topiramaten, Vigabatrin und Felbamat als Einzelpräparat oder in Kombination angewendet werden (White 1999). In meinen Untersuchungen wurden CBZ, VPA und PHT verwendet.

	<b>MG</b> (g/mol)	<b>ID</b> (mg)	<b>TD</b> (mg)	<b>MD</b> (mg)	<b>TK</b> (mg/l)	<b>P-HWZ</b> (h)	<b>PPB</b> (%)	<b>VV</b> (l/kg)
<b>CBZ</b>	236.27	100-400	400-1200	1800	4-12	10-30	70-80	1.4
<b>VPA</b>	144.21	250	750-2500	3000	50-100	8-15	90	0.15-0.4
<b>PHT</b>	252.27	200	200-500	500	10-20	12-36	90	0.5-1.2

**Tabelle 1 – Pharmakodynamische Charakteristika der Antiepileptika Carbamazepin, Valproat und Phenytoin.** Abkürzungen: *CBZ* – Carbamazepin, *VPA* – Valproat, *PHT* – Phenytoin, *MG* – Molgewicht, *ID* – Initialdosis, *TD* – Tägliche Dosis, *MD* – Maximaldosis/Tag, *TK* – Therapeutische Konzentration, *P-HWZ* – Plasmahalbwertszeit, *PPB* – Plasmaproteinbindung, *VV* – Verteilungsvolumen (nach Fountain 2002 und Neels et al. 2004).

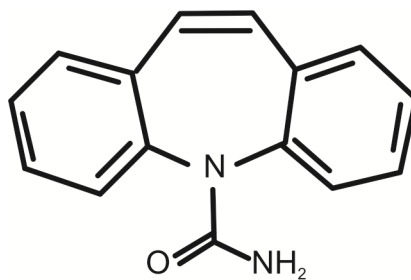
### 1.3.2. Carbamazepin (CBZ)

Carbamazepin (CBZ: 5H-Dibenz(b,f)azepine-5-carboxamide) wird vor allem in der Therapie von fokalen und generalisierten tonisch-klonischen Anfällen angewandt. Weiterhin findet es zur Behandlung der Trigeminusneuralgie und zur Prophylaxe bei bipolarer Störung Anwendung. Die antikonvulsive Wirkung von CBZ wird durch Interferenz mit der Genese hochfrequenter Aktionspotentiale über eine Modulation von Natriumströmen vermittelt. CBZ wirkt:

- 1.) *Durch spannungsabhängige Reduktion des Natriumioneneinstroms ( $I_{Na}$ ) in die Zelle.*

- 2.) *Durch Verschieben der „Steady-State“-Inaktivierungskurve in hyperpolarisierende Richtung.* Hierdurch nimmt die Zahl aktivierbarer Natriumkanäle ab.
- 3.) *Durch längeres Verbleiben des Kanals im inaktivierten Zustand.* Dies führt zur frequenzabhängigen Reduktion des Natriumioneneinwärtsstroms und verhindert so die repetitive Entladung von Aktionspotentialen an depolarisierten Neuronen (McLean und McDonald 1986, Dichter 1993, Remy et al. 2003a).

Die Therapie mit CBZ kann zu Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, Diplopie und Nystagmen führen. CBZ kann eine Agranulozytose oder eine Aplastische Anämie hervorrufen.



**Abb. 3 – Carbamazepin.** CBZ: 5H-Dibenz(b,f)azepine-5-carboxamide (nach Neels et al. 2004).

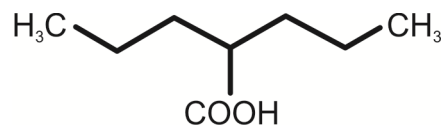
CBZ wird unter Katalyse v.a. der CYP-Isoenzyme CYP3A4 und CYP2C8 zum ebenfalls antikonvulsiv wirksamen 10,11-epoxid-carbamazepin metabolisiert. Es folgt die Hydroxilierung zum inaktiven Trans-10,11-dihydro-10,11-dihydrocarbamazepin. CBZ bewirkt durch Enzyminduktion (CYP2C9, CYP3A4) die Beschleunigung des eigenen Abbaus, ebenso wie Verstärkung hepatischer Oxidationsmechanismen und die Konjugation anderer lipidlöslicher Stoffe. So können die Konzentrationen anderer Medikamente wie Cyclosporin, Tacrolimus, Proteaseinhibitoren, Benzodiazepine und Östrogene bei gleichzeitiger CBZ-Therapie vermindert sein (Brodie 1992, Brodie und Dichter 1996).

### 1.3.3. Valproat (VPA)

Valproinsäure (VPA: 2-Propylpentansäure) wirkt über verschiedene Mechanismen antikonvulsiv. Es hemmt ähnlich wie CBZ die neuronale Depolarisation mittels Blockade spannungs- und nutzungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle (MacDonald und Kelly 1993). Durch Hemmung GABA-inaktivierender Enzyme wird der inhibierende Effekt des Neurotransmitters

GABA verstärkt. Weiterhin wird die postsynaptische Wirkung an der GABAergen Synapse und antagonisierende Effekte im Aspartatmetabolismus und an Glutamatrezeptoren diskutiert.

VPA benötigt bei Therapiebeginn einige Wochen, um sein volles Wirkungsspektrum zu entwickeln, es sollte deshalb vorsichtig eindosiert werden. Häufige Nebenwirkungen sind die Gewichtszunahme, Tremor, Thrombozytopenie, Haarausfall und bei Frauen Unregelmäßigkeiten im Menstruationszyklus. Die Inzidenz der Hepatozytotoxizität in Form von mikrovaskulärer Verfettung wird mit 1:20.000 bemessen (Dreifuss et al. 1987).



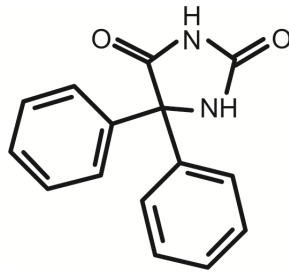
**Abb. 4 – Valproinsäure.** VPA: 2-Propylpentansäure (nach Neels et al. 2004).

VPA wird oral gut absorbiert und hauptsächlich in der Leber abgebaut. 30% werden mittels  $\beta$ -Oxidation durch die Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP2A6 metabolisiert und weitere 40% glukuronidiert. Einige der entstehenden Metabolite zeigen bis zum vollständigen Abbau noch pharmakologische Aktivität. Es kommt nicht zu einer Induktion hepatischer Enzyme. So wird weder die eigene Metabolisierung verstärkt, noch der Abbau anderer Pharmaka beschleunigt. VPA kann zur Hemmung metabolischer Prozesse in der Leber führen. Oxidation, Konjugation und Epoxidation anderer Medikamente können durch die mögliche größere Affinität der Enzyme zu VPA gestört sein (Brodie 1992).

#### 1.3.4. Phenytoin (PHT)

Phenytoin (PHT: 5,5-Diphenylimidazolidin-2,4-dion) kann außer zur Absence-Therapie bei allen anderen Epilepsieformen angewandt werden. Der therapeutische Effekt soll nicht nur wie bei CBZ durch die spannungs- und nutzungsabhängige Blockade von  $\text{Na}^+$ -Kanälen vermittelt werden, sondern auch durch die Stabilisierung exzitatorischer Membranen, z.B. durch Blockade spannungsgesteuerter Kalziumkanäle (Yaari et al. 1977, Selzer 1978).

Auch PHT bietet ein weites Spektrum möglicher Nebenwirkungen, darunter Akne, Hirsutismus, Hautreaktionen, Übelkeit und Erbrechen.



**Abb. 5 – Phenytoin.** PHT: 5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione (nach Neels et al. 2004).

PHT ist nur begrenzt wasserlöslich und zu 80-90% im Plasma an Albumin gebunden. Es wird dosisabhängig eliminiert. 90% des PHT metabolisieren die Enzyme CYP2C9 und CYP2C19 in der Leber. Ab einer PHT-Konzentration von 10 mg/l kommt es zu einer Sättigung der Abbauenzyme, es kann zu intoxikations-ähnlichen Zuständen kommen. Bei Hemmung des PHT-Metabolismus, z.B. durch Medikamente wie Allopurinol, Chloramphenicol, Cotrimoxazol, Isoniazid, Omeprazol, oralen Antikoagulanzen und durch einige Sulfonamide, kann es zu einer neurotoxischen Wirkung des PHT kommen. Ähnlich wie CBZ induziert PHT den eigenen Abbau. Auch andere Pharmaka wie VPA, Ethosuximid, Antikoagulanzen, Kortikosteroide, Benzodiazepine, Cyclosporin, Tacrolimus und orale Kontrazeptiva werden beschleunigt metabolisiert (Brodie und Dichter 1996).

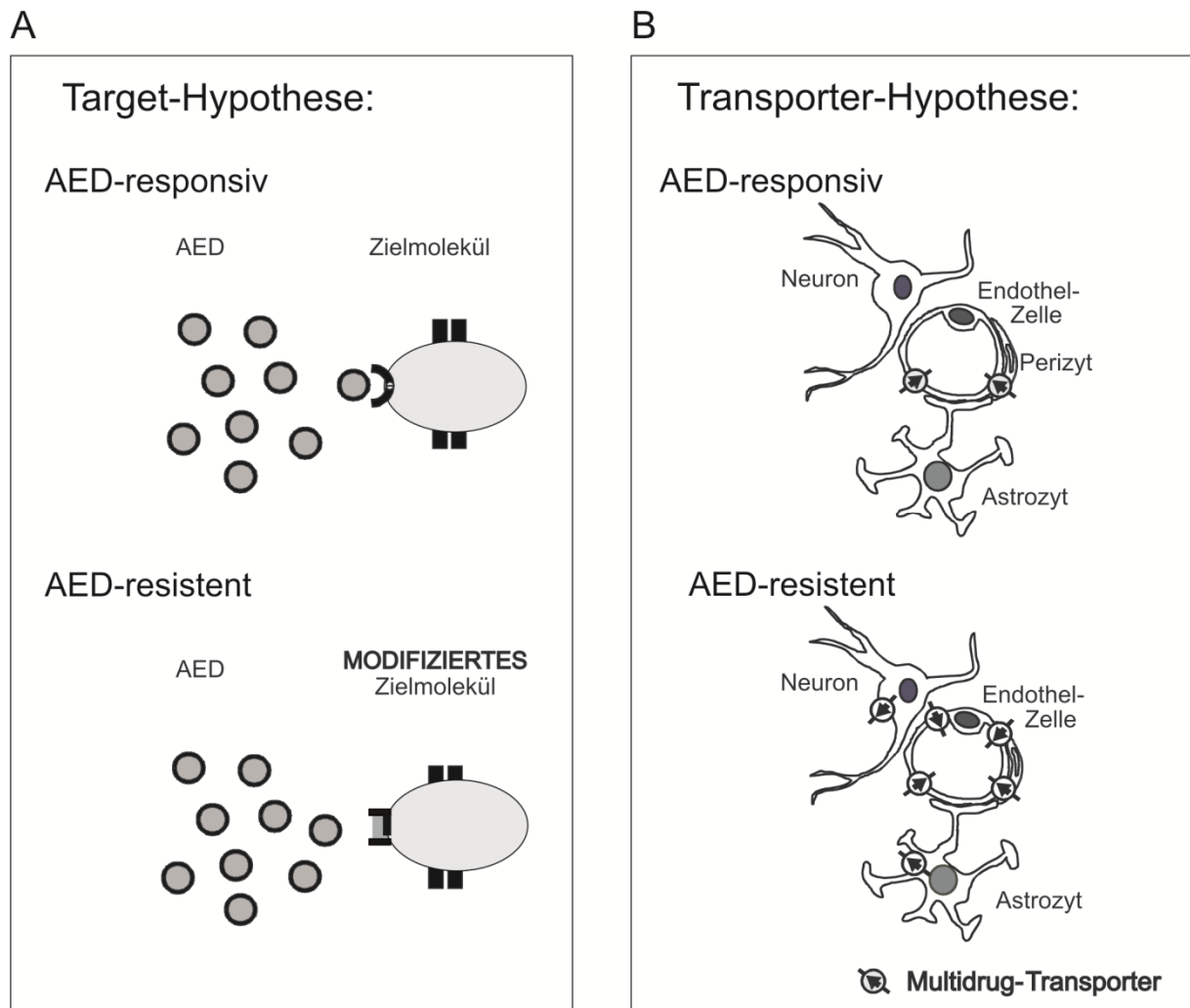
## 1.4. Pharmakoresistenz

Pharmakoresistenz ist ein häufiges Problem in der Epilepsiebehandlung. Im Allgemeinen wird angenommen, dass ca. 30% der Patienten trotz adäquater Therapie (dies beinhaltet eine mindestens zweijährige Therapie mit mehr als zwei verschiedenen „Firstline“-AED in ausreichender Dosierung und Compliance) weiter an epileptischen Anfällen leiden und somit pharmakoresistent sind (Brodie und Dichter 1996, Kwan und Brodie 2000, Hitiris et al 2007). Bestimmte klinische Faktoren wie z.B. die Anfallshäufigkeit vor Therapiebeginn, frühes Auftreten der Epilepsie oder einige Formen struktureller Gehirnläsionen korrelieren mit dem Auftreten von Pharmakoresistenz. Bei fokaler Epilepsie ist sie besonders häufig (Regesta und Tanganelli 1999).

Eine verbleibende Therapieoption ist die Resektion des epileptogenen Gewebes (Fokus). Postoperativ sind 66% bis 85% der Patienten anfallsfrei oder zumindest pharmakosensitiv

(Wiebe et al. 2001, Engel 2001, Tanriverdi et al 2008 a und b). Aufgrund der Effizienz dieser Methode ist zu vermuten, dass das resezierte Gewebe sowohl epileptogen als auch pharmakoresistent ist.

Mechanismen, die der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Pharmakoresistenz zugrunde liegen, sind weitgehend ungeklärt. Zwei Hypothesen werden besonders diskutiert und sind Anlass für experimentelle Untersuchungen: die Target-Hypothese und die Transporter-Hypothese (Remy und Beck 2006).



**Abb. 6 – Schematische Darstellung von Target- und Transporter-Hypothese.** (modifiziert nach Remy und Beck 2006)

### 1.4.1. Target-Hypothese

Die Target-Hypothese erklärt das Auftreten von Pharmakoresistenz mit intrinsischen oder erworbenen Veränderungen der Zielstrukturen von antikonvulsiv wirkenden Medikamenten und somit verminderter Wirkeffektivität (Löscher und Schmidt 2004, Beck 2007).

Im Tiermodell wurde für chronisch epileptische Tiere (Pilocarpin-Modell), im Gegensatz zum Ergebnis in Kontrolltieren, ein Verlust der nutzungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanalblockade durch CBZ gezeigt. Dies konnte auch in humanen Körnerzellen des Gyrus dentatus aus Geweberesektaten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie nachgewiesen werden. Es lässt auf die Insensitivität von Na<sup>+</sup>-Kanälen gegenüber CBZ als möglichen Beitrag zur Pharmakoresistenz schließen (Remy et al 2003a). Veränderte Konformation, Regulation oder Expression der spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle könnte somit zur gestörten Pharmakosensitivität führen. Weitere Untersuchungen im Pilocarpinmodell ergeben die Herunterregulierung der Na<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten Nav 1.2, Nav 1.6 und Naβ<sub>1</sub> bis zu 30 Tage nach einem Status epilepticus (Ellerkmann et al. 2003). Für Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors als weitere Zielstruktur einiger Antikonvulsiva ist in einzelnen Zellen des Gyrus dentatus epileptischer Ratten ebenfalls eine reduzierte Pharmakosensitivität beschrieben (Brooks-Kayal et al. 1998). Veränderungen im „Target“ können theoretisch auch in Veränderungen der Netzwerkarchitektur liegen. So besteht die Möglichkeit vermehrter Interaktion von Interneuronen, wenn die erregenden Zellen degenerieren. In einer solchen Situation blockieren Natriumkanal-Antagonisten möglicherweise die hochfrequenten Entladungen an Interneuronen. GABA-Mimetika könnten eine verstärkte Disinhibition bei verstärkter GABAerger Interaktion von GABAergen Zellen bewirken. Für dieses Szenario gibt es allerdings noch wenig Evidenz.

Die Alleingültigkeit der Target-Hypothese ist vor dem Hintergrund einiger Antikonvulsiva, die an mehreren Zielstrukturen wirken, fraglich und führt zur Diskussion einer weiteren Hypothese: der Transporter-Hypothese.

### 1.4.2. Drug-Transporter-Hypothese

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) verhindert die Diffusion hydrophiler Substanzen ins Hirnparenchym, wohingegen lipophile Moleküle wie z.B. Antikonvulsiva die BHS passieren können. Für einige lipophile, therapeutische Substanzen besteht trotzdem eine reduzierte Penetration des Hirnparenchyms. Eine Erklärung bieten ATP-bindende Transportmoleküle, die



Multi-Drug-Transportproteine (MDT-Proteine). Diese sind an der apikalen Endothelzelle lokalisiert. Sie sorgen für einen aktiven Efflux lipophiler Substanzen und könnten so für reduzierte AED-Konzentrationen am Wirkort verantwortlich sein. Dies kann ein physiologischer Schutzmechanismus des ZNS gegen schädliche körpereigene und -fremde Stoffe sein (Lee et al. 2001, Löscher und Potschka 2005). Weitere Funktionen und die Regulation ihrer Expression sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Gene der „adenosine-triphosphat-binding-cassette“ (ABC)-Proteinsuperfamilie kodieren zum überwiegenden Teil für die MDT-Proteine. Sie werden systematisch in sieben Subfamilien unterteilt (ABCa-g) (Dean et al. 2001). MDT-Proteine sind unter anderem das P-Glykoprotein (Pgp), die Multidrug-Resistenz assoziierten Proteine 1-5 (MRP1-5), das Breast Cancer Related Protein (BCRP), das Major Vault Protein (MVP), sowie Organische Anionen Transporter (OAT). Studien zeigen, dass diese ATP-getriebenen MDT-Proteine bei pharmakoresistenter Epilepsie hochreguliert und an der BHS vermehrt exprimiert sind (Lazarowski et al. 2007, Dombrowski et al. 2001, Aronica et al. 2004, Marchi et al. 2005). Weiterhin wird eine ektope Überexpression von MDT-Proteinen in Astrozyten und Neuronen beobachtet (Decleves et al. 2000, Sisodiya et al. 2001, Sisodiya et al. 2002, Aronica et al. 2004).

MDT-Proteine der BHS „pumpen“ AED aktiv aus dem Hirnparenchym heraus. Ektop exprimierte MDT-Proteine können die AED aus dem Intrazellulärraum eliminieren. Beide Mechanismen sollen zur reduzierten, parenchymalen und intrazellulären Wirkstoffkonzentration von AED und somit Pharmakoresistenz führen.

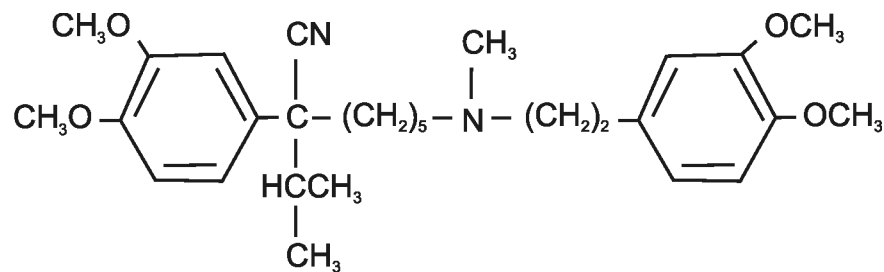
## **1.5. Multidrugtransporter – Inhibitoren**

### *1.5.1. Verapamil (VPM)*

Verapamil (VPM) ist ein Phenylalkylaminderivat und wird klinisch bei Hypertonie, Herzrhythmusstörungen und Vasospasmen eingesetzt. Er wirkt als Blocker von T- und L-Typ-Kalziumkanälen. Der experimentelle Einsatz und das Wirkungsspektrum von VPM im Rahmen von Epilepsien zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Epilepsien sind mit einer erhöhten Kalziumaufnahme in Nervenzellen assoziiert (Heinemann et al. 1977, Heinemann und Hamon 1986). Die Rolle von T-Kalziumkanälen im Rahmen der Epileptogenese bei Absenceepilepsie wird kontrovers diskutiert. In Tiermodellen für Absenceepilepsie sind erhöhte T-Typströme gefunden worden (Tsakiridou et al. 1995). Untersuchungen an humanen Gewebeschnitten des

Neokortex zeigen für VPM einen unterdrückenden Effekt auf spontane und Bicucullin-induzierte, epileptiforme Aktivität (Wiemann et al. 1996, Straub 1996). Dies wird auf die Blockade des transmembranösen Kalziumflusses zurückgeführt. In einer weiteren Studie zeigte VPM nur einen geringen antiepileptischen Effekt auf verschiedene Anfallsmodelle im in vivo Tierversuch (Palmer et al. 1993).

Weitere Untersuchungen zur möglichen antiepileptischen Potenz von VPM beruhen auf einer Kalziumkanal unabhängigen Eigenschaft: der Hemmung von P-Glykoprotein (Pgp). In onkologischen Studien wurde die Pgp-inhibierende Eigenschaft, als Möglichkeit zur Überwindung der Pharmakoresistenz von Chemotherapien, erforscht und in klinischen Studien umgesetzt (Rogan et al. 1984, Timcheva und Todorov 1996, Belpomme et al. 2000).



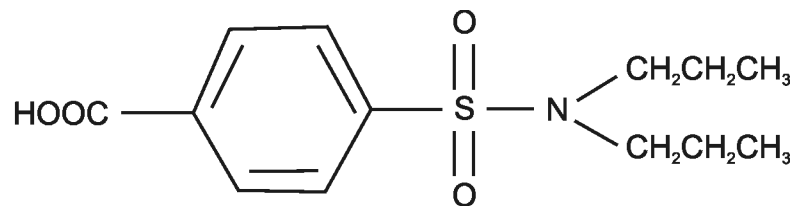
**Abb. 7 – Verapamil.** VPM: 2-Isopropyl-2,8- bis(3,4-dimethoxyphenyl)- 6-methyl-6-azaooctannitril.

In Einzelfallstudien an epileptischen Patienten wurde beobachtet, dass VPM die AED-Effizienz deutlich gesteigert hat. Zum Beispiel wurde bei einer Patientin mit komplex partialen Anfällen die Anfallshäufigkeit durch Hinzufügen von VPM zur antiepileptischen Medikation halbiert (Summers et al. 2004). In zwei anderen Fällen führte die additive Therapie mit VPM bei pharmakoresistenter juveniler myoklonischer Epilepsie ebenfalls zur verbesserten Anfallskontrolle (Ianetti et al. 2009). Bei einem weiteren Patienten konnte durch zusätzliche VPM-Gabe ein 37 Tage dauernder, bis dahin therapierefraktärer Status epilepticus unterbrochen werden (Ianetti et al. 2005).

### 1.5.2. Probenecid (PBN)

Probenecid (PBN: 4-Dipropylsulfamoylbenzoesäure) hemmt unter anderem in der Niere lokalisierte organische Anionentransporter (OAT) und findet klinisch als Urikosurikum bei der Behandlung von Hyperurikämien Anwendung. Es wird in der Niere glomerulär filtriert, im

proximalen Tubulus sezerniert und wirkt als kompetitiver Inhibitor der OAT, sodass die im distalen Tubulus stattfindende Harnsäurerückresorption ins Plasma gehemmt wird (Mason 1954). Während des II. Weltkriegs wurde PBN zur Reduktion der Penicillindosis bei knappen Antibiotikareserven verwendet. Aktuell wird diskutiert, ob es durch Hemmung der renalen Tamiflusekretion bei einem Grippeausbruch ebenfalls zu dessen Dosisreduktion verwendet werden könnte (Butler 2005).



**Abb. 8 – Probenecid.** PBN: 4-(Dipropylsulfamoyl)benzoesäure.

Eine weitere Eigenschaft von PBN ist die Hemmung von Multi-Resistant-Proteins (MRP). Im Rahmen von klinischen und laborchemischen Studien wird die Wirkung der Koapplikation von PBN mit einem Chemotherapeutikum (z.B. Methotrexat) auf verschiedene onkologische Entitäten überprüft. In einer Tierstudie war die Überlebenszeit von Mäusen mit L1210-Leukämie unter Kombinationstherapie mit PBN mit 213% höher als unter alleiniger Methotrexattherapie (152%). Weiterhin zeigte sich die Methotrexatkonzentration in Plasma und Gewebe von PBN abhängig (Sirotnak et al. 1981).

Ähnlich wie VPM findet PBN aufgrund der Transporter-hemmenden Eigenschaft nun auch in der Epilepsieforschung Anwendung. Eine Mikrodialysestudie in Hasen vergleicht die VPA-Konzentration in der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns und im intrazellulären Kompartiment unter Infusion von VPA und PBN mit der alleinigen VPA-Infusion. Die Ergebnisse zeigen einerseits erhöhte VPA-Konzentrationen unter zusätzlicher PBN-Infusion (213% vs. 47%) und liefern andererseits Hinweise für die Existenz eines Efflux-Transport-Systems in Zellen des Gehirngewebes (Scism et al. 2000). Eine Studie in Ratten zeigt Überexpression von Multidrug-Resistenz assoziierten Proteinen (MRP 1 und 2) sowie von „breast cancer-resistance protein“ (BRCP) nach elektrisch induziertem Status epilepticus. Die PHT-Konzentration in den chronisch epileptischen Tieren ist signifikant niedriger als in den Kontrollen. Unter Koapplikation mit dem MRP-Inhibitor PBN steigt die PHT-Konzentration an (Van Vliet et al. 2005). Inwieweit diese

Ergebnisse reproduzierbar, auf den Menschen anwendbar und klinisch relevant sind, ist noch nicht geklärt.

PBN findet experimentell in einer weiteren Kombination Anwendung. Es hemmt den Kynurensäure (KYNA)-Transport an der BHS. KYNA fungiert am Glycinkomplex des N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptors als endogener Inhibitor. Weiterhin hemmt KYNA präsynaptische Alpha7-Nicotin-Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) und vermittelt so eine Reduktion der Glutamatfreisetzung. Da „excitatory amino acid“ (EAA)-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in neurologischen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Schlaganfall und auch Epilepsie spielen könnten, wird die Rolle des EAA-Inhibitors KYNA zunehmend in diesem Zusammenhang experimentell untersucht. Die KYNA-Konzentration im Gehirn kann durch PBN erhöht werden und könnte so den o.g. Erkrankungen eine mögliche neue Behandlungsstrategie bieten. Eine elektrophysiologische Studie in Ratten zeigt für KYNA und PBN einen protektiven Effekt gegenüber der Induktion von epileptischen Anfällen mit Pentylentetrazol (Németh et al. 2004, Németh et al. 2005). Als singulärer Effekt ist die Hemmung von „Spreading Depolarizations“ (SD) unter örtlicher Applikation von 20 mM PBN im Striatum der Ratte anzusehen. Dieses Ergebnis wird im Zusammenhang mit einer Lactaterhöhung im Gewebe durch Inhibition des Effluxes mittels PBN diskutiert (Taylor et al. 1997).

Es liegen derzeit keine Untersuchungen zu Kombinationseffekten oder singulären Effekten von PBN in humanem Gehirngewebe vor.

## **1.6. Fragestellung und Konzeption der Arbeit**

Die genauen Faktoren der Pharmakoresistenz bei fokalen Epilepsien sind trotz mehrerer Versuchsansätze und Studien nicht genau geklärt. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierstudien auf die Patienten ist umstritten und Ergebnisse aus humanen Studien mit adäquater Fallzahl sind spärlich. Bisherige Daten aus humanem Gewebe zeigen, dass der Gyrus dentatus unter BHS-umgehender Applikation von CBZ in 82% der Fälle pharmakoresistent ist. Das Gewebe von Patienten mit kurzzeitigem Bestehen der Epilepsie, durch nicht-hippokampal-infiltrierende Tumoren, ist gegenüber CBZ pharmakosensibel (Jandova et al. 2006). Es stellt sich die Frage, ob die Pharmakoresistenz nur den Hippokampus betrifft oder weitere Strukturen betroffen sind. Weiterhin ist es interessant, ob Pharmakoresistenz auch in Bezug auf andere

Antiepileptika besteht und es Möglichkeiten zur Wiederherstellung der Pharmakosensitivität gibt. Zudem ist ungeklärt ob es Zusammenhänge zwischen den Effekten im elektrophysiologischen Versuch mit dem Expressionsverhalten der MDT gibt.

Diese Arbeit ist im Rahmen eines Gruppenprojekts zur Beantwortung der oben genannten Fragen entstanden. Sie bezieht sich auf einen Teil von Experimenten, die im Temporalen Kortex durchgeführt wurden. Weitere Versuche zur Untersuchung des Hippokampus sowie der Expression von MDT (durchgeführt von Simon Kim, Dennis Päsler und Claudia Raue) im untersuchten Gewebe gehören zu dem Gesamtprojekt

Im Rahmen meiner Arbeit sollen folgende Fragestellungen im Temporalen Kortexgewebe beantwortet werden:

- 1) Gibt es ein adäquates Akutmodell für epileptische Aktivität, anhand dessen Fragestellungen zur Pharmakoresistenz in reseziertem Kortexgewebe von Patienten mit pharmakoresistenter TLE bearbeitet werden können?
  - a. Was sind Eigenschaften der induzierten Aktivität?
  - b. Zeigen sich Differenzen bezüglich der Aktivitätsinduktion in pathologisch verändertem Gewebe gegenüber „unauffälligem“?
  - c. Ist die induzierte Aktivität über die gesamte Versuchsdauer stabil?
- 2) Ist reseziertes Kortexgewebe von Patienten mit TLE pharmakoresistent gegenüber gängigen Antikonvulsiva?
- 3) Haben MDTI wie VPN und PBN Effekte auf die epileptische Aktivität?
- 4) Können MDT-Inhibitoren die Pharmakoresistenz „aufheben“?
- 5) Wo sind Mechanismen der Pharmakoresistenz lokalisiert? Welche Rolle spielt die BHS? Wie ist der Beitrag parenchymaler Mechanismen?
- 6) Gibt es Zusammenhänge zwischen Charakteristika der Patienten mit den elektrophysiologischen Ergebnissen? Lassen sich Patienten charakterisieren, bei denen die Koapplikation von AED und MDTI effektiv ist?

## **2. METHODEN**

### **2.1. Patienten**

Um Anfallsfreiheit bzw. Pharmakosensitivität zu erreichen, wurden bei Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie (TLE) Anteile des Hippokampus und Temporalen Kortex chirurgisch reseziert. Von einer Pharmakoresistenz wurde ausgegangen, wenn durch zwei oder drei AED mit maximal tolerierter Dosis innerhalb von zwei Jahren keine Anfallsfreiheit erreicht werden konnte (Dlugos 2001). Die prächirurgische Diagnostik der MTLLE wurde entsprechend den deutschen und europäischen Leitlinien für prächirurgische Diagnostik (European Federation of Neurological Societies Task Force 2000) im Epilepsiezentrum Berlin-Brandenburg durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt (EA1/042/04) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Patienten wurden über die Verwendung des resezierten Gewebes aufgeklärt und teilten ihr Einverständnis durch eine schriftliche Erklärung mit.

### **2.2. Gewebetransport, Präparation und Aufbewahrung des Gewebes**

Bei anteriorer Polresektion des humanen Temporalen Kortex wurden unter anderem zwei bis drei coronare Kortextblöcke von ~4 mm Dicke entnommen, die sofort in eine 0.5 - 1 °C kalte, carbogenierte Transportlösung überführt wurden. Die Transportlösung enthielt (Angaben in mM): 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glukose, 2 MgSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1.6 CaCl<sub>2</sub>, 200 Saccharose, 21 NaHCO<sub>3</sub>, sowie 0.1 alpha-Tocopherol (pH: 7.4, Osmolalität: 304 mosmol/kg, Ethanol 0.005v%) (s.a. Gabriel et al. 2004, Kann et al. 2005, modifiziert). Der 30-minütige Transport erfolgte in einem luftdichten Thermogefäß, das eine Temperatur  $\leq 1$  °C und einen Sauerstoffpartialdruck  $> 580$  Torr bei Ankunft im Labor garantierte. Dort wurden aus den Kortextgewebeblöcken mit einem Vibratom (Campden Instruments Ltd, Leicester, UK) 500  $\mu$ m dicke Schnitte präpariert, in eine Interface-Kammer transferiert und dort gelagert. Die Interface-Kammer bietet die Möglichkeit die Gewebevitalität über einen bestimmten Zeitraum zu erhalten und elektrophysiologische Studien, unter kontrollierten Bedingungen, ex vivo durchzuführen. Die Lagerung erfolgte unter regelmäßiger Perfusion (1.7 ml/Minute) mit carbogenierter künstlicher cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF). Die Lösung enthielt (Angaben in mM): 129 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 Glucose, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1.6 CaCl<sub>2</sub> , 21 NaHCO<sub>3</sub> und 0.03 alpha-Tocopherol

(Temperatur: ~ 34,2°, pH: 7.4 Osmolalität: 303 mosmol/kg, 0.0025 v% Ethanol). Die Hirngewebeschnitte erholten sich optimal von Operation und Transport in natriumfreier Lösung bei Lagerung unter oben genannten Bedingungen und Messbeginn vier Stunden nach Präparation.

## **2.3. Elektrophysiologische Messungen**

### *2.3.1. Messmethoden*

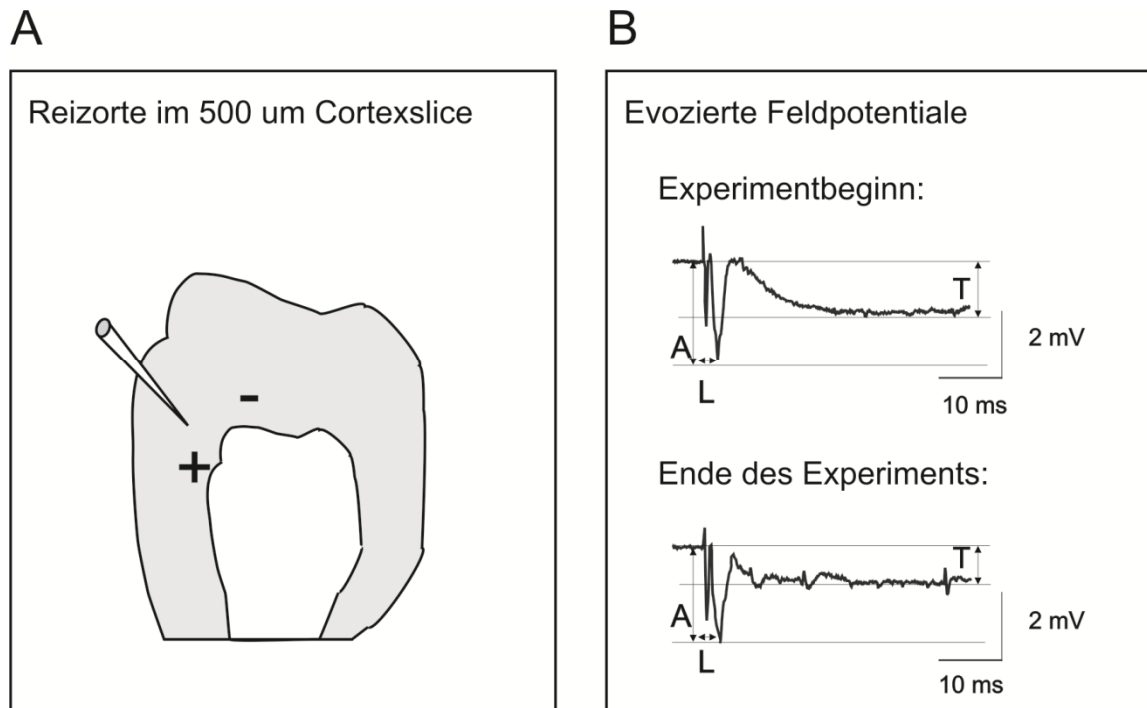
Zu Beginn jeder Messung erfolgte die Ableitung von reiz-evozierten Feldpotentialen (s. 2.3.2), dann wurde epileptiforme Aktivität ausgelöst (s. 2.3.3) und ein bestimmtes Versuchsprotokoll durchgeführt (s. 2.3.6.). Abschließend wurden zur Überprüfung der Gewebevitalität erneut Feldpotentiale evoziert und mit denen am Beginn verglichen.

Als Messelektroden dienten 2-Kanal-K<sup>+</sup>-selektive/Referenz-Mikroelektroden (Lux und Neher 1973). Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Elektroden reagierten auf einen zehnfachen K<sup>+</sup>-Konzentrationsanstieg mit einer Potentialänderung von 55-60 mV. Alle Messdaten wurden mit dem Programm Spike 2 (Version 4.01, CED; Cambridge UK) mit einer Auflösung von 10 kHz (3 kHz Filter) für die Feldpotentiale und einer Auflösung von 100 Hz (1.6 Hz Filter) für die [K<sup>+</sup>] aufgenommen und gespeichert. Die in mV registrierten Kaliumwerte wurden über eine modifizierte Nernstgleichung in die entsprechenden Kaliumionen-Konzentrationen (mM) umgerechnet.

### *2.3.2. Ableitung und Auswertung evozierter Feldpotentiale*

Die Gewebevitalität und neuronale Netzwerkantwort wurde anhand der Ableitung evozierter Feldpotentiale mit 30, 50, 80 und 100% der resultierenden maximalen Amplitude überprüft. Es wurden gepaarte elektrische Reizungen (alle 20 s, 0.1 ms Dauer, 1-15 V, 50 ms Puls-Intervall) verwendet. Die Stimulation zur Ableitung evozierter Potentiale erfolgte mit bipolaren Stimulationselektroden (Platindrähte, Durchmesser: 20 µm, Abstand zwischen den Spitzen: 40-80 µm).

Um Artefakte und Verzerrungen der Versuchsergebnisse durch einen möglichen Verlust der Gewebevitalität auszuschließen, wurden nur Gewebeschnitte Versuche mit mindestens 75%-iger Amplitude des ursprünglichen Potentials in diese Studie einbezogen.

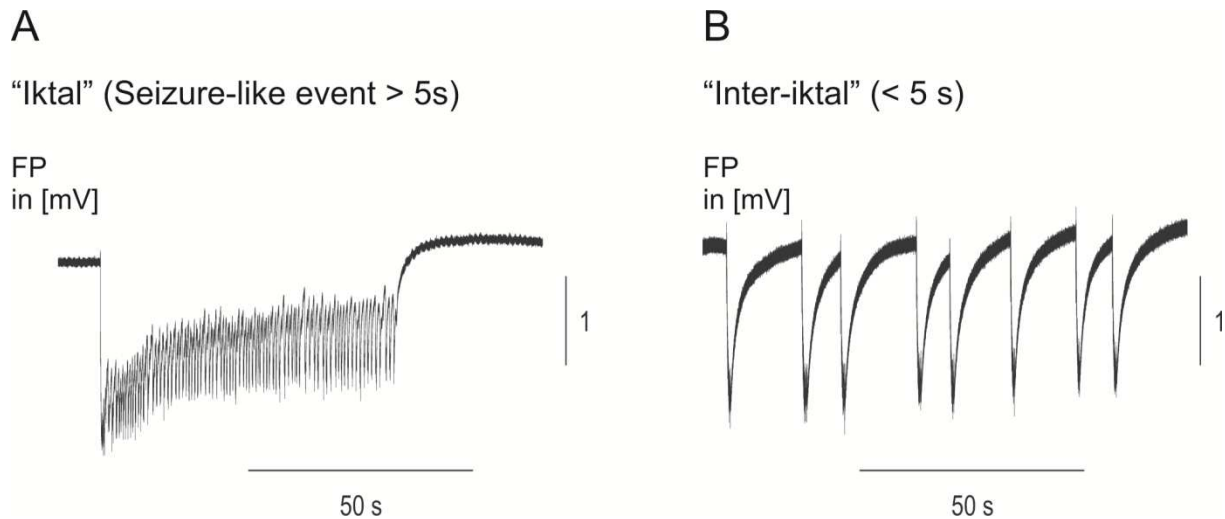


**Abb. 9 – Reizorte und evozierte Potentiale im Kortexgewebeschnitt.** **A:** Schema der Elektrodenpositionierung im Kortexgewebeschnitt: Ableitung in Lamina 5/6. **B:** Evoziertes Potential zu Beginn und Ende des Experiments; Auswertung der Parameter: *A* – Amplitude, *L* – Latenzzeit und *T* – negative Transiente.

### 2.3.3. Induktion und Auswertung epileptiformer Aktivität im Gewebeschnitt

Das chronisch epileptische Gewebe des Temporalen Kortex zeigte zwar zum Teil epileptiforme Veränderungen der evozierten Feldpotentiale (zum Beispiel die negative Transiente s.a. Abb. 9 B), es war jedoch in den durchgeführten *in vitro*-Ableitungen selten spontan epileptisch aktiv. In dieser Studie wurde epileptiforme Aktivität durch aufeinanderfolgendes Einwaschen von 1.) 8 mM Kalium und 2.) 50 µM Bicucullin ausgelöst (Für Effekte von Hoch-[K<sup>+</sup>] und Bicucullin an Gewebe von Ratten: Patrylo et al. 1994, Borck und Jefferys 1999, Wozny et al. 2005, Isaev et al. 2005.). Die so induzierte epileptiforme Aktivität wurde in Anlehnung an humane Tiefenhirnelektrodenaufzeichnungen (Spencer 1992) in verschiedene Typen klassifiziert: „iktale“ und „inter-iktale“ Aktivität (s. Abb10).





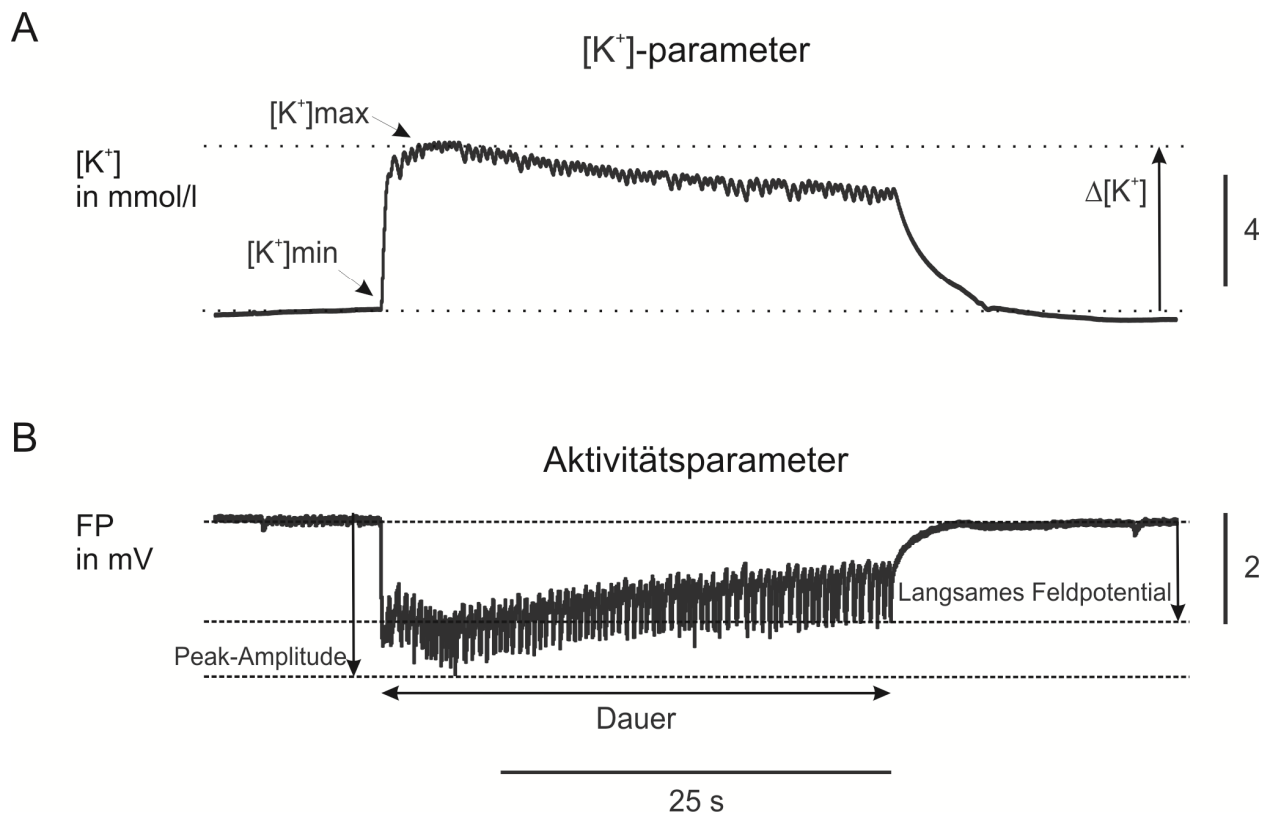
**Abb. 10 – Aktivitätstypen.** Klassifizierung der verschiedenen Aktivitätstypen in Anlehnung an Aufzeichnungen von Tiefenhirnelektroden im humanen epileptischen Gehirn. Iktale, also anfalls-artige Ereignisse (**A**) werden von inter-iktal auftretenden Spikes (**B**) anhand der Ereignisdauer unterschieden.

Zur weiteren Beschreibung der epileptiformen Aktivität wurden **fünf verschiedene Aktivitätsparameter** bestimmt (Abb. 11).

1. Die Ereignisrate (n/Minute),
2. die Slow Field Potential-Amplitude (sfp, der langsame Anteil der Feldpotentialänderung eines Ereignisses – in mV),
3. die maximale Amplitude des Ereignisses (inklusive der größten Potentialänderungen, die dem sfp überlagert sind – in mV),
4. die Ereignisdauer (definiert als der Zeitraum vom Anfang des Ereignisses beim Abweichen von der Basislinie bis zum 2/3-Erholungspunkt des sfp – in s) und
5. die Frequenz der transienten Potentialfluktuationen, die dem sfp überlagert sind (minimale Amplitude 0.3 mV und minimale Dauer 3 ms – in Hz).

Weiterhin wurden drei Kaliumparameter festgelegt, die jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten eines epileptiformen Ereignisses **die extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration ( $[K^+]$ )** beschreiben.

1. die minimale  $[K^+]$  (der Tiefpunkt vor dem Ereignis –  $[K^+]_{\min}$  in mmol/l),
2. die maximale  $[K^+]$  (die höchste während des Ereignisses gemessene Kaliumionen-Konzentration –  $[K^+]_{\max}$  in mmol/l) und
3. die Differenz der beiden Werte, die den Kaliumanstieg widerspiegelt, der durch ein epileptiformes Ereignis ausgelöst wurde ( $\Delta[K^+]$  in mmol/l), (s.a. Abb. 11A).



**Abb. 11 – Kaliumionen-Konzentrationsparameter und Aktivitätsparameter der induzierten epileptiformen Aktivität.**

#### 2.3.4. Charakterisierung der induzierten Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der Aktivität erfolgte die Perfusion mit dem kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten D-2-Amino-5-Phosphonopentanoat (D-APV, 30  $\mu$ M) (Lambert et al. 1990, Boulis et al. 1990) und mit 6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (CNQX, 30  $\mu$ M), einem kompetitiven Antagonisten an AMPA-/Kainat-Rezeptoren (Bleakman und Lodge 1998, Bäckström und Hyttiä 2003).

#### 2.3.6. Versuchsprotokolle

Zur Testung der Pharmakoresistenz im resezierten Kortexgewebe wurde zunächst ein AED (CBZ, VPA oder PHT) eingewaschen (86 Gewebeschnitte, 31 Patienten) und anschließend die MDTI VPM und PBN zur Perfusionslösung hinzugefügt (76 Gewebeschnitte, 29 Patienten) um zu prüfen, ob die Inhibition der Multidrug-Transporter zur Verbesserung der AED-Wirkung führen kann.

#### **- Präinkubation mit AED (PI AED):**

1. Induktion epileptiformer Aktivität durch Erhöhung der  $[K^+]$  in der ACSF auf 8 mM, dann zusätzliche Perfusion mit 50  $\mu$ M Bicucullin.
2. + **AED:** CBZ (50  $\mu$ M) oder VPA (1 mM) oder PHT (50  $\mu$ M).
3. + **MDTI:** VPM (40  $\mu$ M) und PBN (400  $\mu$ M).
4. Erholungsphase: Auswaschen der Medikamente in 8 mM  $[K^+]$ - und 50  $\mu$ M Bicucullin-haltiger ACSF

Um herauszufinden, ob eine längere Dauer der Applikation von MDTI notwendig ist um die Effizienz der AED zu erhöhen, wurde ein zweites Protokoll ausgeführt. Die Präinkubation erfolgte mit MDTI (PI MDTI) und danach wurde ein AED zur Perfusionslösung hinzugefügt (30 Gewebeschnitte, 13 Patienten).

#### **- Präinkubation mit MDTI (PI MDTI):**

1. Induktion epileptiformer Aktivität durch Erhöhung der  $[K^+]$  in der ACSF auf 8 mM, dann zusätzliche Perfusion mit 50  $\mu$ M Bicucullin.
2. + **MDTI:** VPM und PBN.
3. + **AED:** CBZ oder VPA oder PHT.
4. Erholungsphase: Auswaschen der Medikamente in 8 mM  $[K^+]$ - und 50  $\mu$ M Bicucullin-haltiger ACSF.

Um Effekte der zu prüfenden Substanzen von zeitabhängigen Veränderungen der induzierten epileptiformen Aktivität und von Wirkungen der MDTI bei längerer Applikation abzugrenzen, wurden Kontrollexperimente nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt.

#### **- Kontrollversuche I („ohne Substanzapplikation“)**

In 15 Kortexgewebeschnitten von fünf Patienten wurde die induzierte epileptiforme Aktivität ohne weitere Substanzapplikation für 60-80 Minuten aufgezeichnet, um den natürlichen Zeitgang zu evaluieren (Protokoll 3). Es sollte ausgeschlossen werden, dass die induzierte Aktivität ohne Substanzapplikation einen instabilen Verlauf hat, um mögliche Fehlinterpretationen nach Substanzapplikation zu vermeiden.

## - Kontrollversuche II (MDTI-Applikation)

Weiterhin wurde getestet ob die alleinige Applikation der MDTI (VPM und PBN) Effekte auf die epileptiforme Aktivität hat (Protokoll 4). Hierfür wurden in zehn Kortextgewebeschnitten von sechs Patienten nach Induktion epileptiformer Aktivität die MDTI VPM und PBN mindestens 40 Minuten appliziert.

## 2.4. Datenerfassung und Datenanalyse

Ziel der Analyse war die Erfassung qualitativer und quantitativer Unterschiede in der epileptiformen Aktivität am Ende jeder mindestens 20 Minuten dauernden Phase der Untersuchung.

1. Phase (Zeitpunkt 0): nach Induktion und Stabilisierung der Aktivität (Kontrollbedingungen, alle Protokolle);
2. Phase (Zeitpunkt 20 Minuten): nach Perfusion mit AED (Protokoll 1, AED), mit MDTI (Protokolle 2 und 4) oder in Kontrollversuchen ohne Gabe von Substanzen (Protokoll 3);
3. Phase (Zeitpunkt 40 Minuten): nach Koapplikation von AED und MDTI (Protokolle 1 und 2), bei Kontrollversuchen ohne jede Applikation von Substanzen (Protokoll 3) sowie bei alleiniger Gabe beider MDTI (Protokoll 4);
4. Phase (Zeitpunkt 60-80 Minuten): nach Auswaschen der Medikamente (Erholungsphase Protokolle 1, 2 und 4) bzw. Fortsetzung der Kontrollversuche ohne Substanz-Applikation (Protokoll 3).

Die Datenanalyse erfolgte auf der Ebene der Gewebeschnitte (Patienten-unabhängig) und auf der Ebene der resezierten Proben (Patienten-bezogen).

*A: Analyse der Aufzeichnungen aus einem Gewebeschnitt.*

Die Veränderungen der Aktivität (Aktivitätsmuster) wurden **als Suppression** kategorisiert, wenn keine epileptiformen Ereignisse mehr nachweisbar waren, **als Musteränderung zu IIS**, wenn sich der Typ der Aktivität von krampf-artiger (SLE) zu spike-artiger Aktivität (IIS) verändert hatte oder **als Resistenz**, wenn in der Untersuchungsphase keine Veränderung des Musters epileptiformer Aktivität zu beobachten war.

Im Falle der Resistenz wurden Aktivitätsmodulationen anhand quantitativer Veränderungen der Ereignisse (Aktivitätsparameter und Kaliumparameter) beschrieben.

Die Messung der Parameter erfolgte mit den vorhandenen Optionen im Programm Spike2 sowie weiteren, im Institut entwickelten Skripten (Dr. H. Siegmund, Institut für Neurophysiologie, Charité). Die Anzahl der analysierten Ereignisse variierte in Abhängigkeit von der Ereignisrate zwischen eins und sechs für SLE und zwischen drei und zwölf für IIS. Anschließend wurden die Werte für jeden Parameter und jede Phase der Untersuchung gemittelt. Um die Modulationen der resistenten Aktivität zwischen unterschiedlichen Gruppen von Gewebeschnitten vergleichen zu können, wurden die Parameter auf den Kontrollwert zum Zeitpunkt 0 normiert ( $(\text{verbliebener Wert/Kontrollwert}) * 100$ ) und in Prozent angegeben.

Im Ergebnisteil erfolgte die Darstellung der quantitativen Verteilung der Veränderungskategorien in Gruppen von Gewebeschnitten mit identischen Versuchsprotokollen und die Darstellung der Modulationen resistenter Aktivität anhand der folgenden originalen oder normierten Parameterwerte – Ereignisrate, Amplituden des langsames Feldpotentials (sfp), der Spitzenabweichung (peak), Ereignisdauer und Frequenz der Entladungen innerhalb eines Ereignisses. Um einen möglichen Trend der Parameteränderungen zu erfassen, wurden Durchschnittswerte der normierten Parameterwerte berechnet: „av3“ – der Durchschnitt der normierten Amplituden und Ereignisdauer  $((\text{sfp} + \text{peak} + \text{dauer})/3)$  und „av5“ – der Durchschnitt aller normierten Aktivitätsparameter  $((\text{frequenz} + \text{Ereignisrate} + \text{sfp} + \text{peak} + \text{dauer})/5)$ .

#### *B: Patienten-bezogene Analyse.*

Aus 38 von 47 Resektaten wurden 2-8 Gewebeschnitte untersucht. Überraschend zeigte sich, dass die Gewebeschnitte eines Teils der Resektate verschieden auf die applizierten Substanzen reagierten. Deshalb musste die Kategorisierung der Veränderungen induzierter epileptiformer Aktivität für die Patienten erweitert werden (siehe Kapitel 3.6, S. 50).

In diesem Kapitel wird auch versucht, Beziehungen zwischen den elektrophysiologisch erhobenen Befunden und den verfügbaren klinischen Daten der Patienten herzustellen. Um die Serum- und Gewebekonzentrationen der verschiedenen Antikonvulsiva zu berücksichtigen, wurden die verfügbaren Daten zu den Serumkonzentrationen und die gemessenen Gewebekonzentrationen auf die im Labor (Zentrum für Epilepsie Berlin-Brandenburg) gültigen Obergrenzen der Serumkonzentration des entsprechenden Medikamentes normiert  $((\text{Messwert/Maximalwert}) * 100)$  und als Prozent vom Maximalwert angegeben.

## 2.5. Statistik

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit werden für Original- und normierte Werte die Mittelwerte und Standardfehler angegeben. Statistische Vergleiche erfolgten, abhängig von der jeweiligen Werteverteilung, mittels nicht-parametrischer Tests (Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test, Spearman-Rho Rang-Korrelations-Koeffizient) oder parametrischer Tests (T-Test für unabhängige oder abhängige Stichproben, Pearson Korrelations-Koeffizient).

Zum Vergleich quantitativer Verteilungen kategorialer Variablen (z. B. Kategorien von Veränderungen der induzierten Aktivität) dienten der Chi<sup>2</sup>-Homogenitäts-Test (zwischen den zu vergleichenden Gruppen, unabhängige Stichproben) und der McNemar(-Bowker)-Test (innerhalb der Gruppe, abhängige Stichproben).

Ein p-Wert < 0.050 wird als signifikant angesehen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS software package Version 16.0 (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt.

Es muss davon ausgegangen werden, dass Gewebeschnitte in den zu vergleichenden „unabhängigen“ Stichproben extrem selten vom gleichen Patienten stammen können. Das heißt, dass die Bedingung der „Unabhängigkeit“ von Gewebeschnitten hinsichtlich der Patientenzugehörigkeit nicht „vollständig“ gegeben war.

## 2.6. Verwendete Substanzen

Name	Abk.	MW	[C]	Hersteller
Bicucullin-methiodid	BICU	509.3	50 µM	Fluka/Biochemika
D-2-Amino-5-Phosphonopentanoat	APV	197.13	30 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion	CNQX	232.15	30 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Carbamazepin	CBZ	236.27	50 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Valproat	VPA	166.2	1 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phenytoin / 5,5-Diphenylhydantoin	PHT	274.25	µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D .
Verapamil	VPM	491.05	40 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D.
Probenecid / p[Dipropylsulfamoyl] benzoic acid	PBN	285.36	400 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

**Tabelle 2 – Substanzen.** In Experimenten dieser Arbeit verwendete Substanzen: *Abk.* – Abkürzung; *MW* – Molgewicht in g/mol; *[C]* – verwendete Konzentration.

### **3. ERGEBNISSE**

Nach chirurgischer Entfernung von Teilen des Temporallappens und des Hippokampus sind sehr viele Patienten, die an pharmakoresistenter mesialer Temporallappenepilepsie leiden, frei von Anfällen (bei regelmäßiger Einnahme der antiepileptischen Medikation). Das entfernte Gewebe ist also „anfalls-auslösend“ und/oder trägt Faktoren der Pharmakoresistenz. Gelingt es experimentell, in diesem Gewebe epileptiforme Aktivität auszulösen, können Medikamente oder Substanzen, die potentielle Faktoren der Resistenz beeinflussen unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke appliziert und ihre Wirkung auf die Aktivität analysiert werden.

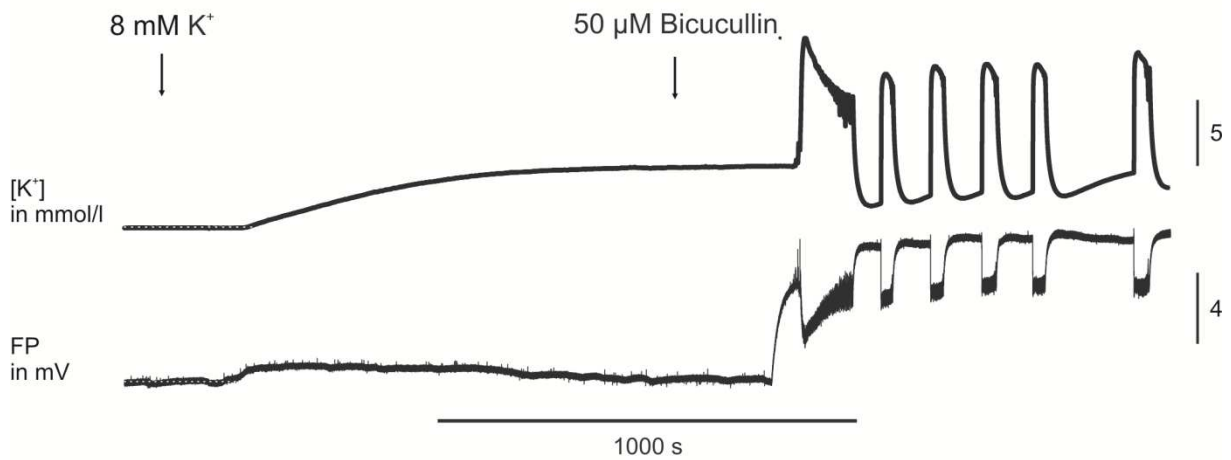
#### **3.1. Induktion epileptiformer Aktivität: Effektivität, Eigenschaften, Gewebepathologie und Gewebevitalität**

In vorausgegangenen Untersuchungen an Gewebeschnitten aus Hippokampus-Resektaten war die Induktion stabiler epileptiformer Aktivität im Gyrus dentatus mittels elektrischer Reizung im Hilus und Perfusion mit 10-12 mM  $K^+$ -ACSF möglich (Gabriel et al. 2004). Im Rahmen dieser Studie an Gewebeschnitten des Temporalen Kortex wurde zunächst festgestellt, dass die gleiche Methode („antidrome“ Stimulation und Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration [ $K^+$ ]) extrem selten zum Erfolg führt. Wurde jedoch nach vorausgegangener Perfusion mit 8 mM  $K^+$ -ACSF der GABA-A-Rezeptorantagonist Bicucullin appliziert, kam es zur Induktion krampf-artiger Aktivität (Abb. 12A). Die Induktion verlief in 141 von 166 Gewebeschnitten (85%) aus 47 von 49 Resektaten (96%) erfolgreich. Mit einer Latenzzeit von 2 bis 21 Minuten nach der Bicucullin-Applikation traten zwei Typen epileptiformer Aktivität auf: „anfalls- bzw. krampf-artige“ Ereignisse (SLE: 85% der Gewebeschnitte) und „interiktal- bzw. spike-artige“ Entladungen (IIS: 15%).

Im humanen Gyrus dentatus war die mittels Hochkalium und Stimulation im Hilus induzierte epileptiforme Aktivität durch glutamaterge synaptische Transmission vermittelt (Gabriel et al. 2004). Deshalb wurde nun im Temporalen Kortex getestet, ob die durch Perfusion mit 8 mM Kalium und 50  $\mu$ M Bicucullin induzierte epileptiforme Aktivität ebenfalls durch Glutamat-Rezeptorantagonisten unterdrückt werden kann (Abb. 12B).

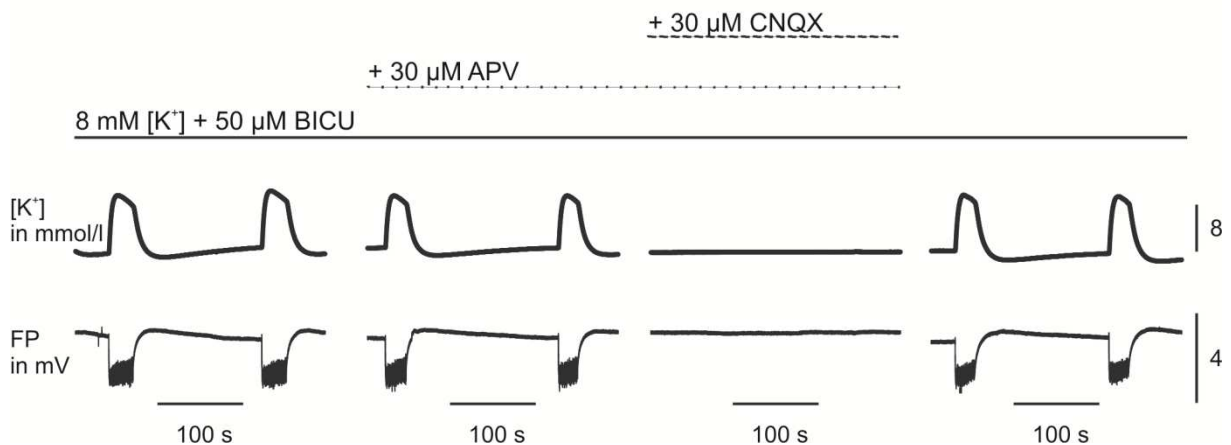
A

### Induktion epileptiformer Aktivität



B

### Eigenschaften der induzierten Aktivität



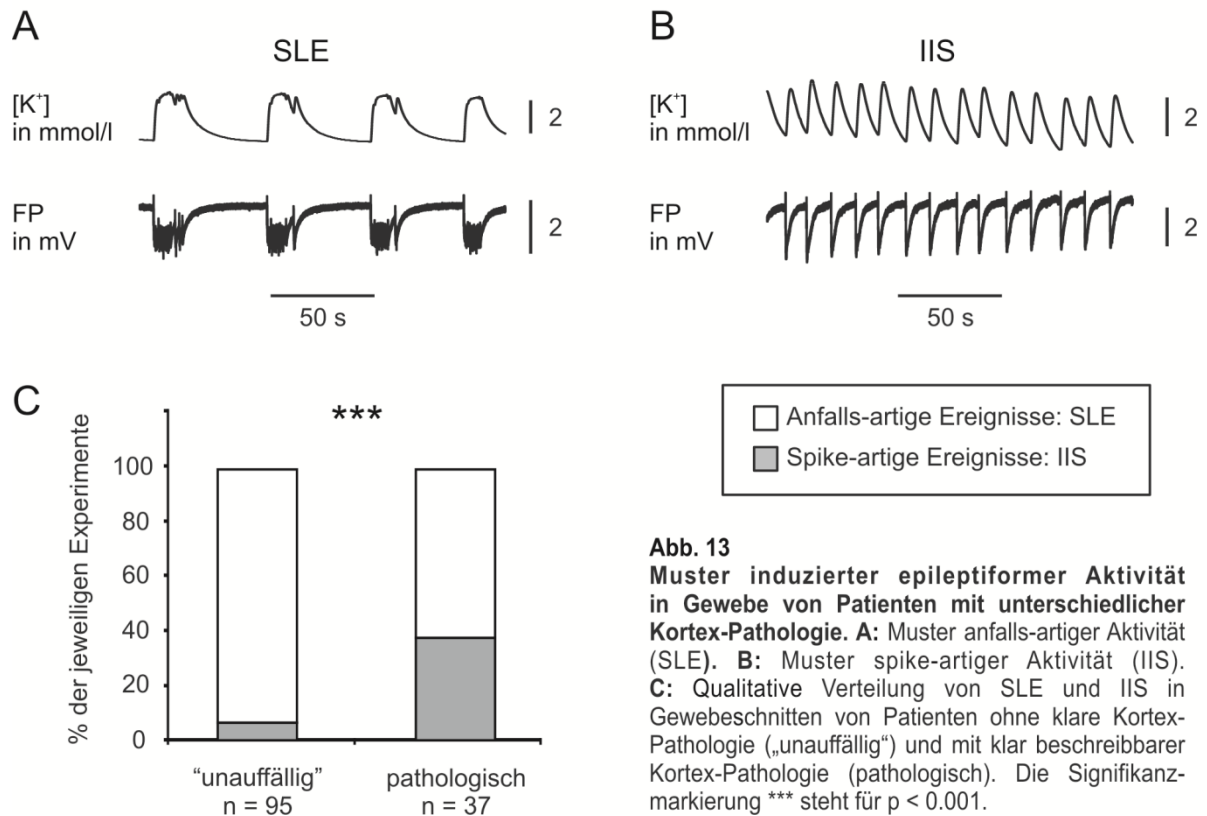
**Abb. 12 – Induktion epileptiformer Aktivität und Eigenschaften der induzierten Aktivität.** Oben: Darstellung der Kaliumionen-Konzentration in mmol/l, Unten: Feldpotential in mV. **A:** Induktion epileptiformer Aktivität. **B:** Charakterisierung der induzierten Aktivität durch Applikation von APV und CNQX. 1. Phase: „anfalls-artige Ereignisse“ (seizure-like-events: SLE) nach Induktion mit 8mM [K<sup>+</sup>] und 50 μM Bicucullin. 2. Phase: Konstanz der SLE nach APV-Applikation (30 μM). 3. Phase: komplette Suppression der epileptiformen Aktivität unter CNQX-Perfusion (30 μM). 4. Phase: nach 40-minütigem Auswaschen der Glutamat-Rezeptoren-Blocker treten erneut SLE auf.

Abb. 12B lässt erkennen, dass die Perfusion mit 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV: NMDA-Rezeptorantagonist) nicht zu Veränderungen der epileptiformen Aktivität führt. Die Zugabe von 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX: Antagonist von AMPA-/Kainat-Rezeptoren) (Keinänen et al. 1990) bewirkt eine komplette Suppression der epileptischen



Entladungen. Nach 40 Minuten Auswaschen der Glutamat-Rezeptorantagonisten, tritt erneut epileptiforme Aktivität auf. Die Darstellung zeigt, dass auch die induzierte Aktivität im Gewebe des Temporalen Kortex durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren, also „glutamaterg“, vermittelt wird (n = fünf Gewebeschnitte von drei Patienten).

### Muster induzierter epileptiformer Aktivität in Gewebe von Patienten mit unterschiedlicher Kortex-Pathologie



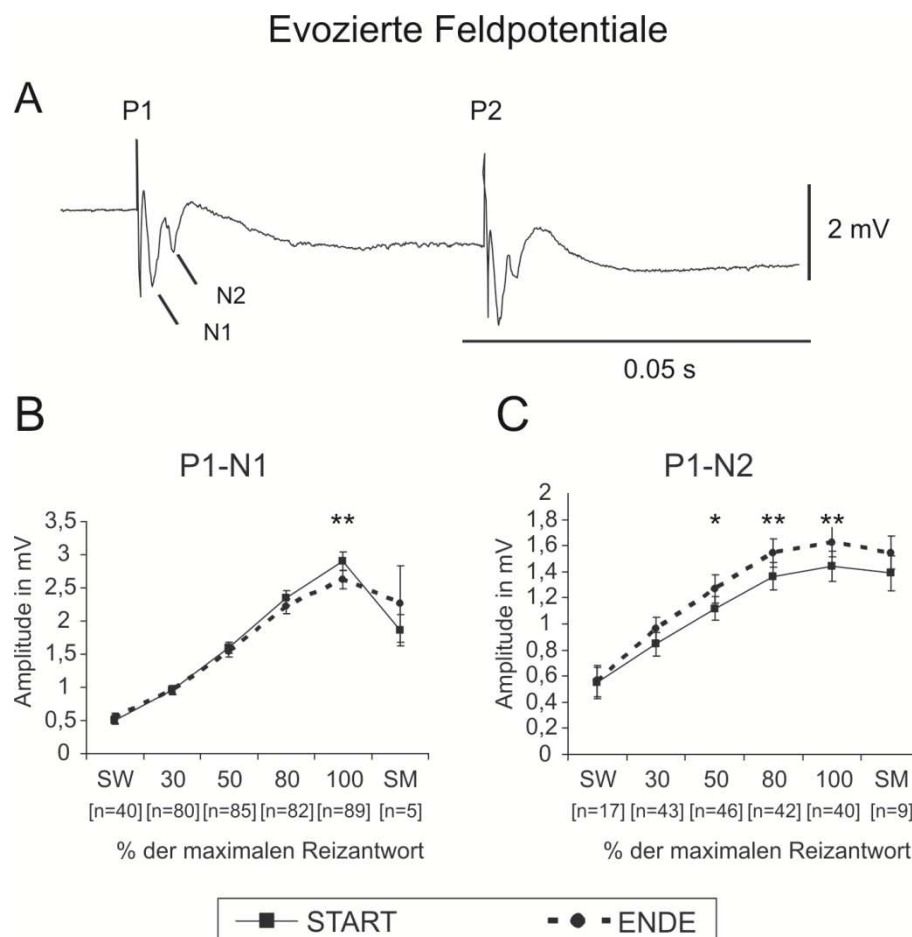
**Abb. 13**  
**Muster induzierter epileptiformer Aktivität in Gewebe von Patienten mit unterschiedlicher Kortex-Pathologie.** **A:** Muster anfalls-artiger Aktivität (SLE). **B:** Muster spike-artiger Aktivität (IIS). **C:** Qualitative Verteilung von SLE und IIS in Gewebeschnitten von Patienten ohne klare Kortex-Pathologie („unauffällig“) und mit klar beschreibbarer Kortex-Pathologie (pathologisch). Die Signifikanzmarkierung \*\*\* steht für  $p < 0.001$ .

Gabriel et al. konnten in der bereits zitierten Studie an humanem Hippokampus-Gewebe auch zeigen, dass der Typ induzierter epileptiformer Aktivität abhängig von der hippokampalen Gewebe-Pathologie variiert (Gabriel et al. 2004). Es stellt sich die Frage, ob es für das hier verwandte Modell (8 mM Kalium und 50  $\mu$ M Bicucullin) ebenfalls Zusammenhänge zwischen der Gewebe-Pathologie und dem induzierten Aktivitätstypus gibt. Es sei vorangestellt, dass alle untersuchten Proben des Temporalen Kortex grob-histologisch unauffällig waren. Die neuropathologische Diagnose ergab jedoch, dass es sich bei 28% von 132 Gewebeschnitten um perilesionales Gewebe von elf Patienten mit klar definierter Kortexpathologie (Tumor, Fokale

kortikale Dysplasie, Kontusion, Sklerose, Atrophie) handelt (für weitere neun Messungen an Proben von drei Patienten war keine histopathologische Diagnose verfügbar).

In Gewebe von Patienten mit bzw. ohne klar definierte Kortexpathologie dominieren nach der Induktionsphase die krampf-artigen Ereignisse (SLE, Abb. 13A). Allerdings werden spike-artige Aktivitätsmuster (IIS, Abb. 13B) vergleichsweise häufiger im perilesionalem Gewebe (Patienten mit klar definierter Kortexpathologie) induziert („pathologisch“ 38% vs. „unauffällig“ 6.3%,  $p \leq 0.001$ , exakter Test nach Fisher, Abb. 13C).

Für die Interpretation der in den nachfolgenden Kapiteln dargestellten Effekte von Antiepileptika (AED), Inhibitoren des aktiven Transportes körperfremder Substanzen (MDTI) und deren Koapplikation, ist es vor allen Dingen wichtig, eine mögliche Vitalitätsabnahme des Gewebes und somit auch eine entsprechende Abnahme der induzierten epileptiformen Aktivität auszuschließen.



**Abb. 14 – Evozierte Feldpotentiale.** **A:** Beispiel für Feldpotentiale die durch gepaarte elektrische Pulse im Abstand von 50 ms ausgelöst werden. Beide Potentiale (P1 und P2) zeigen eine kurz-latente und eine lang-latente Antwortkomponente (N1 und N2). **B:** Vergleich der Amplitudenwerte für P1-N1 (potentiell Summen-Aktionspotentiale erregter Fasern und antidrom erregter Neurone) am Versuchsanfang und am

Versuchende. **C:** Vergleich der Amplitudenwerte für P1-N2 (potentiell „orthodrome“ Reizantworten) am Versuchsanfang und am Versuchende. In die Analyse der Daten zu den abgebildeten Kurven wurden auch Gewebeschnitte einbezogen, die nicht in die aktuelle Stichprobe dieser Arbeit eingegangen sind (Frontaler Kortex,  $n = 11$ ),  $n$ : Anzahl der Gewebeschnitte/Experimente.

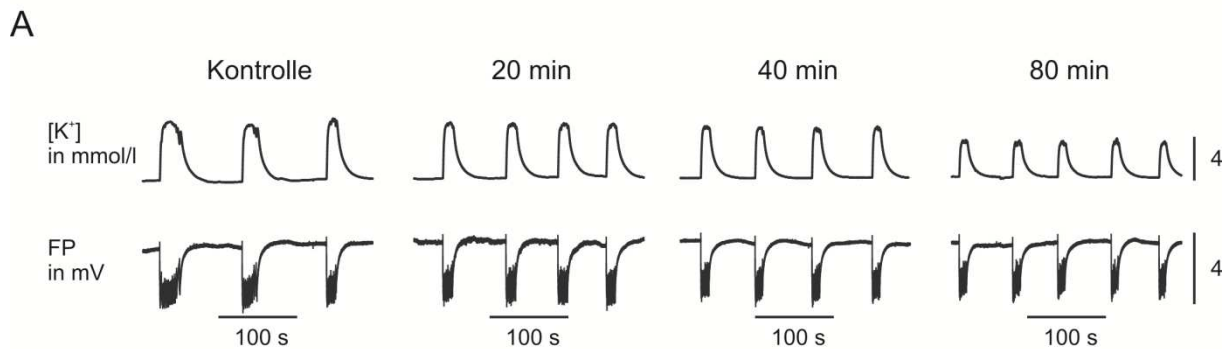
Zur Prüfung des Erhalts der Gewebektivität wurden am Beginn und Ende eines jeden Experimentes reiz-evozierte Feldpotentiale ausgelöst (Position der Reiz-Elektrode: weiße Substanz unterhalb der Zellschichten; Position der Mess-Elektrode: Lamina V-VI), oszillografisch gemessen und nur dann für die Datenanalyse akzeptiert, wenn der Endwert mindestens 75% des Anfangswertes betrug (Abb. 14). Darüber hinaus wurden die Reizantworten bei maximaler Stimulation (Reizstärke für 100% der Antwortamplitude) in 101 Gewebeschnitten von 45 Patienten am Anfang und Ende des Experimentes aufgezeichnet und offline ausgewertet. „Kurz-latente“ Feldpotentialkomponenten (N1: Latenzzeit  $1.9 \pm 0.07$  ms) unterlagen einer insignifikanten Amplituden-Reduktion ( $n = 78$ , Amplitude  $2.8 \pm 0.14$  mV am Beginn vs.  $2.6 \pm 0.15$  mV am Ende des Versuchs,  $p = 0.066$ , Wilcoxon-Test, exakte zweiseitige Signifikanz). „Lang-latente“ Feldpotentialkomponenten (N2: Latenzzeit  $4.2 \pm 0.17$  ms) zeigten eine Amplituden-Zunahme ( $n = 37$ ,  $1.5 \pm 0.12$  mV am Beginn vs.  $1.6 \pm 0.12$  mV am Ende des Versuches,  $p = 0.042$ ). Die entsprechenden Endwerte der Amplituden betrugen für kurz- und lang-latente Antworten  $94.6 \pm 4.15\%$  und  $137.9 \pm 17.53\%$  des Wertes am Beginn des Versuches.

*Zusammengefasst* war die Induktion epileptiformer Aktivität in 85% der Gewebeschnitte erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die induzierte epileptiforme Aktivität glutamaterg über AMPA-/Kainat-Rezeptoren vermittelt ist. Die Wahrscheinlichkeit der Induktion spike-artiger epileptiformer Aktivität (IIS) ist im Gewebe von Patienten mit klar beschreibbarer Kortexpathologie höher als im Gewebe von Patienten mit „unauffälliger“ Kortexpathologie. Die am Anfang und Ende der Experimente erhobenen Daten für evozierte Feldpotentiale lassen annehmen, dass die Gewebektivität bis zum Ende der Experimente erhalten bleibt.

### 3.2. Kontrolleexperimente: Zeitverlauf der induzierten Aktivität ohne weitere Substanzapplikation und bei Gabe von MDTI

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Hochkalium-Bicucullin-Modells und zur besseren Einschätzung der Effekte von AED und Koapplikation von AED + MDTI wurde in 15 Gewebeschnitten von sechs Patienten der Zeitverlauf der induzierten epileptiformen Aktivität (13 SLE, 2 IIS) ohne Pharmaka-Applikation betrachtet und ausgewertet. Der Aktivitätstypus blieb in allen Schnitten sowohl nach 20 Minuten, als auch nach 40 und 60-80 Minuten konstant (Abb. 15). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass Veränderungen des Aktivitätsmusters nach Applikation eines Pharmakons, als Effekt zu werten sind.

Zeitverlauf der induzierten Aktivität



**B**

Parameter	Kontrollwert	20 min	40 min	60-80 min
n/min	0.46 ± 0.12	0.47 ± 0.08	0.53 ± 0.12	0.70 ± 0.27
sfp (mV)	2.39 ± 0.63	2.29 ± 0.57	2.25 ± 0.59 *	2.19 ± 0.59*
peak (mV)	2.99 ± 0.63	2.85 ± 0.58	2.86 ± 0.64	2.82 ± 0.65
dauer (s)	43.95 ± 7.16	40.97 ± 6.51	39.84 ± 8.53	35.13 ± 7.23 <sup>** a bb</sup>
frequenz (Hz)	6.2 ± 1.31	5.63 ± 1.05	5.49 ± 1.04	5.72 ± 1.19
[K <sup>+</sup> ] <sub>min</sub> (mmol/l)	5.75 ± 0.27	6.29 ± 0.34	6.25 ± 0.32	6.27 ± 0.34
[K <sup>+</sup> ] <sub>max</sub> (mmol/l)	10.08 ± 0.63	10.49 ± 0.84	10.24 ± 0.83 <sup>a</sup>	9.65 ± 0.69 <sup>aa</sup>
Δ [K <sup>+</sup> ] (mmol/l)	4.33 ± 0.59	4.20 ± 0.62	3.99 ± 0.61 <sup>*aa</sup>	3.38 ± 0.47 <sup>*** aa bb</sup>

**Abb. 15 – Zeitverlauf der induzierten Aktivität. A:** Ablauf eines Experiments zur Evaluation des natürlichen Zeitgangs der induzierten epileptiformen Aktivität. *Kontrolle:* Muster nach Induktion und Stabilisierung der epileptiformen Aktivität; *20 min:* Muster nach 20 Minuten durchgehender epileptiformer Aktivität; *40 min:* Muster nach 40 Minuten Aktivität; *80 min:* Muster nach 60-80 Minuten Aktivität. **B:** Parameter der induzierten krampf-artigen Aktivität in kortikalen Gewebeschnitten (n = 13). Die Angaben repräsentieren die Mittelwerte und ihre Standardfehler, angegeben als MW ± SF. Der nichtparametrische Test nach Wilcoxon wurde durchgeführt um folgende Werte zu vergleichen: (\*) Vergleich mit Kontrollwert, <sup>(a)</sup> Vergleich mit dem Wert nach 20 Minuten, <sup>(b)</sup> Vergleich mit dem Wert nach 40 Minuten. Die Signifikanz-Markierungen stehen für: x = p≤0.05, xx = ≤0.01, xxx = p≤0.001.

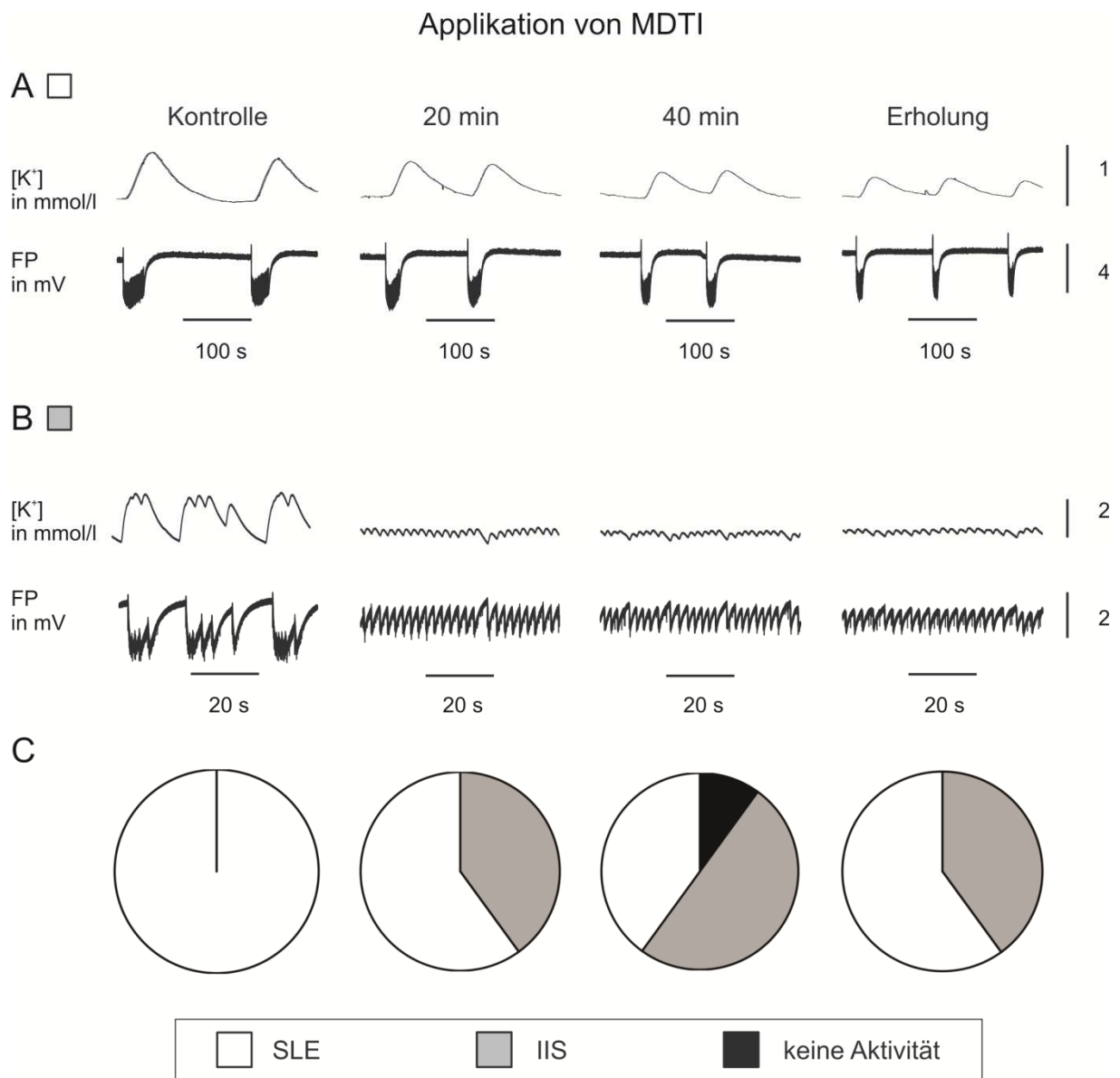
In den folgenden Experimenten (3.3. und 3.4.) zeigt sich auch unter Pharmaka-Applikation eine Persistenz des Aktivitätstypus. In diesen Fällen werden für persistierende SLE die einzelnen Aktivitätsparameter ausgewertet. Um auch hier den Vergleich mit Veränderungen von Aktivitätsparametern der SLE ohne Pharmaka-Applikation ziehen zu können, werden in Abb. 15B die Parameterwerte für die verschiedenen Zeitpunkte der Analyse (Kontrolle, 20, 40 und 60-80 Minuten) tabellarisch dargestellt. Folgende Parameter werden berücksichtigt: Ereignisse/Minuten, die sfp-Amplitude, die peak-Amplitude, die Ereignisdauer, die Frequenz der Entladungen innerhalb des Ereignisses, die minimale extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration ( $[K^+]_{\min}$ ), die maximale extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration ( $[K^+]_{\max}$ ) und der Anstieg der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration ( $\Delta[K^+]$ ).

Im Vergleich mit dem Kontrollwert sind nach 60-80 Minuten signifikante Verminderungen der Parameter (sfp-Amplitude, Ereignisdauer,  $[K^+]_{\max}$  und  $\Delta[K^+]$ ) nachweisbar. Diese Modulation der verbleibenden Aktivität muss bei der Bewertung der folgenden Experimente berücksichtigt werden (siehe: 3.5 Vergleich Kontrollversuche vs. Hauptversuche).

Um zu den Effekten in den folgenden Experimenten weitere Aussagen zu machen, musste auch geklärt werden, ob eine alleinige Applikation der MDTI VPM und PBN zu Veränderungen des Aktivitätstyps oder der verbleibenden Aktivitätsparameter führt (Abb. 16)

Die Effekte der MDTI VPN und PBN auf SLE wurden 20 und 40 Minuten nach Beginn der Applikation und nach Erholung (weitere 20-40 Minuten Auswaschen der MDTI) evaluiert (zehn Gewebeschnitte, sechs Patienten, Abb. 16C). Nach 20 Minuten MDTI-Perfusion zeigte sich in vier Gewebeschnitten (40%) eine Veränderung der epileptiformen Aktivität von SLE zu IIS und nach 40 Minuten in je einem Schnitt eine zusätzliche Suppression und eine weitere Veränderung von SLE zu IIS. Während der Erholungsphase waren die Veränderungen nur in zwei Experimenten reversibel. In 40% der Gewebeschnitte blieb das Aktivitätsmuster SLE erhalten.

Von einer statistischen Aufarbeitung der verbleibenden Aktivitätsparameter wurde aufgrund der kleinen Stichprobe resistenter SLE (n = 4) abgesehen.



**Abb. 16 – Applikation von MDTI.** Darstellung von Veränderungen der Aktivitätsmuster unter alleiniger Applikation beider MDTI (VPM + PBN): Kontrolle, nach 20 und 40 Minuten Applikation und nach Erholung (60-80 Minuten). **A-B:** Beispiele für die Konstanz (**A**) und die Veränderung (**B**) des Aktivitätsmusters. **C:** Quantitative Übersicht der Anteile verschiedener Aktivitätsmuster zu den in A angegebenen Zeitpunkten des Experimentes (n = 10).

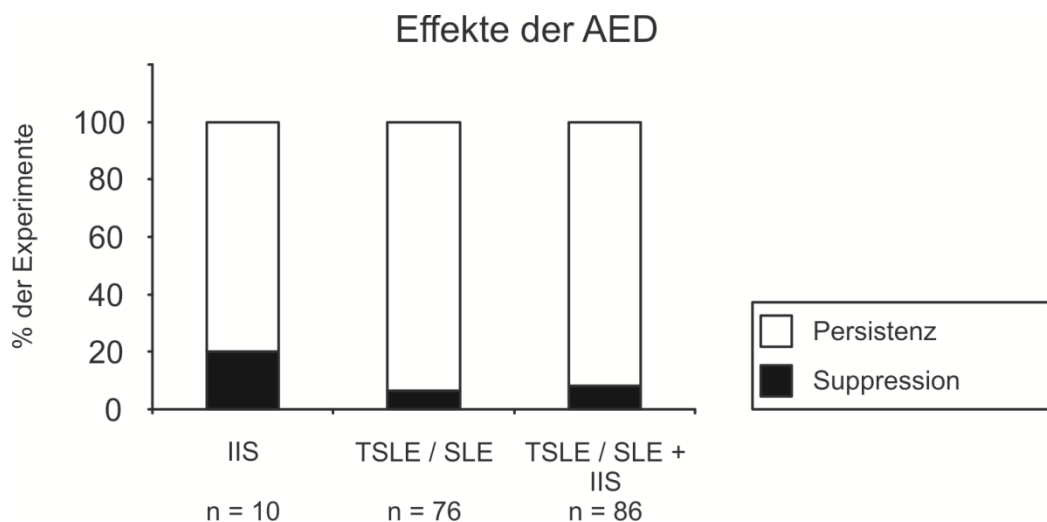
*Insgesamt* ergibt sich aus den Kontrollversuchen, dass der Typ induzierter Aktivität ohne weitere Substanz-Applikation bis zu 80 Minuten unverändert bleibt. Der Vergleich einzelner Aktivitätsparameter zeigt signifikante Trends zu moderater Reduktion von sfp-Amplitude,

Ereignisdauer,  $[K^+]_{\max}$  und  $\Delta[K^+]$  nach 60-80 Minuten Dauer des Experiments. Im Gegensatz dazu waren bei Gabe von MDTI nach 40 Minuten in 60% der Gewebeschnitte eine Änderung des Antwortmusters nachweisbar (10% reversible Suppression, 10% reversibler Übergang von SLE zu IIS, 40% irreversibler Übergang von SLE zu IIS). Im Vergleich zu den Experimenten ohne Substanzapplikation verursachte die Gabe von MDTI Musteränderungen der SLE, die zu einem beachtlichen Teil irreversibel waren (20 Minuten  $p = 0.024$ , 40 Minuten  $p = 0.002$ , 60-80 Minuten:  $p = 0.029$ , exakter Test nach Fischer). Beim Vergleich der verbleibenden Parameterwerte resistenter SLEs waren die Verkürzung der Ereignisdauer und die Reduktion des  $\Delta[K^+]$  unter MDTI (40 Minuten) signifikant stärker als in den Experimenten ohne Substanzapplikation ( $p = 0.032$ ,  $p = 0.023$ ,  $n = 13, 4$ , Mann-Whitney-Test). Hierbei ist zu beachten dass VPM neben der Wirkung als MDTI auch Kalziumkanäle blockieren kann und antikonvulsive Effekte von VPM und verwandten Substanzen bereits früher in anderen Präparaten berichtet wurden (Wiemann et al. 1996, Straub et al. 1996).

### **3.3. Hauptversuche I: Reagiert das untersuchte Kortexgewebe pharmakoresistent auf die Applikation der Antiepileptika?**

Bei Perfusion mit einem antikonvulsiv wirkenden Medikament in therapeutisch wirksamer Konzentration für mindestens 20 Minuten wird nur in 8.1% der 86 untersuchten Kortexgewebeschnitte von 31 Patienten eine vollständige Suppression der epileptiformen Aktivität erreicht. Das heißt, in über 90% der getesteten Schnitte ist noch epileptiforme Aktivität nachweisbar.

Die verschiedenen Aktivitätstypen (SLE und IIS) reagieren geringfügig unterschiedlich auf die Antikonvulsiva (Abb. 17). Gewebeschnitte, in denen initial IIS zu sehen war ( $n = 10$ ), zeigten zu 20% eine komplette Suppression, im Gegensatz zu nur 6.6% der Schnitte mit initialen SLE ( $n = 76$ ). Der Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant ( $p = 0.186$ , Chi-Quadrat-Test, exakte zweiseitige Signifikanz).



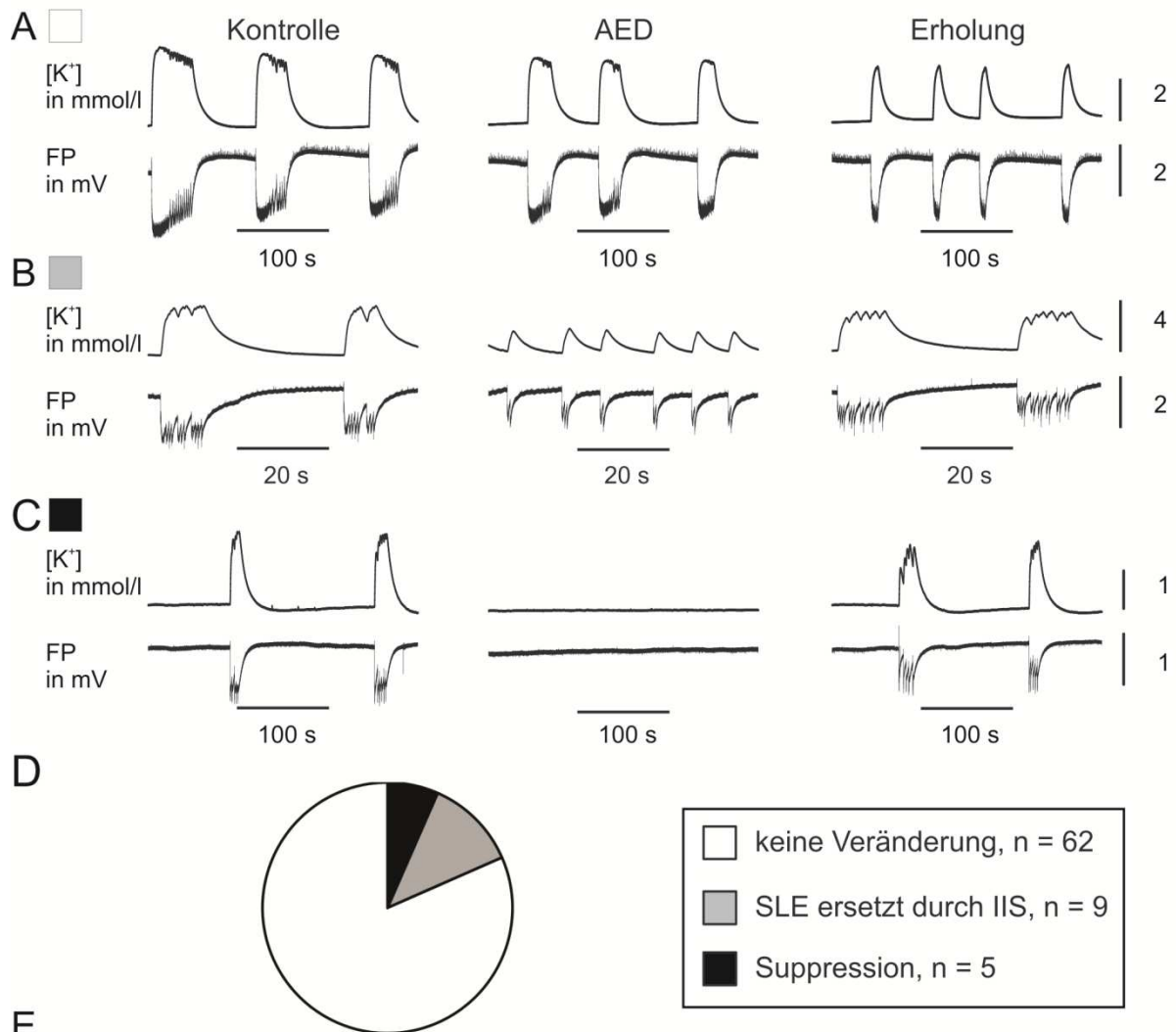
**Abb. 17 – Effekte der AED.** Sensitivität der Aktivitätstypen IIS und SLE auf die AED-Applikation. Initiales IIS ist unter AED-Applikation insignifikant häufiger supprimiert als initiales SLE (20 % vs. 6.6,  $p = 0.186$ , exakter Test nach Fisher).  $n$ : Anzahl der Gewebeschnitte.

In den Untersuchungen war auffällig, dass SLE unter AED-Perfusion zum Teil in IIS übergehen. In 81.6% der Gewebeschnitte persistierten SLE, in 11.8% veränderte sich der Aktivitätstypus zu IIS und nur in 6.6 kam es zur kompletten Aktivitätssuppression. Der Großteil der Schnitte mit SLE ist somit im Akutmodell pharmakoresistent.

Die resistente Aktivität (Beispiel Abb. 18A) wurde anhand der verbleibenden Aktivitätsparameter nach AED-Perfusion charakterisiert (Abb. 18E) und mit den entsprechenden Kontrollwerten vor Applikation der AED verglichen. Im Vergleich zu den Kontrollwerten kommt es zu signifikanten Unterschieden aller verbleibenden Parameterwerte nach AED-Applikation (Wilcoxon-Test). Die Ereignisrate (n/min) zeigt sich nach AED-Applikation signifikant erhöht. Die Ereignisamplituden (sfp und peak), die Ereignisdauer, sowie  $[K^+]_{max}$  und  $\Delta[K^+]$  waren signifikant vermindert.



## Effekte der AED: Veränderungen der Aktivität bei SLE



Parameter	n	Kontrollwert	AED-Applikation	verbleibende Parameter nach AED in %
n/min	62	0.73 ± 0.1	0.88 ± 0.13 *	107.23 ± 4.33
sfp (mV)	62	1.77 ± 0.11	1.62 ± 0.12 ***	91.41 ± 2.29
peak (mV)	62	2.35 ± 0.13	2.18 ± 0.14***	92.35 ± 2.08
dauer (s)	62	32.53 ± 2.35	27.83 ± 2.50**	87.06 ± 4.03
frequenz (Hz)	60	10.19 ± 1.59	8.68 ± 1.25**	92.49 ± 3.53
[K <sup>+</sup> ] <sub>min</sub> (mmol/l)	57	5.93 ± 0.16	6.25 ± 0.16***	105.84 ± 1.11
[K <sup>+</sup> ] <sub>max</sub> (mmol/l)	57	10.78 ± 0.40	10.16 ± 0.36***	95.21 ± 1.31
Δ[K <sup>+</sup> ] (mmol/l)	57	4.84 ± 0.34	3.91 ± 0.30***	84.32 ± 3.21

**Abb. 18 – Effekte der AED: Veränderungen der Aktivität bei SLE.** **A:** Abbildung eines Beispiels für die Resistenz des Aktivitätsmusters bei Applikation des AED PHT (50 μM). **B:** Beispiel für „SLE ersetzt durch IIS“ nach Applikation von CBZ (50 μM). **C:** Abbildung einer vollständigen Aktivitätssuppression nach

Applikation von CBZ (50  $\mu$ M) **D**: Quantitative Verteilung der Veränderungen des Aktivitätsmusters: Kategorisierung der Effekte in „keine Veränderung“, „SLE ersetzt durch IIS“ und „Suppression“. **E**: Parameter der epileptiformen Aktivität nach 20 Minuten AED-Applikation im Vergleich zum Kontrollwert und als Prozentangabe vom Kontrollwert. Die Angaben repräsentieren die Mittelwerte und ihre Standardfehler angegeben als MW  $\pm$  SF. Der Vergleich wurde anhand des nichtparametrischen Tests nach Wilcoxon durchgeführt. Die Signifikanz-Markierungen stehen als \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . *n*: Anzahl der Gewebeschnitte.

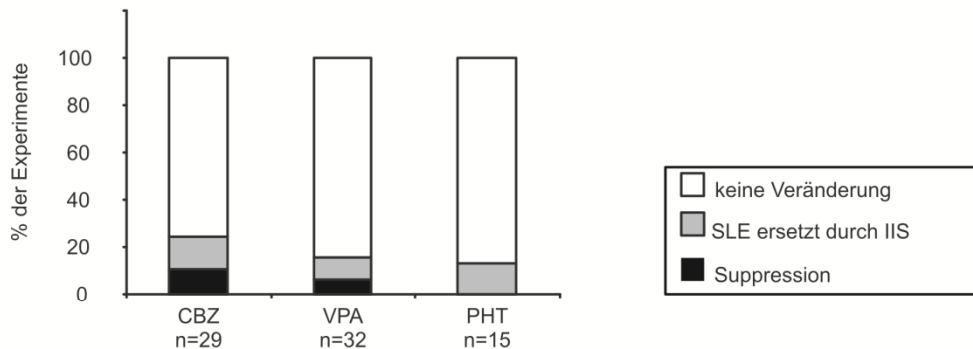
Es stellt sich noch die Frage ob eines der Antikonvulsiva CBZ, VPA oder PHT stärkere Effekte auf die epileptiforme Aktivität oder die einzelnen Aktivitätsparameter hat. Abb. 18A demonstriert, dass das Muster der induzierten Aktivität in den meisten Gewebeschnitten (CBZ: 75.9%,  $n = 29$  Gewebeschnitte; VPA: 84.4%,  $n = 32$ ; PHT: 86.7%,  $n = 15$ ) bestehen bleibt. Unter Applikation von CBZ kam es in 10.3% der Gewebeschnitte zur kompletten Suppression und in 13.8% zur Veränderung der SLE zu IIS. VPA bewirkte in 6.3% der Schnitte die komplette Suppression der Aktivität und in 9.4% eine Veränderung der SLE zu IIS. PHT führte in keinem der Experimente zur kompletten Aktivitätssuppression, 13.3% der Gewebeschnitte veränderten das Aktivitätsmuster SLE zu IIS. In der statistischen Analyse (Chi-Quadrat-Test) waren keine Unterschiede der Effekte von CBZ, VPA, und PHT auf SLE zu sichern.

In Gewebeschnitten mit resistenten SLE nach AED-Applikation wurden die verbleibenden Aktivitätsparameter für die verschiedenen Antikonvulsiva als unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Die statistische Analyse anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests ergab signifikante Unterschiede der sfp-Amplituden unter CBZ und VPA (CBZ: 98.6% und VPA: 87.2% des Kontrollwerts,  $n = 22, 27$ ,  $p = 0.005$ ). Weiterhin unterschieden sich die Wirkungen der drei Antikonvulsiva auf  $[K^+]_{\min}$  (CBZ: 108.2%, VPA: 107% und PHT 99.5% des jeweiligen Kontrollwerts; CBZ vs. PHT:  $n = 22, 13$ ,  $p = 0.002$ , VPA vs. PHT:  $n = 27, 13$ ,  $p = 0.019$ , exakte zweiseitige Signifikanz).

**Effekte von CBZ, VPA und PHT auf das Muster SLE und Modulationen der Aktivität resistenter SLE durch die einzelnen AED**

**A**

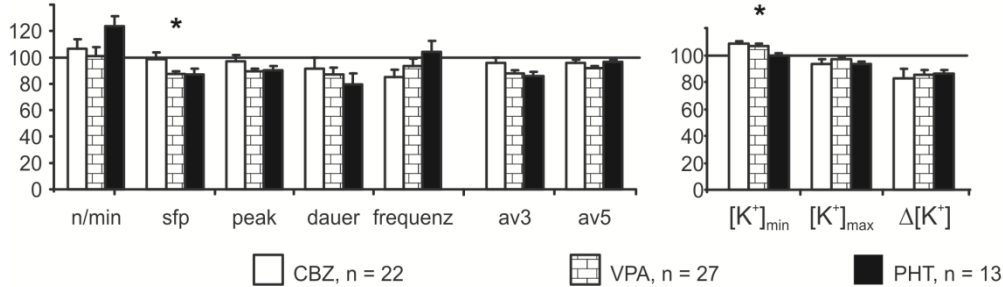
Veränderungen des Aktivitätsmusters



**B**

Modulationen der verbleibenden Aktivität

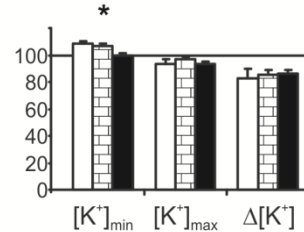
verbleibende Parameterwerte in % des Kontrollwerts



**C**

Modulationen der verbleibenden  $[K^+]$ -parameter

verbleibende Parameterwerte in % des Kontrollwerts



**Abb. 19 – Effekte von CBZ, VPA und PHT auf das Muster SLE und Modulationen der Aktivität resistenter SLE durch die einzelnen AED.** **A:** Quantitative Verteilungen der Veränderungen des Aktivitätsmusters SLE unter Applikation von CBZ, VPA oder PHT. **B:** Modulation der Aktivitätsparameter persistierender SLE durch CBZ, VPA und PHT. Alle Parameterwerte sind auf den jeweiligen Kontrollwert bezogen und in Prozent angegeben. Die Abkürzungen bedeuten: *n/min* – Ereignisse/Minute, *sfp* – Amplitude des „slow field potentials“, *peak* – peak-Amplitude, *dauer* – Ereignisdauer, *frequenz* – Frequenz der Entladungen innerhalb eines Ereignisses, *av3* – Durchschnitt der verbleibenden Parameterwerte (*sfp* + *peak* + *dauer*) / 3, *av5* – Durchschnitt der verbleibenden Parameterwerte (*n/min* + *sfp* + *peak* + *dauer* + *frequenz*) / 5. **C:** Modulation der  $[K^+]$ -Parameter persistierender SLE:  $[K^+]_{min}$  – minimale Kaliumionen-Konzentration,  $[K^+]_{max}$  – maximale Kaliumionen-Konzentration,  $\Delta[K^+]$  – Anstieg der Kaliumionen-Konzentration während des Ereignisses. Die Werte wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests (asymptotische Signifikanz) verglichen. Die Signifikanz-Markierungen stehen für: \* =  $p \leq 0.05$ . *n*: Anzahl der Gewebeschnitte.

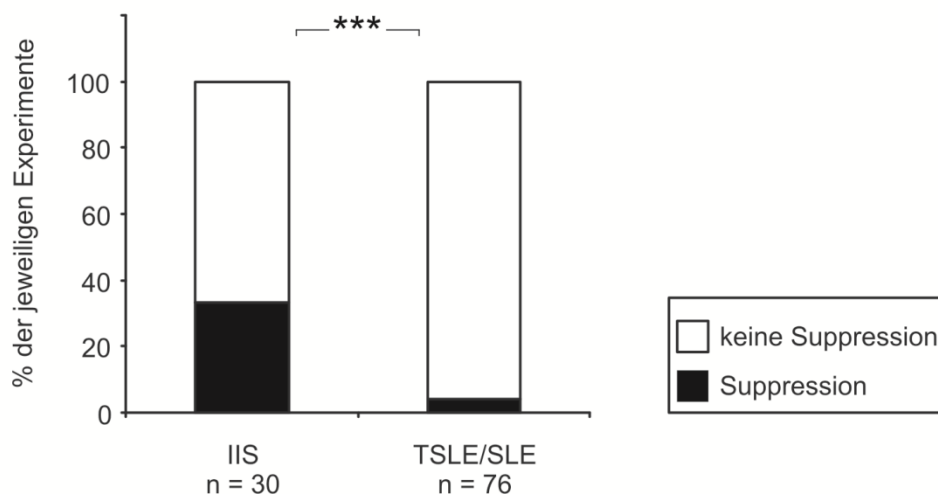
*Zusammengefasst* sind über 90% der getesteten Gewebeschnitte ( $n = 86$ ) pharmakoresistent. IIS sind zu 20%, SLE zu 6.6% supprimiert. In den 76 Experimenten, in denen SLE induziert wurden, kam es in 11.8% zu einer Veränderung des Aktivitätstyps. Für die resistenten SLEs (81.6% der getesteten Gewebeschnitte) ließen sich signifikante Veränderungen für alle Parameterwerte sichern. Zwischen den Effekten der Antikonvulsiva CBZ, VPA und PHT auf das

Aktivitätsmuster bestand keine Differenz und für die verbleibenden normierten Aktivitätsparameter resistenter SLE waren nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen: der VPA-Effekt auf die sfp-Amplitude war größer als der von CBZ,  $[K^+]_{\min}$  war sowohl für CBZ als auch VPA gegenüber PHT angestiegen.

### 3.4. Hauptversuche II: Kann die Koapplikation von AED und MDTI die AED-Effektivität erhöhen?

Insgesamt wurden in 106 Gewebeschnitten aus 39 Proben Effekte der Koapplikation mit einem der Antikonvulsiva und beiden MDTI (VPM und PBN) betrachtet. Es kam in 12.3% der untersuchten Gewebeschnitte zur kompletten Aktivitätssuppression. Abb. 19 lässt erkennen, dass die Aktivitätsmuster SLE und IIS verschieden auf die AED-MDTI-Koapplikation reagieren. Gewebeschnitte, die nach 20 Minuten Perfusion mit AED bzw. MDTI das Muster IIS zeigen, reagieren signifikant häufiger mit einer kompletten Suppression der epileptiformen Aktivität als jene, die SLE generierten (33% vs. 4 %,  $n = 30, 76$ ,  $p \leq 0.001$ , exakter Test nach Fisher). IIS ist somit sensibler für die Koapplikation von AED und MDTI als SLE.

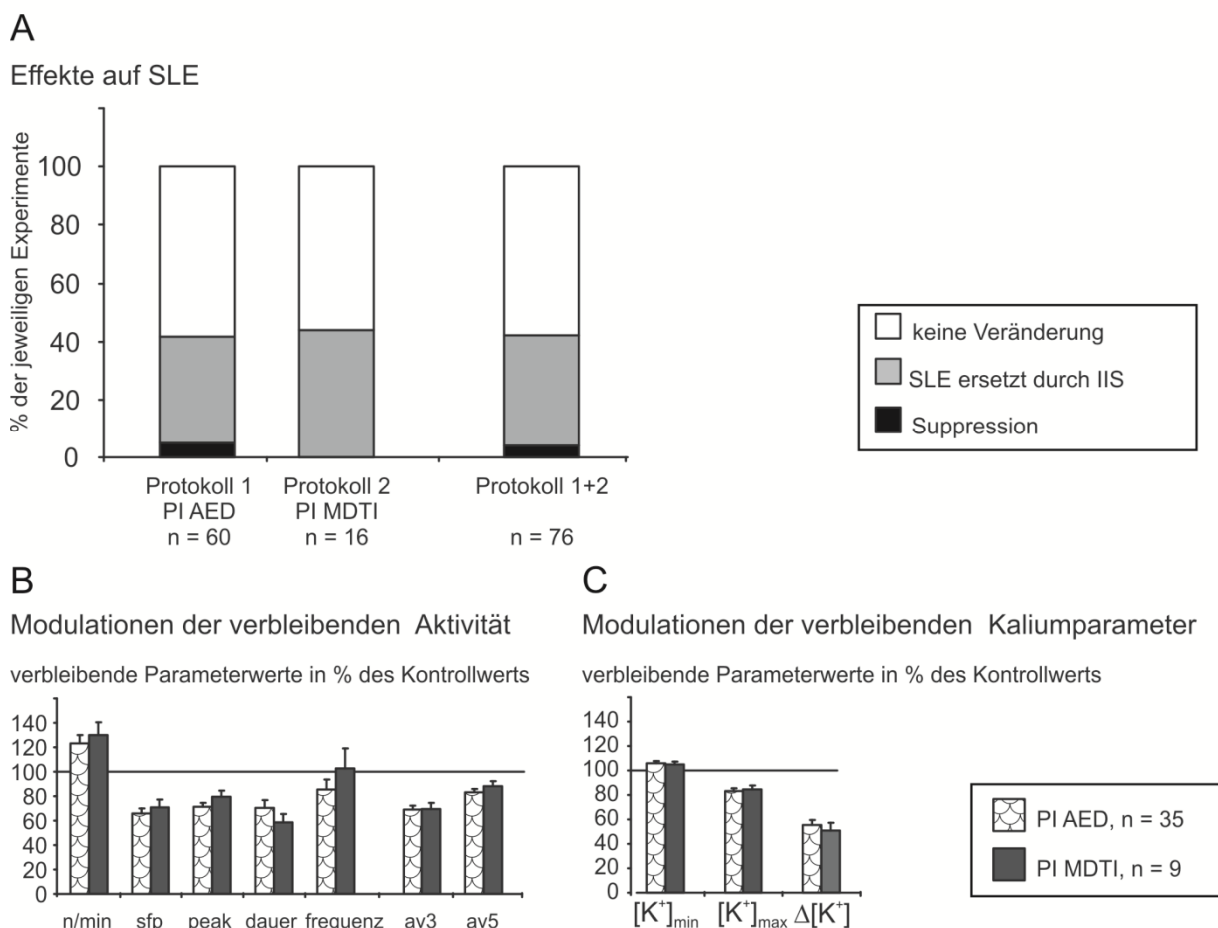
Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf die Aktivitätstypen



**Abb. 20 – Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf die Aktivitätstypen.** Signifikant unterschiedliche Sensitivität der Aktivitätsmuster SLE und IIS auf die Koapplikation von AED und MDTI ( $p \leq 0.001$ , exakter Test nach Fisher).  $n$ : Anzahl der Gewebeschnitte.

Um zu erfahren, ob die Dauer der MDTI-Applikation für die Effekte der Koapplikation von Bedeutung ist, wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt. In 86 Gewebeschnitten von 31 Patienten wurden zuerst ein AED und danach die MDTI appliziert – „Protokoll 1“ (PI AED: 20 Minuten Präinkubation mit einem AED, weitere 20 Minuten Koapplikation mit MDTI). In der Teilstichprobe „Protokoll 2“ wurden in 30 Gewebeschnitte von 13 Patienten erst die MDTI und danach ein AED appliziert (PI MDTI: 20 Minuten Präinkubation mit MDTI, weitere 20 Minuten Koapplikation mit einem AED). Abb. 21 weist aus, dass zwischen den Effekten der Koapplikation auf SLE in beiden Protokoll-Gruppen keine signifikanten Differenzen bestehen, weder hinsichtlich der Veränderungen des Aktivitätsmusters ( $p=0.640$ , exakter Test nach Fisher, Abb. 21A) noch im Hinblick auf die Modulationen der Aktivitätsparameter resistenter SLE (Abb. 21B, C).

Effekte und Modulationen durch die Koapplikation von AED und MDTI:  
Vergleich der Aktivität für Protokoll 1 und 2.



**Abb. 21 – Effekte und Modulationen durch die Koapplikation von AED und MDTI: Vergleich der Aktivität für Protokoll 1 und 2.** **A:** Veränderungen der Aktivitätsmuster für die Protokolle 1 und 2. **B:** Vergleiche der verbleibenden Aktivitätsparameter für persistierende SLE in Protokoll 1 und 2. **C:**

Vergleiche der verbleibenden Kaliumkonzentrationsparameter für persistierende SLE in Protokoll 1 und 2. **B-C** Zum statistischen Vergleich der unabhängigen Stichproben diente der Mann-Whitney-Test. *n*: Anzahl der Gewebeschnitte

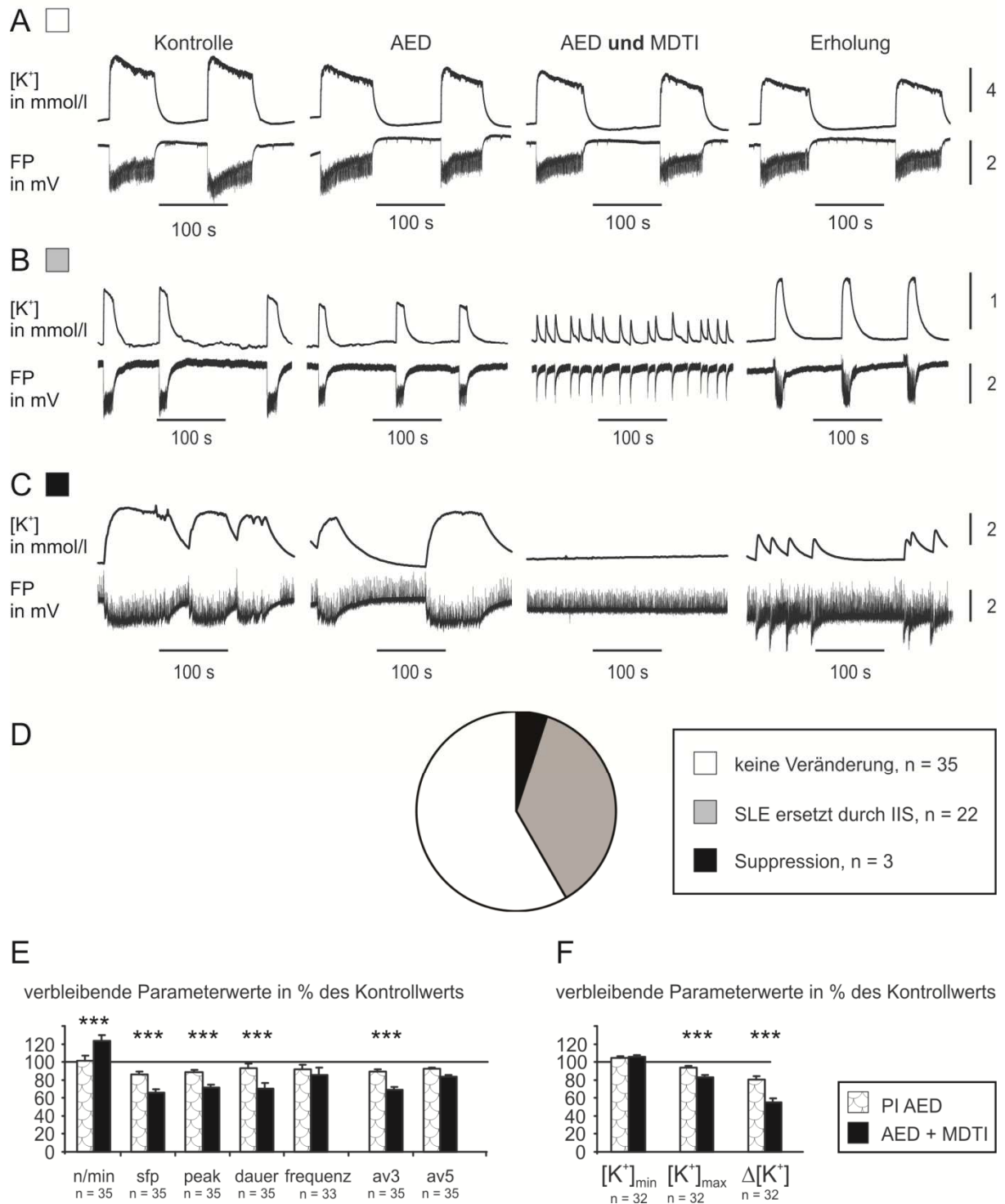
Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass 1.) eine längere Perfusion mit MDTI („Protokoll 2“) nicht zu einer stärkeren Wirksamkeit der Koapplikation von AED und MDTI führt und 2.) dass die mit beiden Protokollen erhaltenen Ergebnisse für die Einschätzung der Ergebnisse zur Koapplikation zusammengefasst werden können.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären ob die zusätzliche Applikation von MDTI zu einer besseren Effizienz der AED führt. Es konnte bis jetzt gezeigt werden, dass das Gewebe in den meisten Fällen des Auftretens von SLE resistent auf eine AED-Perfusion reagiert (keine Veränderung des Aktivitätsmusters 81.6% der Gewebeschnitte). In der folgenden Abb. 22 werden die Effekte der AED-MDTI-Koapplikation auf die AED-resistenten SLE beschrieben und mit den in Abb. 18 für AED abgebildeten Ergebnissen verglichen.

Nach Koapplikation sind AED-resistente SLE in 5% der Gewebeschnitte nicht mehr nachweisbar, zeigen in 36.7% eine Veränderung des Aktivitätsmusters zu IIS und in 58.3% keine Veränderung (also eine Resistenz der Aktivität).

An den resistenten Gewebeschnitten mit krampfartiger Aktivität bewirkt die Koapplikation eines AED und beider MDTI einen Anstieg der Ereignisrate, signifikant stärkere Reduktionen der Parameter sfp-Amplitude, peak-Amplitude, Ereignisdauer und der durchschnittlichen Parameterwerte av5, av3. Weiterhin zeigt sich eine im Vergleich zu den AED-Effekten stärkere Verminderung der  $[K^+]$ -Parameter Maximum und Anstieg.

## Koapplikation von AED und MDTI: Vergleich zwischen Effekten der Koapplikation und der AED auf SLE



**Abb. 22 – Koapplikation von AED und MDTI: Vergleich zwischen Effekten der Koapplikation und der AED auf SLE.** **A:** Persistenz von SLE (Kontrolle, 1 mM VPA, 1 mM VPA + MDTI, Erholungsphase). **B:** Veränderung des Aktivitätsmuster SLE zu IIS unter Koapplikation (Kontrolle, 50 μM CBZ, 50 μM CBZ + MDTI, Erholungsphase). **C:** Suppression von SLE unter Koapplikation (Kontrolle, 50 μM CBZ, 50 μM CBZ + MDTI, Erholungsphase). **D:** Verteilung der verschiedenen Koapplikations-Effekte auf AED-

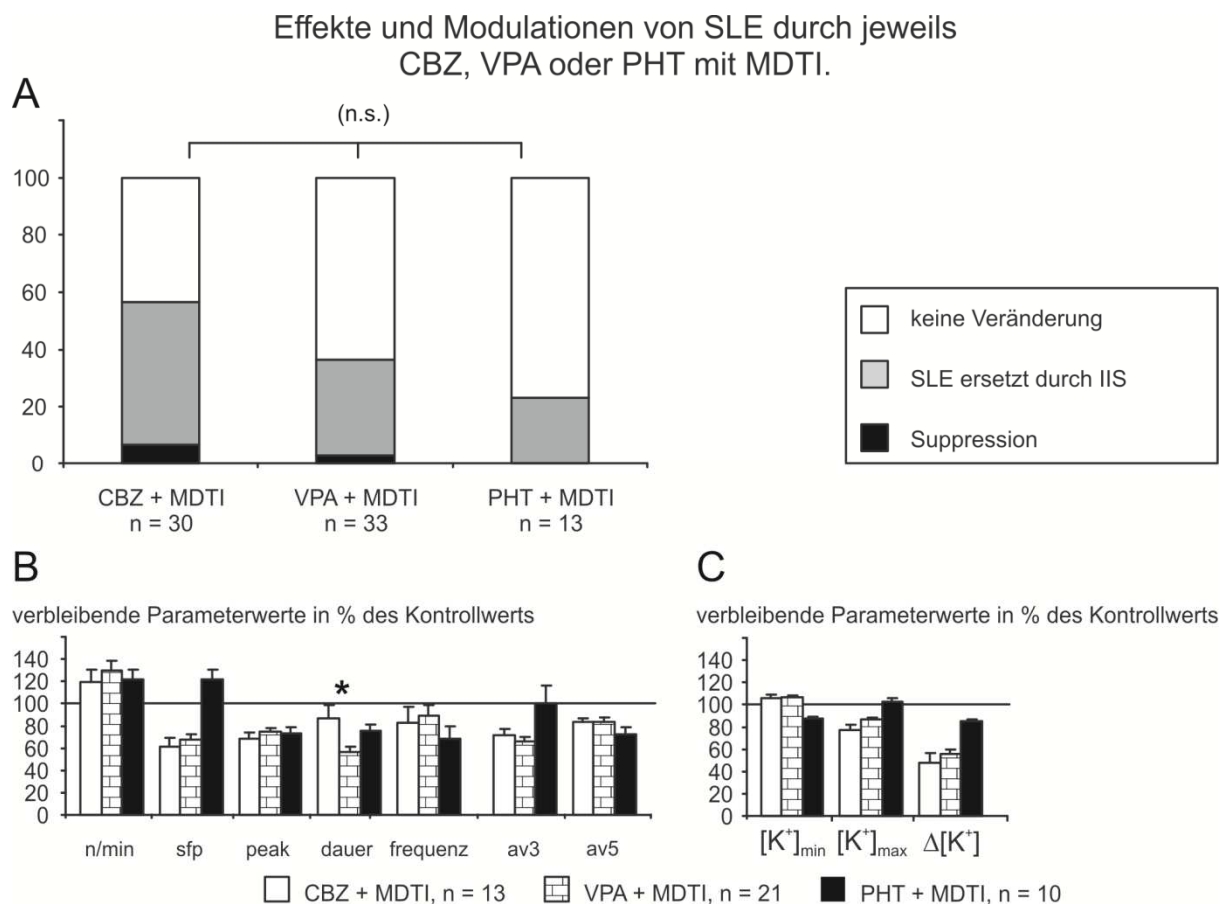
resistente SLE. **E:** Vergleich der verbleibenden Parameterwerte für die persistierenden SLE: AED allein vs. Koapplikation mit MDTI. **F:** Vergleich der verbleibenden  $[K^+]$ -Parameterwerte für die persistierenden SLE: AED allein vs. Koapplikation mit MDTI. **E-F** Für den statistischen Vergleich wurde der Wilcoxon-Test (zweiseitig, exakte Signifikanz) verwendet. Signifikanzmarkierungen: \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . *n*: Anzahl der Gewebeschnitte.

In der Diskussion um die Bedeutung von Multidrug-Transportern für die Pharmakoresistenz bei Epilepsie stellt sich unter anderem auch die Frage, welche Antikonvulsiva Substrate der aktiven Transportproteine sind. Eine aktuelle Studie beschreibt PHT als Substrat des humanen Pgp, während CBZ in den an Pgp exprimierenden Zellschichten durchgeführten Experimenten nicht von Pgp transportiert werden soll (Luna-Tortós et al. 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bieten die Möglichkeit, auf funktionaler Ebene einen Beitrag zur kontroversen Diskussion um die Substratspezifität der MDTI zu leisten. Es muss geprüft werden, ob sich die Wirkungen der Koapplikation für die jeweiligen AED unterscheiden. Die oben genannte Studie lässt vermuten, dass PHT bei Blockierung der Transportproteine öfter zu einer kompletten Aktivitätssuppression führt als CBZ oder VPA. Im Folgenden werden die Effekte der Koapplikation mit den MDTI für die AED CBZ, VPA und PHT einzeln beschrieben und miteinander verglichen (siehe Abb. 23). Da es sich bei den Ergebnissen der Koapplikation in beiden Protokollen um statistisch homogene Teil-Stichproben handelt, werden die Ergebnisse aus der Gesamt-Stichprobe ermittelt.

Bei Koapplikation von CBZ und MDTI wurde eine komplette Suppression der Aktivität in 6.7% von 30 Gewebeschnitten erreicht, unter VPA und MDTI in 3.0% von 33 und unter PHT und MDTI in 0% von 13. Eine Veränderung der Aktivität von SLE zu IIS war unter CBZ und MDTI in 50% der getesteten Gewebeschnitte zu beobachten, unter VPA und MDTI in 33.3 % und unter PHT und MDTI in 23.1%. Die entsprechenden Anteile resistenter Gewebeschnitte betragen unter CBZ und MDTI 43.3%, unter VPA und MDTI 63.6% und unter PHT und MDTI 76.9%. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher:  $p = 0.269$ ).

Betrachtet man die verbleibenden Aktivitätsparameter für die persistierenden SLE, so zeigt sich für VPA kombiniert mit den MDTI eine signifikant stärkere Reduktion der Dauer des epileptiformen Ereignisses als mit CBZ und MDTI (56.5% vs. 86.5%,  $n = 21, 13$ ,  $p = 0.032$ , Mann-Whitney-Test, exakte zweiseitige Signifikanz).





**Abb. 23 – Effekte und Modulationen von SLE durch jeweils CBZ, VPA oder PHT und MDTI.** **A:** Veränderungen des Aktivitätsmusters SLE nach Applikation jeweils eines der AED mit den MDTI. Die Unterschiede werden statistisch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher,  $p = 0.269$ ). **B:** Vergleich der verbleibenden Werte der Aktivitätsparameter nach Koapplikation für jeweils CBZ, VPA und PHT bezogen auf den 100 % messenden Kontrollwert zu Versuchsbeginn. **C:** Vergleich der verbleibenden Werte der  $[K^+]$ -Parameter für jeweils CBZ, VPA und PHT bezogen auf den Kontrollwert zu Versuchsbeginn (= 100 %). **B-C** Die statistischen Vergleiche zwischen jeweils zwei Stichproben erfolgten nach dem Mann-Whitney-Test (zweiseitig, exakte Signifikanz). Signifikanzmarkierung: \* =  $p \leq 0.05$  für den Vergleich Koapplikation mit CBZ vs. Koapplikation mit VPA.  $n$ : Anzahl der Gewebeschnitte.

Es lässt sich feststellen, dass zwischen den Wirkungen von CBZ + MDTI, VPA + MDTI und PHT + MDTI keine deutlichen Unterschiede bestehen. PHT, das in der aktuellen Literatur als Substrat der MDTI beschrieben wurde, bewirkt in den hier durchgeführten Experimenten mit MDTI die geringsten Veränderungen.

*Zusammengefasst* kam es nur in 12.3% der untersuchten Gewebeschnitte zur kompletten Aktivitätssuppression. Da Gewebeschnitte, die am Ende der Präinkubationsphase IIS zeigten, nach Koapplikation von AED und MDTI signifikant häufiger mit einer kompletten Suppression

der epileptiformen Aktivität reagierten, scheint die interiktal-artige Aktivität sensitiver für die Koapplikation von AED und MDTI zu sein als SLE.

Hinsichtlich der Veränderungen des Antwortmusters SLE (Suppression, Übergang von SLE in IIS, Konstanz) zeigten sich bei insgesamt länger dauernder Applikation der MDTI in Protokoll 2 im statistischen Vergleich zu Protokoll 1 keine signifikanten Differenzen (P1 5%, 36.7%, 58.3% vs. P2 0%, 43.8% und 56.3%,  $p = 0.640$ , exakter Test nach Fisher). Dies gilt auch für die Modulationen der Parameter resistenter SLE (Mann-Whitney-Test, exakte zweiseitige Signifikanz).

Im Hinblick auf die Frage ob durch eine Koapplikation mit MDTI die Wirkung der AED verstärkt bzw. die Resistenz aufgehoben werden kann, zeigen unter AED resistente SLE nur in 5% der Gewebeschnitte eine Suppression der Aktivität, in 36.7% eine Veränderung des Aktivitätsmusters von SLE zu IIS und in 58.3% der Gewebeschnitte keine Veränderung (also eine Resistenz der Aktivität). In der resistenten Aktivität provoziert die Koapplikation von AED und MDTI eine signifikant größere Zunahme der Ereignisrate und eine signifikant stärkere Reduktion der Parameter sfp-Amplitude, peak-Amplitude und Ereignisdauer. Weiterhin zeigt sich eine stärkere Verminderung von  $[K^+]_{\max}$  und  $\Delta[K^+]$  (alle Vergleiche  $p < 0.001$ , Wilcoxon Test, exakte zweiseitige Signifikanz).

Zwischen den elektrophysiologisch erfassbaren Wirkungen der Koapplikation von CBZ + MDTI, VPA + MDTI und PHT + MDTI lässt sich bei resistenten SLE eine stärkere Verkürzung der Ereignisdauer für VPA + MDTI im Vergleich zu CBZ + MDTI statistisch sichern, ansonsten bestehen kaum Differenzen. Auch die sichtbaren Unterschiede im Hinblick auf den zahlenmäßig größeren Anteil resistenter SLE, den geringeren Anteil an Musteränderungen zu IIS und Suppressionen bei Koapplikation von PHT und MDTI sind statistisch ohne Relevanz. Das heißt, dass in vitro im humanen Temporalen Kortex zwischen CBZ, VPA und PHT keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Substrat-Eigenschaften für PGP und MRP auffällig werden.

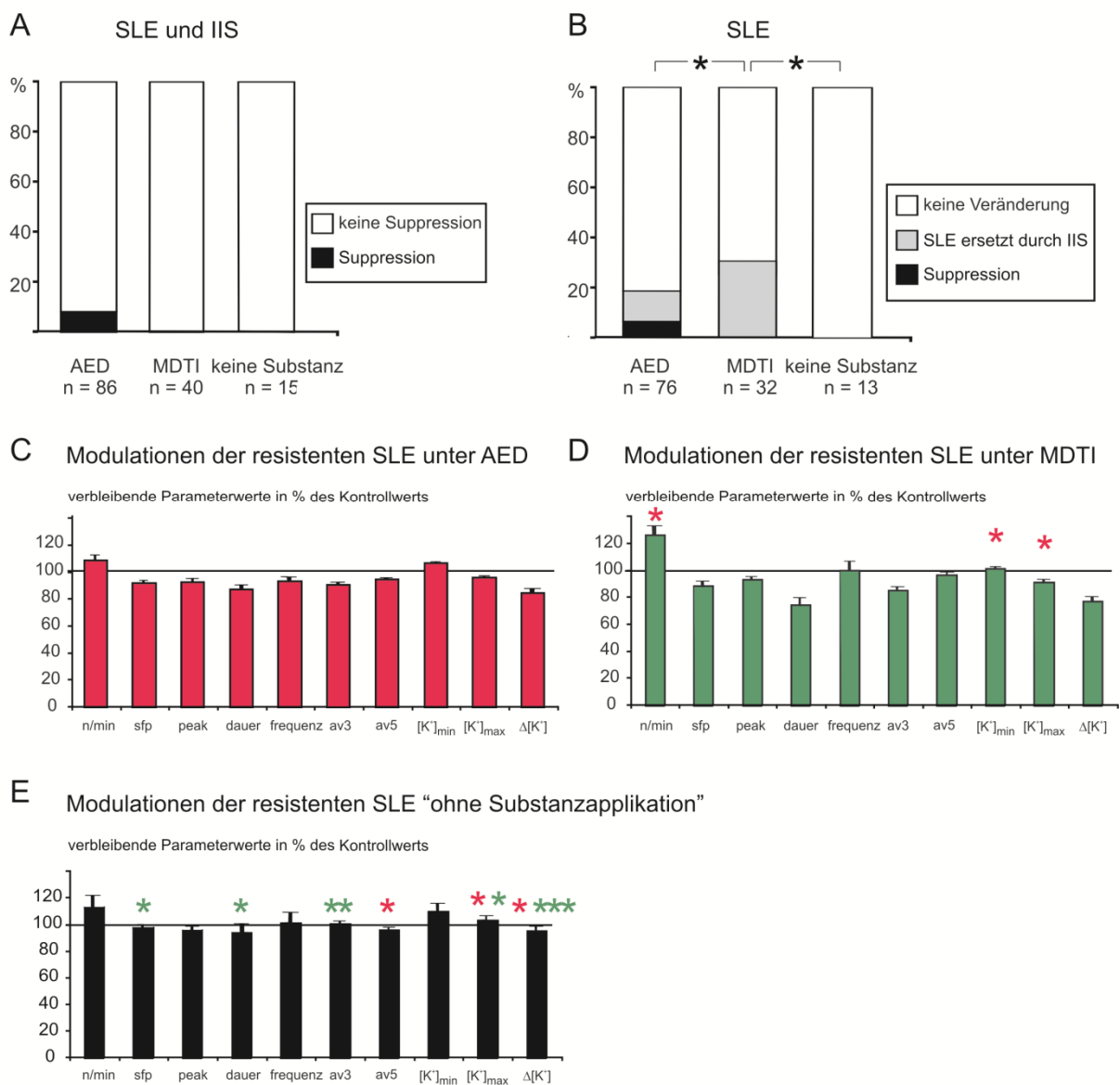
### **3.5. Vergleich: Kontrollversuche – Hauptversuche**

Um die für AED, MDTI und deren Koapplikation beschriebenen Aktivitätsveränderungen besser einschätzen zu können, werden hier die bereits in den Kapiteln 3.3. und 3.4. im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten ermittelten Effekte mit jenen verglichen, die im zeitlichen Verlauf der unter 3.2 dargestellten Kontrolluntersuchungen

aufgetreten sind. Dabei wird versucht, die Frage zu beantworten, ob sich die durch Gabe der Pharmaka hervorgerufenen Aktivitätsveränderungen von „Zeit“-abhängigen Veränderungen ohne Substanzapplikation unterscheiden (Abb. 24).

Zuerst sollen die in den Teilstichproben AED (86 Gewebeschnitte von 31 Patienten), MDTI (40 Schnitte von 19 Patienten) und „keine Substanz“ (15 Schnitte von sechs Patienten) nach 20 Minuten verglichen werden (Abb. 24). Es fällt hier auf, dass nur die AED in den untersuchten Stichproben zu einer Suppression führen (8.1% Abb. 24A). Dies wird jedoch statistisch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher: AED vs. MDTI  $p = 0.096$ ; AED vs. keine Substanz  $p = 0.590$ ).

Vergleich der Protokolle 1 vs. 2 vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 20 min)



**Abb. 24 – Vergleich der Effekte in den Protokollgruppen AED vs. MDTI vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 20 min).** **A:** Suppression der Aktivität unter AED, MDTI und ohne Substanzapplikation. **B:** Aktivitätsveränderungen bei SLE. **C:** Modulationen der resistenten SLE unter AED. **D:** Modulationen der resistenten SLE unter MDTI. **E:** Modulationen der resistenten SLE „ohne Substanzapplikation“. In **A-B** wurden für die statistischen Vergleiche zwischen den Teilstichproben der exakte Test nach Fischer verwendet, in **C-E** der Mann-Whitney-Test (zweiseitig, exakte Signifikanz). Die Signifikanzmarkierungen bedeuten: \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . Die Farbe der Markierungen ist rot für den Vergleich AED vs. MDTI in **D**, ebenfalls rot für den Vergleich AED vs. „keine Substanz“ in **E** und grün für den Vergleich MDTI vs. „keine Substanz“ in **E**. *n*: Anzahl der Gewebeschnitte.

Werden nur die induzierten SLE analysiert ( $n = 76, 32, 13$  Gewebeschnitte, Abb. 24B), bestehen signifikante Unterschiede zwischen AED und MDTI ( $p = 0.027$ , exakter Test nach Fisher) und zwischen MDTI und „keine Substanz“ ( $p = 0.042$ ), aber keine Unterschiede zwischen AED und „keine Substanz“ ( $p = 0.352$ ).

Beim Vergleich der verbleibenden Aktivitätsparameter resistenter SLE (Mann-Whitney-Test) gibt es ebenfalls signifikante Differenzen zwischen AED und MDTI ( $n = 62, 22$  Gewebeschnitte, rote Markierungen über den grünen Säulen in Abb. 24D). Die Ereignisrate war für AED im Vergleich zu MDTI weniger stark erhöht (107.6% vs. 126.3% des jeweiligen Kontrollwerts,  $p = 0.023$ ),  $[K^+]_{\min}$  war stärker erhöht (105.4% vs. 101.3%,  $p = 0.03$ ) und  $[K^+]_{\max}$  weniger stark verringert (94.7% vs. 91.3%,  $p = 0.03$ ).

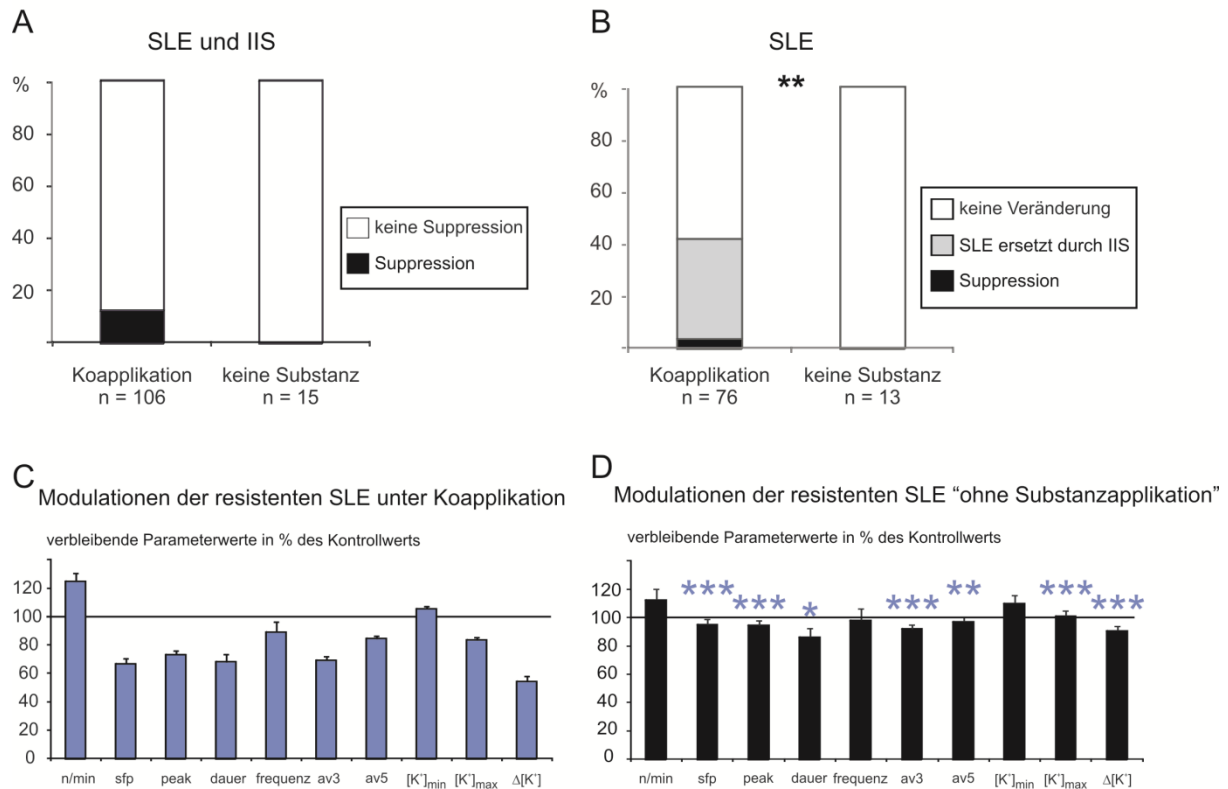
Im Vergleich zwischen den Gruppen AED und „keine Substanz“ ( $n = 62, 13$  Gewebeschnitte, rote Markierungen in Abb. 24E) ist der verbleibende Wert für den Parameterdurchschnitt „av5“ unter AED signifikant kleiner als in der Gruppe „ohne Substanzapplikation“ (93.7 % vs. 100.2 %,  $p = 0.043$ , Mann-Whitney-Test),  $[K^+]_{\max}$  kleiner (94.7% vs. 103.2%,  $p = 0.04$ ) ebenso wie  $\Delta[K^+]$  (83.8% vs. 95.4%,  $p = 0.02$ ).

Zwischen den Gruppen MDTI und „keine Substanz“ ( $n = 22, 13$  Gewebeschnitte) waren einige verbleibende Parameterwerte unter MDTI stärker reduziert als in der Gruppe „keine Substanz“ (grüne Markierungen in Abb. 23E): die sfp-Amplitude (88.6% vs. 97.7%,  $p = 0.022$ ), die Ereignisdauer (74.2% vs. 93.9%,  $p = 0.019$ ), der durchschnittliche Parameterwert av3 (85.3% vs. 95.6%,  $p = 0.005$ ),  $[K^+]_{\max}$  (91.3% vs. 103.2%,  $p = 0.002$ ) und  $\Delta [K^+]$  (76.7% vs. 95.4%,  $p = 0.001$ ).

Zum Vergleich von **Koapplikation** und Kontrollexperimenten ohne Substanzapplikation (analog dem Zeitpunkt der Koapplikation: nach 40 Minuten Versuchsdauer, Abb. 25) können insgesamt 121 Gewebeschnitte von 44 Patienten herangezogen werden (Koapplikation: 106 Gewebeschnitte von 39 Patienten, keine Substanz: 15 Gewebeschnitte von sechs Patienten).

In den Messungen mit Koapplikation von AED und MDTI zeigen 12.3% der Gewebeschnitte eine vollständige Suppression der Aktivität während in den Messungen ohne Substanzapplikation keine Suppression auftritt (Abb. 25A,  $p = 0.366$ , exakter Test nach Fisher).

Vergleich der Koapplikation mit AED und MDTi vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 40 min).



**Abb. 25 – Vergleich der Koapplikation mit AED und MDTi vs. „ohne Substanzapplikation“ zu äquivalenten Zeitpunkten im Versuchsablauf (nach 40 min).** **A:** Suppression der Aktivität unter Koapplikation und Persistenz ohne Substanzapplikation. **B:** Aktivitätsveränderungen bei SLE. **C:** Modulationen der resistenten SLE unter Koapplikation. **D:** Modulationen der resistenten SLE ohne Substanzapplikation. In **A-B** wurde für die statistischen Vergleiche zwischen den Teilstichproben der exakte Test nach Fisher verwendet, in **C-D** der Mann-Whitney-Test (zweiseitig, exakte Signifikanz). Die Signifikanzmarkierungen bedeuten: \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . Die Farbe der Markierungen ist blau für den Vergleich Koapplikation vs. „keine Substanz“ in D. *n*: Anzahl der Gewebeschnitte

Für SLE ( $n = 76$  Gewebeschnitte, 3.9% Suppression, 38.2% Aktivitätsänderung zu IIS, 57.9% ohne Veränderung) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ( $n = 13$ , 100% der SLE stabil, Abb. 25B,  $p = 0.009$ , exakter Test nach Fisher).

Die nach Koapplikation persistierenden SLE ( $n = 32$ , 13 Gewebeschnitte) zeigen im Vergleich mit den Kontrollversuchen ohne Substanzapplikation (Abb. 25C,D) stärkere Reduktionen der Ereignisamplituden, der Ereignisdauer und von  $\Delta [K^+]$  (sfp: 70% vs. 95%,  $p \leq 0.001$ ; peak:

73.1% vs. 94.5%,  $p \leq 0.001$ ; Dauer: 68.1% vs. 86.3%,  $p = 0.044$ ; av3: 69.4% vs. 92%,  $p \leq 0.001$ ; av5: 84.4% vs. 97.3%,  $p = 0.003$ ;  $[K^+]_{\max}$ : 83.4% vs. 101.3%,  $p \leq 0.001$ ;  $\Delta[K^+]$ : 54.5% vs. 90.9%,  $p \leq 0.001$ ).

Im Kontext zu den beschriebenen Effekten der Pharmaka und ihren Unterschieden zu Zeit-abhängigen Veränderungen in der Kontrollgruppe ist auch von Interesse, ob die Effekte nach dem Auswaschen der Medikamente in der Erholungsphase reversibel sind (nicht abgebildet). Die Aktivität in der Erholungsphase wird mit der induzierten Aktivität verglichen und wie folgt kategorisiert: (1) Das induzierte Muster der Aktivität ist stabil; (2) eine aufgetretene Veränderung des Musters (Suppression, Veränderung zu IIS) ist reversibel, oder (3) die aufgetretene Veränderung ist teilweise (nach Suppression von SLE entwickelt sich IIS) bzw. komplett irreversibel. Die Anteile dieser Kategorien für initial induzierte SLE betragen in den zwei Teilstichproben der Koapplikation Präinkubation mit AED (PI AED: 48%, 27% und 25% ( $n = 68$  Gewebeschnitte) bzw. Prä-Inkubation mit MDTI (PI MDTI) 38%, 24%, und 38% ( $n = 21$  Gewebeschnitte) und in der Kontrollgruppe 100%, 0%, und 0% ( $n = 13$  Gewebeschnitte); (PI AED vs. Kontrollgruppe:  $p = 0.002$ ; PI MDTI vs. Kontrollgruppe:  $p = 0.002$ ; PI AED vs. PI MDTI  $p = 0.559$ ; exakter Test nach Fisher). Das heißt, nach Auswaschen von AED und MDTI gibt es in den Teilstichproben der Koapplikation signifikant größere Anteile reversibler und irreversibler Veränderungen des Musters SLE als in der Kontrollgruppe.

Die entsprechenden Vergleiche der verbleibenden Parameterwerte resistenter bzw. erholter SLE ergeben signifikante Unterschiede für die Amplituden der SLE (PI AED vs. Kontrollgruppe: sfp  $70.9 \pm 3.01\%$  vs.  $89.5 \pm 4.76\%$ ,  $n = 49, 13$ ,  $p = 0.01$ : peak  $75 \pm 2.36\%$  vs.  $89 \pm 4.70\%$ ,  $p = 0.014$ ) oder nur für die sfp-Amplitude und den Anstieg der Kaliumionen-Konzentration (PI MDTI vs. Kontrollgruppe: sfp  $62.6 \pm 6.42\%$  vs.  $89.5 \pm 4.76\%$ ,  $n = 11, 13$ ,  $p = 0.003$ ;  $\Delta[K^+]$   $52.7 \pm 6.26\%$  vs.  $79.6 \pm 4.63\%$ ,  $n = 9, 13$ ,  $p = 0.003$ ), aber keine Unterschiede zwischen den Gruppen PI AED und PI MDTI.

Im Gegensatz zur Erholungsphase sind im Hinblick auf die am Ende des Experimentes verbleibenden Feldpotential-Amplituden (in Prozent des Wertes am Start des Experimentes) keine Differenzen zwischen den genannten Gruppen nachweisbar (z.B. kurz-latente Potentiale: PI AED  $97 \pm 8.1\%$ , PI MDTI  $95 \pm 5.3\%$ , Kontrollgruppe  $93 \pm 8.4\%$ ,  $n = 31, 24, 15$ ).

*Die in diesem Kapitel dargestellten Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen:*

Der Anteil der Gewebeschnitte, deren Aktivität durch AED oder Koapplikation von AED und MDTI supprimiert wird (8.1%, 12.3%), ist jeweils zu klein, um im Vergleich zur Kontrollgruppe (0%) das Niveau statistischer Signifikanz zu erreichen.

Die Häufigkeit von Musteränderungen der SLE ist in der MDTI-Gruppe bzw. in der Koapplikations-Gruppe jeweils größer als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht in der AED-Gruppe.

Hinsichtlich der verbleibenden Parameterwerte resistenter SLE sind im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen signifikante Unterschiede nachzuweisen: Unter AED sind die Parameter  $av_5$ ,  $[K^+]_{max}$  und  $\Delta[K^+]$  deutlicher vermindert, unter MDTI die Parameter  $sfp$ ,  $peak$ ,  $Dauer$ ,  $av_3$ ,  $[K^+]_{max}$ ,  $\Delta[K^+]$  und unter Koapplikation alle Parameter mit Ausnahme der Ereignisrate und der Frequenz.

In der Erholungsphase zeigen SLE in den Gruppen PI AED und PI MDTI mehr reversible und irreversible Musteränderungen als in der Kontrollgruppe, sowie stärkere Verminderungen der Amplituden resistenter SLE (PI AED) bzw. der  $sfp$ -Amplitude und  $\Delta[K^+]$  (PI MDTI).

Nach Perfusion mit normaler ACSF (3 mM Kalium, kein Bicucullin) am Ende des Experiments sind die reiz-evozierten Feldpotentiale in allen drei Gruppen ohne Unterschied gut erhalten.

### **3.6. Gibt es Zusammenhänge zwischen Patientendaten und in vitro erfassbaren Wirkungen von Antikonvulsiva (AED) und Transport-Inhibitoren (MDTI)?**

Für pharmakoresistente Patienten, deren Gewebeproben elektrophysiologisch untersucht worden sind, liegen folgende Daten vor: Indikation zur Operation, Geschlecht, Alter, Dauer der Erkrankung, Beginn der Erkrankung, verschiedene Charakteristika der Erkrankung (Art und Anzahl der Anfälle/Monat, Anzahl der sekundär generalisierten Anfälle/Jahr), Pharmakotherapie, normierte Serum- bzw. Gewebe-Konzentrationen der AED zum Zeitpunkt der Operation (soweit verfügbar), Ort der Gewebe-Resektion und Pathologie des resezierten Gewebes (Tabelle 3).

Nr.	w/m	Alter	Dauer	Beginn	Seite	Ind.	Kortex	Path.	Aura/	Anf./	SGS/
									M	M	a
1	w	27	21	6	L	NCHI	path.	TM	k.A.	k.A.	k.A.
2	m	34	17	17	R	MTLE	unauf.	HS	5	5	0.01
3	m	42	38	4	L	MTLE	unauf.	HS	6	30	0.01
4	w	49	22	27	L	MTLE	unauf.	HS	k.A.	5	k.A.
5	w	48	44	4	L	MTLE	unauf.	HS	4	8	k.A.
6	w	58	45	13	R	MTLE	unauf.	nHS	k.A.	2	0.1
7	w	44	42	2	L	MTLE	unauf.	HS	11	7	0.01
8	m	40	37	3	R	MTLE	unauf.	HS	4	4	k.A.
9	w	60	33	27	L	MTLE	unauf.	nHS	0	2	k.A.
10	w	37	10	27	R	MTLE	unauf.	nHS	1.5	1.5	15
11	w	51	11	40	R	MTLE	unauf.	nHS	0	4.5	12
12	m	58	23	35	R	MTLE	unauf.	HS	4	4	0.1
13	w	48	18	30	R	MTLE	unauf.	HS	2	2	12
14	w	55	25	30	R	NCHI	path.	DP	10	10	0.1
15	m	15	6	9	L	MTLE	unauf.	HS	4	8	0.1
16	w	39	18	21	L	MTLE	unauf.	nHS	k.A.	k.A.	36
17	m	43	42	1	L	MTLE	unauf.	HS	0.3	0.3	0.1
18	w	23	11	12	R	MTLE	unauf.	nHS	5	5	0.1
19	m	29	6	23	L	MTLE	unauf.	nHS	0.5	0.5	k.A.
20	w	14	2	12	R	MTLE	path.	KoP	12	12	1
21	w	15	14,5	1	L	MTLE	unauf.	HS	30	30	k.A.
22	m	52	50	2	L	MTLE	unauf.	HS	10	5	0.1
23	m	24	10	14	R	MTLE	path.	KoP	150	k.A.	1
24	w	24	5	19	R	MTLE	path.	KoP	10	10	1
25	m	38	12	26	R	MTLE	unauf.	nHS	k.A.	1	1
26	m	22	12	10	R	MTLE	unauf.	nHS	4.5	4.5	0.1
27	w	39	6	33	L	NCHI	path.	TM	15	15	0.1
28	m	32	31	1	R	MTLE	unauf.	HS	0	3.5	0.1
29	w	18	3	15	L	MTLE	path.	KoP	8	8	0
30	m	39	26	13	R	MTLE	unauf.	nHS	2	2	0.1
31	m	61	4	57	L	MTLE	unauf.	HS	2	2	0
32	m	5	1	4	L	MTLE	unauf.	nHS	0	k.A.	0.1
33	w	47	46	1	L	MTLE	unauf.	HS	13	13	36



Nr.	w/m	Alter	Dauer	Beginn	Seite	Ind.	Kortex	Path.	Aura/	Anf./	SGS/
									M	M	a
34	w	53	47	6	R	MTLE	unauf.	nHS	k.A.	10.5	0
35	m	12	4	8	R	NCHI	path.	TM	k.A.	60	k.A.
36	m	40	27	13	L	NCHI	path.	DP	k.A.	2.5	25
37	w	39	38	2	L	MTLE	unauf.	HS	k.A.	3	24
38	m	46	24	22	L	MTLE	path.	DP	2.5	3.5	k.A.
39	m	23	3	20	L	MTLE	unauf.	HS	k.A.	3	6
40	w	51	39	12	R	MTLE	unauf.	HS	40	40	12
41	m	39	27	12	R	MTLE	path.	KoP	4.5	4.5	0
42	w	21	17	4	R	MTLE	unauf.	HS	2	2	k.A.
43	w	41	38	3	R	MTLE	unauf.	HS	3	3	0.1
44	m	48	7	41	R	MTLE	unauf.	HS	5.5	5.5	k.A.
45	w	46	32	14	R	MTLE	unauf.	HS	k.A.	7.5	0.01
46	m	21	12	9	R	MTLE	unauf.	nHS	k.A.	15	12
47	w	48	25	23	L	MTLE	unauf.	HS	k.A.	k.A.	k.A.

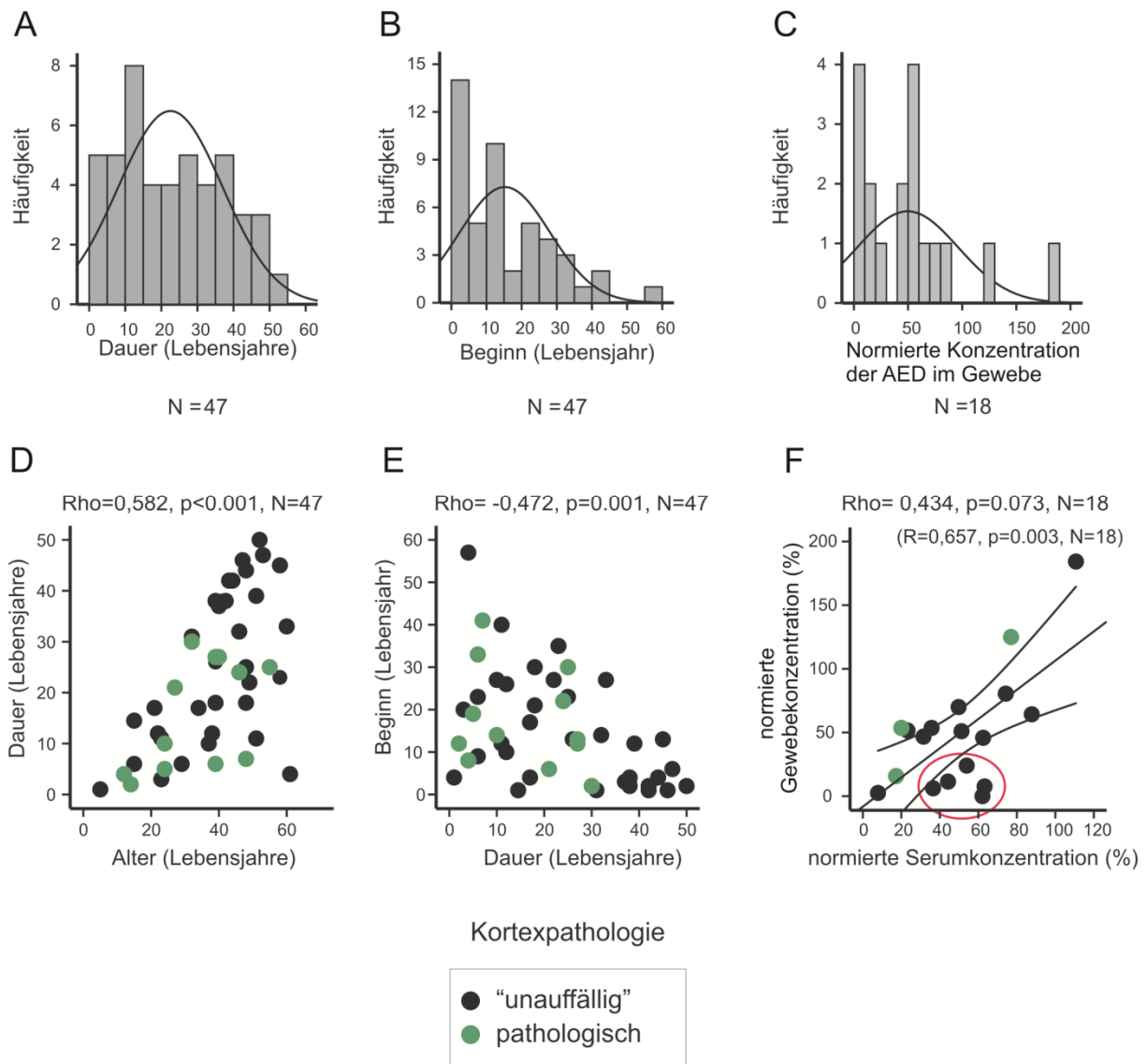
**Tabelle 3 – Patientendaten.** Darstellung von *Geschlecht* (w – weiblich, m – männlich), *Alter* (in Jahren), *Dauer der Erkrankung* (in Jahren), *Beginn der Erkrankung* (in Jahren), *Seite der Resektion* (L – links, R – rechts), *Indikation zur Operation* (NCHI – neurochirurgische Indikation vs. MTLE – epilepsiechirurgische Indikation bei mesialer Temporallappenepilepsie), *Kortexpathologie* (path. – klare Kortexpathologie, unauf. – histologisch „unauffällig“ bzw. diskret verändert), *Gewebepathologie* (HS – hippocampale Sklerose, nHS – keine hippocampale Sklerose, KoP – nur kortikale Pathologie, DP – Doppel-Pathologie), *Anzahl der Auren im Monat*, *Anzahl der Anfälle im Monat* und *Anzahl der sekundären Generalisierungen im Jahr* (Spaltenüberschriften von links nach rechts), k.A. – keine zuverlässigen Angaben.

Mit Ausnahme der pathologischen Befunde des resezierten Gewebes lassen sich aus den Daten kaum statistisch prüfbare (ausreichend große) Patientengruppen ermitteln.

Um geeignete statistische Verfahren anwenden zu können, musste getestet werden, ob die Wertegesamtheiten der Patientendaten und der Patienten-bezogenen elektrophysiologischen Daten normal verteilt sind (siehe Auswahl in Abb. 26A, B, C). Der Kolmogorov-Smirnov Test und/oder der Shapiro-Wilk-Test weisen aus, dass die Werte für Alter, Erkrankungsdauer, Erkrankungsbeginn, Anzahl der Anfälle pro Monat und Anzahl der sekundären Generalisierungen pro Jahr nicht normal verteilt sind. Dies gilt auch für einen Teil der elektrophysiologisch erhobenen Daten, wie die Ereignisrate, Ereignisdauer, Frequenz der Entladungen innerhalb eines Ereignisses und  $[K^+]_{\min}$  (nicht dargestellt). Deshalb kamen für den Nachweis von Korrelationen mit wenigen Ausnahmen der Rang-Korrelationskoeffizient

Spearman-Rho und für die Testung auf Signifikanz von Gruppen-Unterschieden nicht-parametrische Verfahren zum Einsatz.

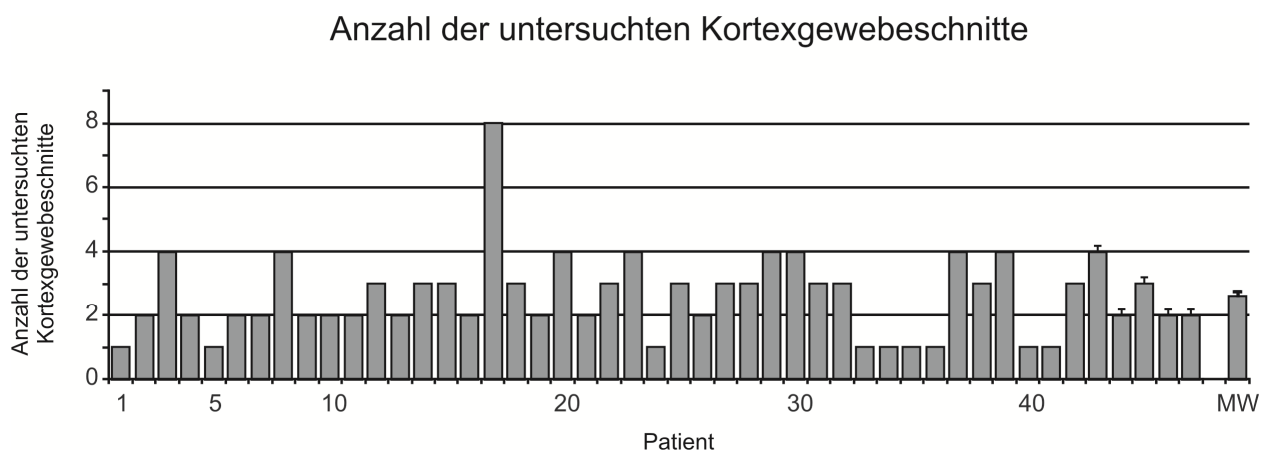
### Patientendaten: Häufigkeitsverteilungen und Korrelationen



**Abb. 26 – Patientendaten: Häufigkeitsverteilungen und Korrelationen.** **A-C** Häufigkeitsverteilungen: **A:** Dauer der Erkrankung, **B:** Beginn der Erkrankung und **C:** normierte Gewebekonzentration der AEDs zum Zeitpunkt der Operation. **D-F** Streu-/Punkt Diagramme. **D:** Dauer der Erkrankung und Alter des (Patienten zum Operationszeitpunkt); **E:** Beginn und Dauer der Erkrankung. **F:** normierte Gewebekonzentration und normierte Serumkonzentration. Bei den markierten fünf Patienten unter dem unteren Konfidenzintervall wäre eine durch MDT an der Blut-Hirn-Schranke verursachte Pharmakoresistenz möglich. *n*: Anzahl der Patienten.

Innerhalb des Patienten-Kollektivs korrelieren die Dauer der Erkrankung positiv mit dem Alter (Abb. 26D) und der Beginn der Erkrankung negativ mit der Dauer der Erkrankung (Abb. 26E). Aus den beiden Grafen geht auch hervor, dass hinsichtlich des Alters der Patienten und bis zu einer Krankheitsdauer von etwa 35 Jahren die pathologischen Befunde „unauffällig“ (keine pathologischen Zeichen, mäßige Gliose, einzelne heterotope Neurone) und „klar beschreibbar“ (Tumor, Dysplasie, Atrophie, Läsion, Kontusio) überlappen. Nimmt man an, dass die Werte der normierten Serum- und Gewebekonzentrationen der AED normal verteilt sind (nach Kolmogorov-Smirnov), steigt die Gewebekonzentration (soweit dokumentiert) linear positiv mit der Serumkonzentration der AED. Außerdem wird deutlich, dass fünf der 18 Patienten bei nicht unterscheidbaren normierten Serumkonzentrationen der AED ( $52 \pm 5.2\%$ ,  $n = 5$  vs.  $50 \pm 8.6\%$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.703$ ) deutlich geringere normierte Gewebekonzentrationen der AED zeigen ( $10 \pm 4.0\%$  vs.  $65 \pm 12.9\%$ ,  $p = 0.004$  Mann-Whitney-Test, exakte Signifikanz, zweiseitig) (Abb. 26F). Diese fünf Patienten kämen als potentielle Anwärtler für eine durch MDT an der Blut-Hirn-Schranke verursachte Pharmakoresistenz in Betracht. Sie sind jedoch weder in Bezug auf die Veränderungen bei Gabe von AED und MDTI noch hinsichtlich ihrer Patientendaten von den anderen 13 Patienten zu unterscheiden (nicht dargestellt).

Pro Patient wurden 1-8 Gewebeschnitte getestet, im Mittel  $2.60 \pm 0.19$  (Abb. 27). Die aus den Schnitten erhaltenen metrischen Daten wurden für jeden Patienten innerhalb der Behandlungsgruppen insgesamt oder hinsichtlich bestimmter Fragen separat gemittelt.



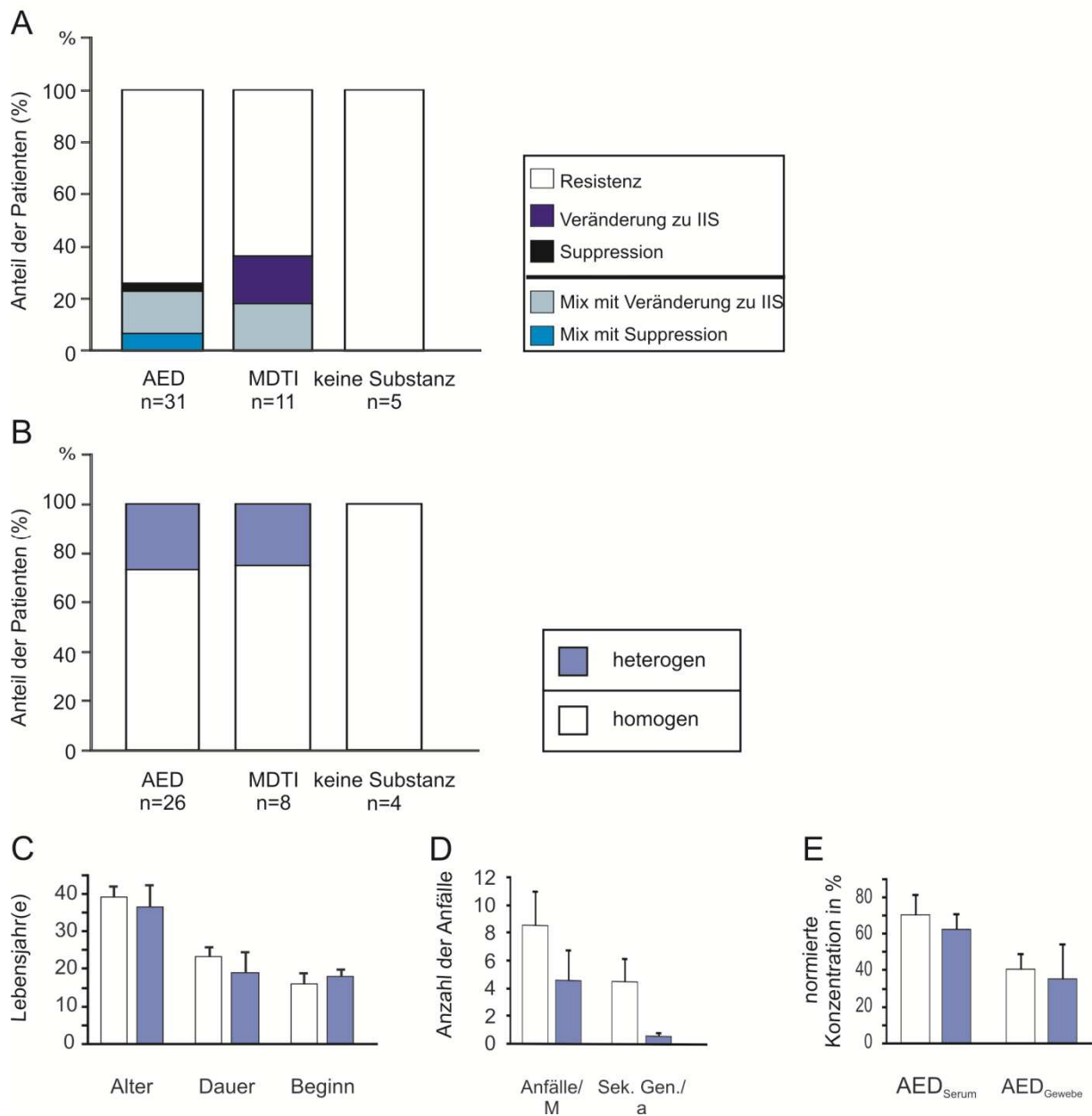
**Abb. 27 – Anzahl der untersuchten Kortexgewebeschnitte pro Patient.** In neun von 47 Patienten wurde nur jeweils ein Gewebeschnitt untersucht. Diese werden in den Betrachtungen zur Homogenität und Heterogenität von Behandlungs-bedingten Aktivitätsmusteränderungen in vitro nicht berücksichtigt.

Die durch Gabe von Substanzen in einem Gewebeschnitt verursachten Änderungen des Musters epileptiformer Aktivität bestanden in Suppression, Übergang von SLE zu IIS oder Resistenz (keine Änderung). Wurde pro Patient mehr als ein Gewebeschnitt getestet, waren gleiche (homogene) oder unterschiedliche (heterogene) Effekte zu beobachten. Letztere wurden als „Mix aus Resistenz und Suppression“ bzw. als „Mix mit Übergang zu IIS“ kategorisiert, wenn mindestens ein Gewebeschnitt des Patienten die im Terminus bezeichnete Veränderung zeigte. In den Abb. 28 und 29 sind unter A die Effekte für alle Patienten der Teilstichproben AED, MDTI und „ohne Substanzapplikation“ dargestellt, auch für jene Patienten, von denen nur ein Gewebeschnitt zur Auswertung kam. In den Grafiken B sind jeweils nur die Anteile homogener und heterogener Änderungen abgebildet, also von Patienten mit mindestens zwei Gewebeschnitten in der Analyse. Die weiteren Graphen in beiden Abbildungen sollen zeigen, ob und wie sich Patienten unterscheiden, deren Aktivität den dargestellten Veränderungen unterliegt.

Es fällt auf, dass in den Kontrolluntersuchungen ohne Substanzapplikation ( $n =$  fünf Patienten) keine Veränderungen des Musters induzierter epileptiformer Aktivität auftreten, während sowohl die Applikation von AED ( $n = 31$  Patienten) als auch die der MDTI ( $n = 11$  Patienten) bei 26 % bzw. 36 % der Patienten mit derartigen Veränderungen einhergehen (Abb. 28A). Trotz der deutlichen Differenzen zur Kontrollgruppe ergeben die statistischen Vergleiche der entsprechenden Anteile keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen AED bzw. MDTI und „keine Substanz“ ( $p = 0.728$  bzw.  $p = 0.345$ , Fishers exakter Test).

Für die Teilstichproben AED ( $n = 26$ ) und MDTI ( $n = 8$ ) wurden bei 26.9% und 25% der Patienten heterogene Effekte beobachtet (s. Abb. 28B). Auch hier zeigen sich im statistischen Vergleich mit den Kontrolluntersuchungen ( $n = 4$ ) keine signifikanten Differenzen ( $p = 0.548$ ,  $p = 0.515$ , Fishers exakter Test).

## In vitro Effekte von AED auf das Gewebe der Patienten



**Abb. 28 – In vitro Effekte der AED auf das Gewebe der Patienten: Vergleich zur Gabe von MDTI und zu Kontrollversuchen „ohne Substanzapplikation“** (unabhängige Patientengruppen). **A:** Anteile von Patienten mit den in der Legende bezeichneten Effekten in den Behandlungs-Gruppen. **B:** Anteile der Patienten, in deren Gewebe homogene bzw. heterogene Effekte (unabhängig von der Qualität der Veränderungen) gefunden wurden (nur Patienten mit mindestens zwei Gewebeschnitten in der Analyse). **C-E:** Daten der entsprechenden Patientenkollektive („homogen“ weiße Säulen, „heterogen“ blaue Säulen) in der Behandlungs-Gruppe AED (Ordinate: Mittelwerte und Standardfehler; Abszisse: Merkmalskategorien). **C:** Alter, Dauer und Beginn der Erkrankung (n = 19, 7). **D:** Anfälle/Monat (n = 18, 5) und Sekundäre Generalisierungen im Jahr (n = 14, 5). **E:** Normierte Serum- und Gewebekonzentrationen der AED (n = 18, 7 und 7, 4). Alle erkennbaren Unterschiede sind statistisch insignifikant (A, B exakter Test nach Fisher, C – E Mann-Whitney-Test). n: Anzahl der Patienten.

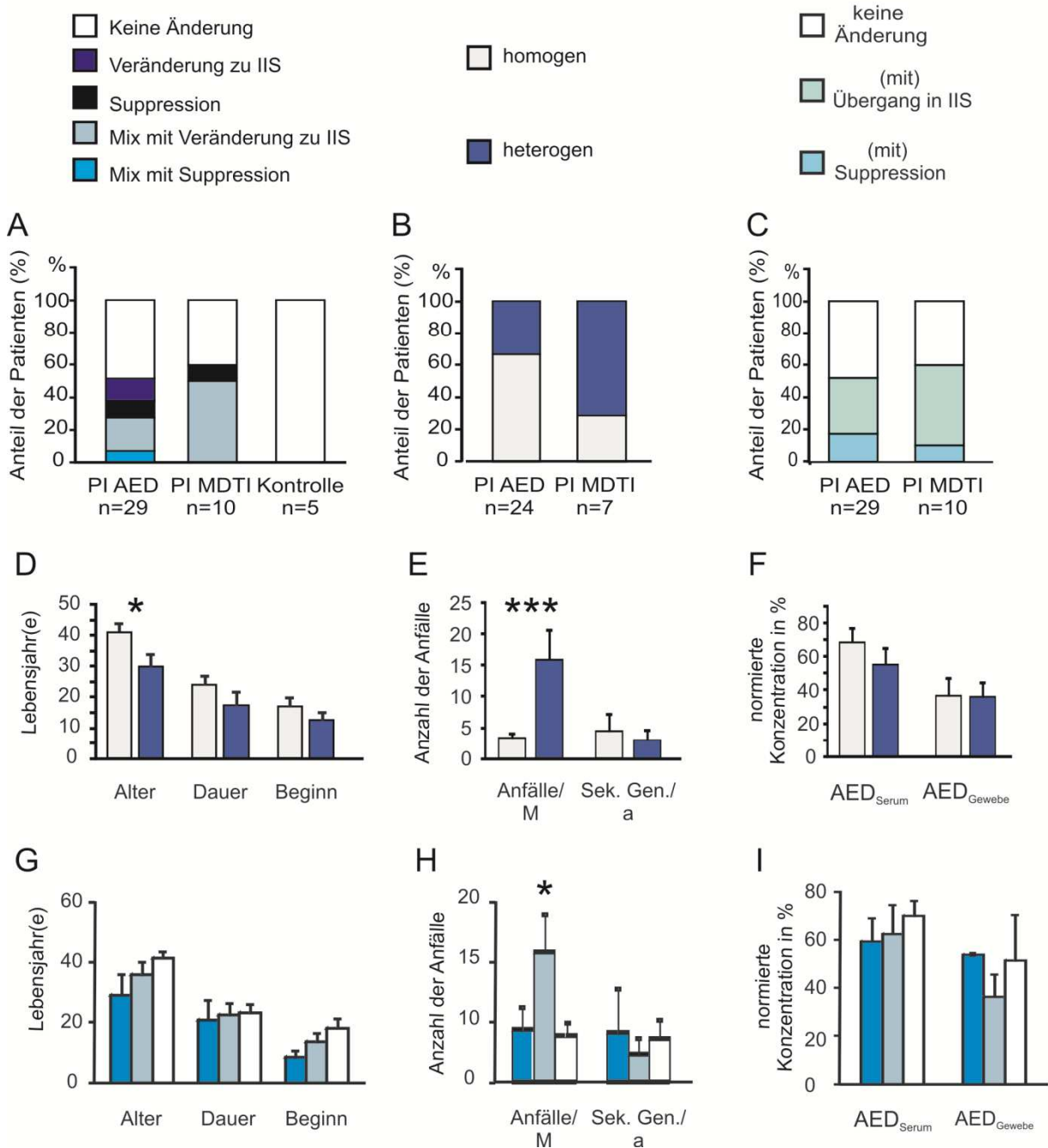
Eine wesentliche Aufgabe meiner Arbeit bestand darin herauszufinden, ob die funktionelle Ausschaltung der Transportproteine PGP und MRP im resezierten Gewebe pharmakoresistenter Patienten die Effizienz der Pharmakotherapie steigern kann. Die Effekte der in vitro Koapplikation pro Patient wurden in der gleichen Weise kategorisiert wie bei den bereits geschilderten Effekten der AED. Um auszuschließen, dass die Dauer der Applikation von MDTI entscheidend für den Effekt ist, wurden die MDTI in der einen Patientengruppe für 20 Minuten (nach Präinkubation mit AED (PI AED), in der anderen Gruppe für 40 Minuten (Gabe von AED und MDTI nach Präinkubation mit MDTI, PI MDTI) appliziert (jeweils 20 Minuten Koapplikation von MDTI und AED). Zum Vergleich diente wieder die Kontrollgruppe „ohne Substanz-Applikation“.

Abb. 29A zeigt, dass sich die Anteile der Patienten mit Veränderungen des Musters epileptiformer Aktivität zwischen den Gruppen PI AED bzw. PI MDTI einerseits und der Kontrollgruppe andererseits noch deutlicher unterscheiden als für die Effekte der AED. Zum Versuchszeitpunkt (40 Minuten nach Start des Protokolls) blieb die Aktivität in der Kontrollgruppe unverändert, wohingegen in beiden Untergruppen der Koapplikation Suppression und Veränderungen der Aktivität zu IIS auftraten ( $p = 0.618$ ,  $p = 0.131$ ; exakter Test nach Fisher). Für die Koapplikation waren bei PI mit MDTI häufiger heterogene Effekte (71.4% von sieben Patienten) festzustellen als bei PI mit AED (33.3% von 24 Patienten), (siehe Abb. 28B). Der relativ klare Unterschied lässt sich aber auch in diesem Fall statistisch nicht sichern.

Bleiben Homogenität und Heterogenität unberücksichtigt (Abb. 29C), ist der Anteil der Patienten mit Veränderung von SLE zu IIS in der Patientengruppe PI MDTI etwas größer (50% von zehn Patienten) als in der Gruppe PI AED (34.5% von 29 Patienten) während Patienten mit Suppression der Aktivität in der Gruppe PI AED (17.2 versus 10%) vergleichsweise etwas häufiger vertreten sind ( $n = 29, 10$ ,  $p = 0.699$ ).

Die Patienten mit heterogenen Effekten waren vergleichsweise jünger (Abb. 29D:  $p = 0.041$ ) und erlitten häufiger epileptische Anfälle (Abb. 29E:  $p = 0.001$ , Mann-Whitney-Test). Patienten mit Veränderungen des Musters von SLE zu IIS waren im Vergleich zu Patienten mit Suppression bzw. Resistenz ebenfalls durch eine signifikant größere Anfallsfrequenz charakterisiert (Abb. 29H). Außerdem stammten die 18 Resektate ohne Veränderung der Aktivität nach Koapplikation von AED und MDTI von Patienten mit der Operations-Indikation „Fokale Epilepsie“ ( $n = 34$ ). Im Gegensatz dazu fanden sich bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie, deren Operation „neurochirurgisch“ indiziert war ( $n = 5$ ) keine „resistenten“ Resektate ( $p = 0.039$  Fishers exakter Test, nicht abgebildet).

## In vitro Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf das Gewebe der Patienten



**Abb. 29 – In vitro Effekte der Koapplikation von AED und MDTI auf das Gewebe der Patienten: Vergleich zwischen Patienten-Gruppen, in deren Gewebe die Koapplikation nach Präinkubation mit AED (PI AED) bzw. MDTI (PI MDTI) durchgeführt wurde** (unabhängige Patientengruppen, Zeitpunkt des Vergleichs: 40 Minuten nach Start der Protokolle einschließlich Präinkubation). **A:** Anteil der Patienten mit den nach Koapplikation beobachteten Effekt-Kategorien in den Gruppen „PI AED“, „PI MDTI“ und „Kontrolle“ (ohne Substanzapplikation). **B:** Anteile der Patienten mit homogenen und heterogenen Effekten in den Gruppen „PI AED“ und „PI MDTI“ (nur Patienten die mindestens zwei Gewebeschnitte in der Analyse hatten). **C:** Anteile der Patienten deren Effekte im Hinblick auf die Qualität der Veränderung des Musters epileptiformer Aktivität zusammengefasst wurden (Legende). **D-F:** Vergleich der Patientenkollektive mit homogenen und heterogenen Veränderungen des Musters

epileptiformer Aktivität (Mittelwerte und Standardfehler verschiedener Merkmale in der zusammengefassten Stichprobe (PI AED und PI MDTI), „homogen“ weiße Säulen; „heterogen“ blaue Säulen). **D:** Alter, Dauer und Beginn der Erkrankung (n = 18, 13). **E:** Anfälle/Monat (n = 15, 13) und sekundäre Generalisierungen im Jahr (n = 14, 10). **F:** Normierte Serum- und Gewebekonzentrationen der AED (n = 18, 12 und 9, 5). **G-I:** Vergleich der Patientenkollektive in deren Gewebe die unter C genannten Effekte mindestens in einem Schnitt zu beobachten waren. Die Anzahl der Patienten „(mit) Suppression“ (Säulen türkis), (mit) Übergang von SLE in IIS (Säulen babyblau) bzw. ohne Veränderung (Säulen weiß) beträgt in **G** 6, 15, 18; in **H** 4, 15, 16 bzw. 5, 10, 14; in **I** 6, 14, 18 bzw. 1, 7, 9. n: Anzahl der Patienten.

*Die wesentlichen Ergebnisse der Patienten-Analyse lassen sich wie folgt zusammenfassen:*

Zwischen den normierten AED-Konzentrationen in Gewebe und Serum besteht eine positive lineare Korrelation. Fünf Patienten zeigen im Verhältnis zur Serum-Konzentration der AED eine auffällig geringe Gewebe-Konzentration. Diese Patienten, die eine potentiell durch „MDT an der Blut-Hirn-Schranke verursachte Pharmakoresistenz“ annehmen lassen, zeigen keinerlei Besonderheiten, weder im Rahmen der in vitro elektrophysiologisch getesteten Pharmakoresistenz noch hinsichtlich der Patientendaten.

In 38 von 47 untersuchten Resektaten konnten mehr als ein Gewebeschnitt elektrophysiologisch untersucht werden. Bei der Kategorisierung von Substanz-Effekten auf die Muster induzierter epileptiformer Aktivität waren in den Gewebeschnitten eines Patienten nicht nur gleiche (homogene) sondern auch verschiedene (heterogene) Effekte zu beobachten. In diesem Zusammenhang stellen sich zwei Fragen: 1. Ob und wie unterscheiden sich Patienten, die homogene bzw. heterogene Veränderungen zeigen? 2. Ob und wie unterscheiden sich Patienten, deren induzierte Aktivität komplett oder teilweise unterdrückt wird, deren krampf-artige Ereignisse komplett oder zumindest in einem Teil der Gewebeschnitte in inter-iktal-artige Ereignisse übergehen oder deren Aktivitätsmuster unverändert bestehen bleibt?

Applikation von AED oder MDTI alleine (20 Minuten) verursachen überwiegend keine Veränderungen des Musters induzierter Aktivität (74%, 64% der Patienten). Nur bei einem kleineren Teil der Patienten waren Übergang von SLE zu IIS (16%, 36%) und selten eine Suppression (10%, 0%) zu beobachten. Der Anteil von Patienten, die Homo- bzw. Heterogenität der Effekte zeigten, betrug 73% bzw. 27% bei Applikation von AED und 75% bzw. 25% bei Applikation der MDTI. Es gibt keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Patientenkollektiven, sowohl für die Homo- bzw. Heterogenität der Effekte als auch für die qualitativ unterschiedlichen Effekte.

Im Vergleich zur Applikation von AED oder MDTI allein reagierten nach zusätzlichen 20 Minuten Koapplikation von AED und MDTI mehr Patienten mit Veränderungen (23.1% vs. 53.8%,  $p = 0.023$ , abhängige Stichproben, McNemar-Test). Das trifft auch bei Berücksichtigung



der unterschiedlichen Veränderungen zu (Suppression 2.6% vs. 15.4% der Patienten, Übergang von SLE in IIS 20.5% vs. 38.5% und keine Veränderung 76.9% vs. 46.2%,  $p = 0.045$ , abhängige Stichproben, McNemar-Bowker-Test). Für die Koapplikation ergaben sich keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den beiden Patientengruppen mit unterschiedlichen Behandlungs-Protokollen (Präinkubation mit AED vs. Präinkubation mit MDTI). Hinsichtlich der Patientendaten ist zu bemerken, dass bei Koapplikation heterogene Effekte signifikant häufiger in Gewebe von jüngeren Patienten und von Patienten mit hoher Anfallsfrequenz auftraten. Letzteres stellt sich auch für die Patientengruppe dar, die auf Koapplikation mit einem Übergang von krampf-artigen zu inter-iktal-artigen Ereignissen reagieren.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die aus 166 Gewebeschnitten des Temporalen Kortex pharmakoresistenter Patienten mit fokaler Epilepsie (n = 49) gewonnenen Daten unterstützen folgende Aussagen:

1. Mit dem Hochkalium-Bicucullin-Modell können in 85% der Gewebeschnitte von 47 Patienten zwei Typen periodischer epileptiformer Aktivität induziert werden, entweder krampfartige Ereignisse (SLE, 85%, Dauer  $\geq 5$  s) oder spike-artige Ereignisse (IIS, 15%, Dauer  $< 5$  s). Letztere sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in Gewebeschnitten von Patienten mit klar definierter Kortexpathologie zu beobachten. Die Gabe des AMPA-/Kainat-Rezeptor-Antagonisten CNQX führt zu einer vollständigen und reversiblen Suppression der Aktivität. Dieser Befund berechtigt zu der Annahme, dass die induzierte Aktivität durch Aktivierung von AMPA-/Kainat-Rezeptoren vermittelt wird. Die Aktivitätsmuster sind in Kontroll-Experimenten (ohne Gabe von Medikamenten) bis zu 80 Minuten stabil, aber die Amplitude des langsamen Feldpotentials im Ereignis, die Ereignisdauer und  $\Delta[K^+]$  während des Ereignisses unterliegen einer „Zeit“-abhängigen Reduktion.

2. Bei Behandlung mit CBZ, VPA und PHT in therapeutisch wirksamen Konzentrationen bleibt in 81% der 76 behandelten Gewebeschnitte das Muster krampfartiger Aktivität (SLE) bestehen. Der Durchschnittswert der Aktivitätsparameter und der aktivitätsabhängige Anstieg der  $[K^+]$  werden im Mittel um 6 bzw. 15% vermindert. Das heißt, 81% der Gewebeschnitte mit krampfartiger Aktivität sind gegenüber gängigen AED resistent. In 12% verändert sich das Muster zu spike-artiger Aktivität (IIS). Nur in 7% der Gewebeschnitte ist keine epileptiforme Aktivität mehr vorhanden, das heißt sie sind unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke pharmakosensitiv. Gewebeschnitte mit induzierter spike-artiger Aktivität sind ebenfalls zu 80% resistent, aber zu 20% pharmakosensitiv.

3. Im Unterschied zu den AED bewirken Verapamil (VPM) und Probenecid (PBN) in den Gewebeschnitten die SLE generieren keine Suppression aber öfter eine Musteränderung zu IIS (31% vs. 12%). Als Modulationen der verbleibenden Parameterwerte resistenter SLE sind eine mittlere Zunahme der Ereignisrate um 26% und eine zusätzliche Reduktion des Anstieges der  $[K^+]$  um 23% erkennen. Das würde bedeuten, dass eine Blockierung der Transportproteine PGP und MRP in vitro zu einer beachtlichen Modulation der krampfartigen Aktivität führt.

4. Die Koapplikation von AED und MDTI auf Gewebeschnitte mit AED-resistenter krampfartiger Aktivität (n = 59) resultiert im Vergleich zur Gabe von AED allein in einer

kleineren Fraktion der Gewebeschnitte mit resistenten SLE (58% vs. 81%) aber in einer größeren Fraktion der Gewebeschnitte mit Musteränderungen zu IIS (37% vs. 12%). Nur 5% der Schnitte sind sensitiv. Auch die Modulation der Parameterwerte resistenter SLE ist nach Koapplikation signifikant stärker als nach AED allein. Dies zeigt sich in einer signifikanten Zunahme der Ereignisrate, einer stärkeren Reduktion der Amplituden und der Dauer der Ereignisse sowie des Anstieges der  $[K^+]$ . Die Dauer der Applikation von PBN und VPM hat keinen Einfluss auf die Wirkung der Koapplikation. Gewebeschnitten, die nach Gabe von AED spike-artige Aktivität generieren (n = 16), sind im Gegensatz dazu zu 44% sensitiv. Das bedeutet, dass die zusätzliche Blockierung der Transport-Proteine PGP und MRP durch VPM und PBN in der Koapplikations-Phase die Effekte der AED „verstärkt“ aber die Pharmakosensitivität krampf-artiger Aktivität nur um 5% bzw. die der spike-artigen Aktivität um 44% erhöht.

In der Erholungsphase (40-60 Minuten Auswaschen der AED und MDTI) sind Musteränderungen der krampf-artigen Aktivität in 51% der Gewebeschnitte reversibel und in 49% irreversibel. Jedoch sind die reiz-evozierten Feldpotentiale nach weiterer Perfusion mit normaler ACSF (3 mM  $[K^+]$ , kein Bicucullin, 60 Minuten) in allen Teilstichproben ohne Unterschied gut erhalten.

5. Zwischen den Antikonvulsiva CBZ, VPA und PHT gibt es weder in der Phase ihrer alleinigen Applikation (20 Minuten) noch in der Phase ihrer Koapplikation mit VPM und PBN (40 Minuten) deutliche Unterschiede in der Wirkung. Es gibt keine Hinweise darauf, dass zwischen CBZ, VPA und PHT Unterschiede hinsichtlich der Substrat-Eigenschaften für PGP und MRP bestehen.

6. Im Kontext zur Pharmakoresistenz der operierten Patienten ist von Interesse, welche Patienten (Resektate) in vitro auf die Gabe der AED und die Koapplikation von AED und MDTI mit Suppression oder Musteränderung der induzierten Aktivität reagieren.

Zwischen den normierten AED-Konzentrationen in Gewebe und Serum besteht eine positive lineare Korrelation (n = 18). Fünf dieser Patienten zeigen im Verhältnis zur Serum-Konzentration der AED eine auffällig geringe Gewebe-Konzentration, sind jedoch weder hinsichtlich weiterer klinischer Daten noch anhand der am resezierten Gewebe elektrophysiologisch erhobenen Befunde von den anderen 13 Patienten zu unterscheiden.

Ein wesentliches Ergebnis der Patienten-bezogenen Analyse besteht darin, dass bei Untersuchungen an zwei oder mehr Gewebeschnitten eines Patienten nicht nur gleiche (homogene) sondern auch verschiedene (heterogene) Wirkungen der getesteten Medikamente zu beobachten sind. Heterogene Effekte werden qualitativ als Musteränderung zu IIS oder

Suppression kategorisiert, wenn die entsprechende Veränderung mindestens in einem Gewebeschnitt des Patienten nachweisbar ist.

Bei Applikation von AED (20 Minuten, n = 31 Patienten) sind 74% der untersuchten Resektate (Patienten) resistent, 16% reagieren mit einer Musteränderung und 10% zeigen eine Suppression. Heterogene Effekte treten in 27% der 26 Resektate mit mindestens zwei Gewebeschnitten in der Analyse auf. Unterschiede zwischen den Effekten der AED und MDTI sind statistisch nicht signifikant. Es gibt keine Hinweise auf Beziehungen zwischen elektrophysiologischen Befunden und Patientendaten.

Koapplikation von AED und MDTI (n = 39) resultiert signifikant häufiger in Veränderungen der Aktivität als Applikation von AED oder MDTI allein (Suppression 15.4% vs. 2.6% der Patienten, Übergang von SLE in IIS 38.5% vs. 20.5% und keine Veränderung 46.2% vs. 76.9%). Der Anteil heterogen reagierender Patienten ist mit 42% vs. 26% insignifikant größer als nach Applikation von AED oder MDTI allein. Patienten mit heterogenen Effekten sind signifikant jünger und durch eine hohe Anfallsfrequenz charakterisiert. Eine hohe Anfallsfrequenz zeigen auch jene Patienten, die auf Koapplikation mit einem Übergang von krampf-artiger Aktivität in interiktal-artige Aktivität reagieren.

#### **4.2. Das Hochkalium-Bicucullin-Modell stellt ein adäquates Akutmodell zur Prüfung von Fragen zur Pharmakoresistenz im resezierten Kortextgewebe dar.**

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass in Gewebeschnitten des resezierten Temporalen Kortex chronisch epileptischer Patienten nach Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration (8 mM  $[K^+]$  im Perfusat) durch Gabe von Bicucullin (50  $\mu$ M im Perfusat) periodische epileptiforme Aktivität induziert werden kann. Im Gyrus dentatus war die in vitro Induktion durch Stimulation im Hilus und Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration (10-12 mM  $[K^+]$  im Perfusionsmedium) möglich. Die Gabe von Bicucullin war nicht erforderlich (Gabriel et al. 2004). Vorangegangene Studien in Tieren erwiesen, dass eine hohe Kaliumionen-Konzentration in vivo (Zuckermann und Glaser 1968: Katze) und in vitro (Ogata et al. 1976: Meerschwein, Rutecki et al. 1985: Ratte) epileptiforme Aktivität im Hippokampus induzieren kann. Die Anwendung des Hochkalium-Modells mit oder ohne Stimulation führte jedoch in den Temporalen Kortizes dieser Studie nicht zum Erfolg.

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist Bicucullin wurde in Studien an Tieren zur Induktion epileptiformer Aktivität in vivo (Meldrum und Horton 1971, Campbell und Holmes 1984, Eder et al. 1997) und in vitro (Jones 1988) verwendet. Eine der wenigen Studien zur in vitro Induktion epileptiformer Aktivität in humanem Kortexgewebe bediente sich ebenfalls der durch Bicucullin hervorgerufenen Disinhibition von Neuronen (Hwa et al. 1991). Eine wesentliche Übereinstimmung dieser Studie mit unseren Ergebnissen besteht im Fehlen von spontaner Aktivität in den Gewebeschnitten von chronisch epileptischen Patienten.

#### *4.2.1. Das Gewebe von Patienten mit klar definierter Kortexpathologie besitzt Eigenschaften die eine Induktion „spike-artiger“ epileptiformer Aktivität begünstigen.*

Wie in vorangegangenen Untersuchungen im Hippokampus (Gabriel et al. 2004) konnte auch im Kortex gezeigt werden, dass die Pathologie des Gewebes einen Einfluss auf den induzierten Aktivitätstypus hat. (Perilesionale) Gewebeschnitte von Patienten mit klar definierter Kortexpathologie zeigten signifikant häufiger den Aktivitätstyp IIS als unauffälliges Gewebe. Dies gibt Anlass die beiden Aktivitätstypen und ihre Bedeutung zu reflektieren.

**Was repräsentieren IIS und SLE in vitro?** Im EEG chronisch epileptischer Patienten werden iktale (anfalls-artige) Ereignisse und inter-iktale (zwischen den Anfällen auftretenden) Ereignisse beschrieben. Die iktalen Ereignisse werden aufgrund einer klaren Abgrenzbarkeit von der Hintergrundaktivität (z.B. inter-iktale Depolarisationen), der Entwicklung einer eigenen Frequenz und Amplitude während des Ereignisses, sowie eines klar sichtbaren Endes definiert (Verma und Radtke 2006). Tiefenelektrodenaufzeichnungen von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie zeigen ähnliche Aktivitätsmuster, so dass Spencer und Kollegen 1992 in ihrer Studie ebenfalls iktale (periodisch auftretende, mit einer Frequenz  $< 2$  Hz und Dauer  $> 5$  s) von inter-iktalen Ereignissen (langsame Depolarisation mit einer schnellen Sequenz an Aktionspotentialen und einer Dauer  $< 5$  s) unterscheiden (Spencer 1992, de Curtis und Avanzini 2001). Diese Klassifikation wurde in zahlreiche Studien epileptiformer In-vitro-Aktivität übernommen (D'Antuono et al. 2010). Es gibt eine lebhafte Diskussion um die verschiedenen Mechanismen, die Auftreten und Pathophysiologie dieser verschiedenen Aktivitätsmuster betreffen. Librizzi und de Curtis konnten 2003 im Tiermodell zeigen, dass bei Auftreten periodischer inter-iktaler Ereignisse keine iktalen Ereignisse im Tiermodell ausgelöst werden. Sie diskutieren eine protektive Rolle der inter-iktalen Aktivität, die zu verminderter Hyperexzitabilität führen kann (Librizzi und de Curtis 2003). Studien am Kainat-Modell der Epilepsie weisen daraufhin, dass die Induktion epileptiformer Aktivität im chronisch

epileptischen Gewebe seltener möglich ist als in Gewebe von Kontrolltieren (Panuccio et al. 2010, Zahn et al. 2008). Als möglicher (Schutz-) Mechanismus konnte eine Herunterregulierung von Kaliumkanal-Untereinheiten (Kv3.4) identifiziert werden bzw. ein aktivitätsabhängiges Editieren von Kv1.1. Kanälen (Streit et al. 2011).

Bezogen auf die Ergebnisse der zitierten Studien kann ein vermehrtes Auftreten von IIS in Gewebeschnitten von Patienten mit einer klar definierten Kortexpathologie a.) auf Veränderungen der neuronalen Plastizität im perilesionalen Gewebe beruhen, b.) ein Hinweis auf die Existenz von Schutzmechanismen wie die o.g. Herunterregulation von Kaliumkanaluntereinheiten sein oder c.) mit veränderten Mechanismen zur Energiegewinnung (Marcus et al. 2010; Turner et al. 2011; Kann et al. 2005) zusammen hängen.

In einer Studie von Spencer wurden präoperative EEG-Aufzeichnungen und histopathologischen Veränderungen im resezierten Gewebe (Hippokampus) untersucht (Spencer et al. 1999). Die Autoren berichteten über einen positiven Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IIS im präoperativen EEG und der Dichte von Gliazellen im resezierten Hippokampusgewebe, während das präoperative Auftreten anfalls-artiger Ereignisse positiv mit der Dichte neuronaler Zellen korreliert. Leider wurden die von uns elektrophysiologisch untersuchten Gewebeschnitte nicht histopathologisch analysiert so dass ein direkter Zusammenhang zwischen induzierter Aktivität und neuronaler bzw. glialer Zelldichte nicht hergestellt werden kann. In Zukunft erscheint es jedoch sinnvoll, das untersuchte Kortextgewebe histopathologisch zu analysieren und die Induktion der verschiedenen Muster epileptiformer Aktivität mit präoperativen EEG-Aufzeichnungen des Patienten zu vergleichen.

#### *4.2.2. Die induzierte Aktivität wird durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren, also „glutamaterg“, vermittelt.*

Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Experimente haben ergeben, dass die In-vitro-Aktivität im Temporalen Kortextgewebe nicht durch NMDA-Rezeptoren, sondern durch AMPA-/Kainat-Rezeptoren vermittelt wird. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen waren die Ereignisse in der bereits zitierten Studie von Hwa nach Gabe des NMDA-Rezeptor-Blocker APV in Dauer und Amplitude reduziert (Hwa et al. 1991). Im „Kindling Model für komplex-partiale epileptische Anfälle“ wurde gezeigt, dass NMDA-Rezeptoren für die synaptische Transmission verantwortlich sind (Mody und Heinemann 1987) und eine erhöhte Sensitivität dieser Rezeptoren im Gewebe gekindelter Ratten besteht (Morissett et al. 1989). Eine andere Studie im

humanen epileptischen Gewebe ergab jedoch eine, im Vergleich zu den NMDA-Rezeptoren, signifikant erhöhte Bindung radioaktiv markierter Liganden an AMPA-Rezeptoren (Hosford et al. 1991) im Gyrus dentatus. Weiterhin wurden auch Kainat-Rezeptoren mit der Auslösung epileptischer Anfälle in Verbindung gebracht (Nadler 1981, Ben-Ari 1985). Sie tragen zur spontanen und synaptischen Transmission in Körnerzellen des Hippokampus von chronischen epileptischen Ratten bei, aber nicht in Kontrolltieren (Epsztein et al. 2005). Im Kontext zu den Ergebnissen unserer bisherigen Arbeiten an reseziertem Hippokampusgewebe von Patienten mit fokaler Epilepsie (Gabriel et al. 2004) können AMPA-Rezeptoren als wichtige Vermittler der Hyperexzitabilität im epileptischen Hippokampus angesehen werden. Die Ergebnisse meiner Arbeit erweitern diese Aussage auf die durch Hochkalium-Bicucullin- induzierte Aktivität im Gewebe des Temporalen Kortex.

#### *4.2.3. Die Gewebevitalität bleibt erhalten.*

Die direkte Überprüfung der Gewebevitalität mittels evozierter Feldpotentiale ergab einen hohen Prozentsatz der Amplitude des Ausgangswertes zum Ende des Versuchsablaufs (kurz- und lang-latente Antworten:  $94.6 \pm 4.15\%$  und  $137.9 \pm 17.53\%$ ). Die Amplituden lang-latenter Reizantworten waren am Versuchsende gegenüber denen am Anfang signifikant erhöht. Hier ist zu vermuten, dass noch ein Einfluss der zuvor erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration bestehen bleibt. Ein evoziertes Feldpotential wird auch als Messgröße der Erregbarkeit verwendet, da es die Summe der synchron aktivierten Neurone repräsentiert und mit der Anzahl aktiver Einheiten korreliert (Andersen et al. 1971). Aufgrund der längeren Latenz der Reizantwort ist die Beteiligung synaptischer Übertragungsprozesse wahrscheinlich. Die Amplitudenzunahme am Ende des Versuchsablaufes signalisiert eine Zunahme der Erregbarkeit, die trotz Abwesenheit des epileptogenen Perfusionsmediums zumindest eine Stunde erhalten bleibt. Das kurz-latente Feldpotential ist als Summenaktionspotential reizevozierte Erregung von Fasern (Dendriten und Axone) sowie der Entladung antidrom erregter Neurone zu interpretieren (Tolner et al. 2003). Die kurz-latenten Reizantworten unterlagen keiner signifikanten Amplituden-Änderung (2.6 mV am Versuchende vs. 2.8 mV am Versuchsanfang). Geht man davon aus, dass evozierte Feldpotentiale eine Aussage über die Gewebevitalität gestatten, ist zu schlussfolgern, dass die Gewebevitalität trotz lang andauernder Generation epileptiformer Aktivität, Behandlung mit Antikonvulsiva und/oder MDTI noch mindestens für eine Stunde

(Auswaschen des epileptogenen Perfusionsmediums) erhalten bleibt oder innerhalb der Auswaschzeit wieder hergestellt ist.

#### *4.2.4. Die induzierte Aktivität bleibt über die gesamte Versuchszeit relativ stabil..*

Die Kontrollversuche zum natürlichen Zeitgang der Aktivität zeigen eine Konstanz des Aktivitätstyps im Beobachtungszeitraum von bis zu 80 Minuten. Diese Tatsache beweist, dass die Versuchsbedingungen bis zu 18 Stunden Lagerung der Gewebeschnitte in der Interface-Kammer und Begasung mit Carbogen, ~ 2 Stunden Perfusion mit 8 mM  $[K^+]$ -50  $\mu$ M Bicucullin-ACSF eine für die Induktion epileptiformer Aktivität ausreichende Vitalität des Gewebes garantieren. Darüber hinaus lässt sich schlussfolgern, dass die durch Gabe von AED und MDTI ausgelösten Veränderungen des Typs epileptiformer Aktivität, Effekte der Substanzen darstellen.

Trotz der Konstanz des Aktivitätsmusters verändern sich im Zeitverlauf die Ereignis-Parameter. Das langsame Feldpotential (sfp), die Ereignisdauer und  $\Delta[K^+]$  werden im Vergleich zum Kontrollwert reduziert. In unseren Experimenten wäre nach lang andauernder Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration eine zunehmende  $K^+$ -Akkumulation durch Erschöpfung der glialen Puffermechanismen (Dietzel et al. 1989, Somjen 2002, Kofuji und Newman 2004) oder zunehmendem Verbrauch von Energie (ATP) zur Aufrechterhaltung einer adäquaten  $Na^{(+)}-K^{(+)}-ATPase$ -Aktivität (D'Ambrosio et al. 2002) zu vermuten. In unseren Untersuchungen ließ sich aber nur ein insignifikanter Anstieg von  $[K^+]_{min}$  um ~ 0,5 mM feststellen, der mit den genannten Veränderungen des sfp, der Ereignisdauer und von  $\Delta[K^+]$  nicht korreliert. Deshalb ist nicht wahrscheinlich, dass die Veränderungen der Ereignisparameter auf „erschöpfte“ Regulationsmechanismen der extrazellulären  $[K^+]$  zurückzuführen sind, wie das eine im Mittel um 0.5 mM insignifikant angestiegene  $[K^+]_{min}$  andeuten könnte (Feldberg und Sherwood 1957; Fröhlich et al. 2008).



### **4.3. Das Gewebe des Temporalen Kortex von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie ist auch bei In-vitro-Behandlung mit gängigen Antiepileptika pharmakoresistent.**

Nach AED Applikation blieb krampf-artige Aktivität in 81% der Gewebeschnitte resistent, in 12% änderte sich der Aktivitätstyp zu IIS und nur in 7% war keine Aktivität mehr nachweisbar. Für die große Gruppe resistenter SLE fand sich eine signifikante Verminderungen des Durchschnittswertes aller Aktivitätsparameter (av5) und eine Reduktion von  $\Delta[K^+]$ .

Die Befunde im Temporalen Kortex sagen aus, dass die induzierte Aktivität unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, unabhängig von der Methode der Induktion und von der untersuchten Struktur (Jandova et al. 2006, für den Gyrus dentatus), gegenüber therapeutisch wirksamen Konzentrationen von CBZ, VPA und PHT resistent ist. Dies entspricht der klinisch bei den Patienten bestehenden Pharmakoresistenz. Die Tatsache, dass nur wenige Gewebeschnitte in vitro sensitiv auf AED reagieren, spricht dafür, dass in der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte Mechanismen wie z.B. endothelial exprimierte MDT (Dombrowski et al. 2001, Kubota et al. 2006) nicht allein für die Pharmakoresistenz verantwortlich sein können.

Die Wirksamkeit der drei getesteten Antikonvulsiva unterscheidet sich nicht. Trotz verschiedener zusätzlicher Angriffspunkte der eingesetzten Antikonvulsiva (VPA: Verstärkung GABAerger Neurotransmission und/oder Glutamat-Rezeptorantagonismus; PHT: Membranstabilisation) blockieren CBZ, VPA und PHT  $Na^+$ -Kanäle. Da die AED unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke eine ähnlich niedrige Wirksamkeit auf die induzierte epileptiforme Aktivität hatten, kann dies bedeuten, dass nicht nur die  $Na^+$ -Kanäle (Remy et al. 2003a und b) sondern mehrere Zielstrukturen der AED im pharmakoresistenten Gewebe verändert sind.

Anhand der aktuellen Literatur sind auch neue Ansätze zur Erklärung der Pharmakoresistenz zu bedenken. Fang und Kollegen nehmen an, dass mehrere Mechanismen zum Auslösen epileptischer Anfälle führen können, die durch Angriffspunkte der bislang erhältlichen Antiepileptika nicht adressiert sind. So soll die Formierung eines aberranten neuronalen Netzwerks im Rahmen der chronischen Epilepsie für die Pharmakoresistenz (mit-) verantwortlich sein (Fang et al. 2010).

#### **4.4. Verapamil (VPM) und Probenecid (PBN) verändern die induzierte epileptiforme Aktivität.**

In der vorliegenden Arbeit wird versucht den Beitrag der parenchymal exprimierten Transportproteine PGP und MRP zur In-vitro-Pharmakoresistenz zu ermitteln. Deshalb ist von Interesse, ob die Blockierung dieser Transportproteine durch VPM und PBN die induzierte Aktivität verändern kann.

In den ersten 20 Minuten der kombinierten Gabe von VPM und PBN (MDTI) besteht die Hauptwirkung in einer Musteränderung von SLE zu IIS (31% der 32 Gewebeschnitte mit SLE). Für die Gruppe der SLE, die 40 Minuten mit MDTI allein behandelt wurden ( $n = 10$ ) war in der Zeit von 20-40 Minuten einmal eine Suppression und einmal eine zusätzliche Musteränderung zu IIS zu beobachten. Gewebeschnitte mit IIS waren bis zu 40 Minuten resistent.

MDTI alleine verändern also das Muster der induzierten SLE und können sie sogar, wenn auch selten, unterdrücken. Die Modulationen der Parameterwerte resistenter SLE waren stärker als in den Kontrolluntersuchungen. Da in den Kontrolluntersuchungen keine Musteränderung auftrat, obwohl  $[K^+]_{\min}$  wie im Falle der MDTI-Applikation um  $\sim 0,5$  mM angestiegen ist, muss angenommen werden, dass die Effekte der MDTI nicht auf eine Erhöhung der  $[K^+]$  zurückzuführen sind. PBN und VPM können im resezierten humanen Temporale Kortex chronisch epileptischer Patienten antikonvulsive Eigenschaften besitzen (Straub et al. 1996). Weiterhin reduziert VPM im Penicillin-Modell signifikant die induzierten Anfallsereignisse (Speckmann et al. 1989). Aus den beschriebenen Experimenten sind jedoch weder die zugrunde liegenden Mechanismen ersichtlich, noch lässt sich klären, ob die Blockierung von PGP oder MRP die Veränderung der epileptiformen Aktivität in den von uns durchgeführten Experimenten vermittelt. Hier sind weitere Untersuchungen zur Differenzierung der Effekte notwendig.

#### **4.5. Die zusätzliche Blockierung der Transport-Proteine PGP und MRP durch VPM und PBN in der Koapplikations-Phase „verstärkt“ die Effekte der AED.**

Werden Antikonvulsiva und MDTI koappliziert, zeigt sich im Wesentlichen eine Zunahme der Musteränderungen von SLE zu IIS (Koapplikation 37% vs. AED 12%,

Koapplikation 44% vs. MDTI 27%). Die Zunahme der Musteränderungen bei Präinkubation mit AED entspricht der bereits diskutierten Wirkung der MDTI, also einer additiven Wirkung von AED und MDTI. Auch bei Präinkubation mit MDTI könnte eine additive Wirkung von MDTI und AED vorliegen. Letzteres würde auf einen AED-Effekt hinweisen, der in Gegenwart von bereits gehemmten Transportproteinen abläuft. Ob die Veränderung des Aktivitätsmusters (Zunahme der Gewebeschnitte mit IIS) durch Koapplikation in vivo Auswirkungen auf die Anfallshäufigkeit haben könnte, ist unbekannt.

Eine Suppression der induzierten Aktivität nach Koapplikation ist selten und betrifft vorwiegend Gewebeschnitte, die IIS generieren (IIS 33.3% von n = 30 vs. SLE 3.9% von n = 76). Der bei Gültigkeit der Transporter-Hypothese zu erwartende Effekt eines hohen Anteils supprimierter Aktivität unter Koapplikation blieb aus, obwohl in einem beachtlichen Anteil (57%) fluorometrisch getesteter Gewebeschnitte (aus der gleichen Stichprobe pharmakoresistenter Patienten) eine Hemmung der Transportproteine PGP und/oder MRP durch Verapamil und/oder Probenecid hochwahrscheinlich ist (Kovács et al. 2011). Die Modulation der Aktivitätsparameter resistenter SLE (Zunahme der Ereignisrate, Amplitudendepression, Verkürzung der Dauer und der resultierenden Reduktion von  $[K^+]_{max}$  und  $\Delta[K_+]$ ) ist signifikant stärker als unter AED oder MDTI allein und entspricht numerisch ebenfalls einer additiven Wirkung von AED und MDTI.

Die Tatsache, dass nach Koapplikation von AED und MDTI in vitro (bei Hemmung der Aktivität von PGP und MRP) pharmakoresistente Aktivität in deutlich geringeren Anteilen der Gewebeschnitte (56% IIS, 58% SLE) als nach AED bestehen bleibt, bestätigt einen „antikonvulsiven“ Effekt der MDTI. Ein Beitrag der ektop exprimierten Transportproteine zur In-vitro-Pharmakoresistenz ist nicht auszuschließen. Funktionelle Studien in vivo hatten bereits einen deutlichen antikonvulsiven Effekt der Koapplikation von AED und einem MDTI gezeigt (Brandt et al. 2006, van Vliet et al. 2006). Auch in einigen Fallstudien wirkte VPM als „Add-on“ zur antikonvulsiven Therapie mit gängigen Antiepileptika antikonvulsiv (Ianetti et al. 2005, Ianetti et al. 2009, Schmitt et al. 2010). Aber es muss offen bleiben, ob die „antikonvulsive Wirkung“ im humanen chronisch epileptischen Gewebe durch die Blockierung der Transportproteine und/oder durch „unspezifische Effekte“ von VPM (z. B. Blockierung von Kalziumkanälen) und PBN zustande kommt.

Hier bleibt noch zu erörtern, dass Musteränderungen der induzierten krampf-artigen Aktivität nach Auswaschen der AED und MDTI und nach Auswaschen der MDTI in Experimenten mit Langzeitapplikation von MDTI allein in insgesamt 29% der 99 untersuchten Gewebeschnitte irreversibel sind. Die Anteile sind bei kürzerem Kontakt mit MDTI (PI AED: 20 Minuten MDTI, 25.4%) etwas kleiner als bei längerem Kontakt mit MDTI (PI MDTI: 40 Minuten, 38.1%) und

bei Langzeit-Applikation von MDTI allein (40%). In Experimenten mit Langzeit-Applikation von AED und Kontroll-Untersuchungen ohne Substanzapplikation betrug der Anteil 0 %. Deshalb wird danach gefragt, ob VPM und/oder PBN zu einer bleibenden Schädigung des Gewebes geführt haben könnten.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Hinweise: PBN verstärkt die Apoptose striataler Neurone bei Koapplikation mit 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Lau et al. 1990, Petroske et al. 2001). PBN reduziert (Franco und Cidlowski 2006) bzw. stimuliert den während der Apoptose zu beobachtenden Efflux von Glutathion (Hammond et al. 2007). Für VPM dominieren Studien, die einen neuro-protectiven Effekt belegen (Irita et al. 1986; Liu et al. 2011; Sarang et al. 2002). Nur eine einzelne Studie beschreibt, dass VPM eine Dosis- und Zeit-abhängige Neurodegeneration kultivierter kortikaler Neurone bewirkt (Zhu et al. 1997).

Zusammengefasst lässt sich anhand der vorhandenen Literatur keine eindeutige Bestätigung dafür finden, dass die ausbleibende Erholung der epileptiformen Aktivität durch eine pro-apoptotische Wirkung von VPM und PBN bedingt ist. Die Tatsache, dass in dieser Studie nach Auswaschen des epileptogenen Perfusionsmediums die reiz-evozierten Feldpotentiale in allen Behandlungsgruppen gut erhalten waren, spricht gegen eine bleibende Schädigung des Gewebes durch die MDTI.

#### **4.6. Zwischen CBZ, VPA und PHT bestehen keine Unterschiede hinsichtlich der Substrateigenschaften für PGP und MRP.**

Die dargestellten Ergebnisse weisen aus, dass keines der untersuchten AED unter Koapplikation mit PBN und VPM die krampfartige Aktivität bevorzugt beeinflusst. Deshalb ist anzunehmen, dass zwischen CBZ, VPA und PHT keine Unterschiede hinsichtlich der Substrateigenschaften für PGP und MRP bestehen. In der vorliegenden Literatur gibt es diesbezüglich verschiedene Aussagen. In einem In-vivo-Microdialyse-Modell wurde CBZ als Substrat von PGP und MRP postuliert (Potschka et al. 2001). Auch für PHT ließ sich der Transport durch PGP und MRP im Rahmen dieses Modells nachweisen (Potschka und Löscher 2001a, b). Weitere Untersuchungen an Ratten definierten PHT als Substrat von MRP 2 (Potschka et al. 2003) und PGP (Potschka et al. 2004, Van Vliet et al. 2007).

Baltes und Kollegen zeigten 2007 erstmals, dass die Substraterkennung von PGP zwischen Mensch und Tier unterschiedlich sein muss. So wurden PHT und LEV von Maus-PGP transportiert, jedoch nicht vom humanen Äquivalent. CBZ wurde von keinem der geprüften Proteine transportiert und keines der anderen AED von MRP2 (Baltes et al. 2007a). Weitere Studien berichten, dass CBZ und VPA nicht von humanen MRP1, MRP2 oder MRP5 transportiert werden (Baltes et al. 2007b, Lunas-Tortós et al. 2010). Allerdings wurde für VPA ein unspezifischer Transport, der durch PBN und MK 671 blockierbar ist, gezeigt (Lunas-Tortós et al. 2010).

Die von mir dargelegten Befunde lassen darauf schließen, dass für die geprüften AED VPA, CBZ und PHT kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Substrat-Eigenschaften für humanes PGP und MRP besteht.

#### **4.7. Spike-artige Aktivität ist sensitiver auf Antikonvulsiva bzw. Koapplikation von AED und MDTI als die krampfartige Aktivität.**

Die spike-artige Aktivität (IIS) wird durch AED alleine bzw. durch Koapplikation von AED und MDTI öfter supprimiert (20% bzw. 33%) als die krampf-artige Aktivität (SLE) (7% bzw. 4%) und zeigt sich damit sensitiver für Antikonvulsiva und die Koapplikation von AED und MDTI als die krampf-artige Aktivität. In Tiermodellen wurden gegenteilige Ergebnisse dokumentiert. So konnte in mehreren Studien an Gewebeschnitten von Ratten gezeigt werden, dass die durch 4-Aminopyridin (4-AP) im entorhinalen Kortex induzierte inter-iktal-artige Aktivität im Gegensatz zu anfalls-artiger Aktivität resistent gegenüber CBZ, VPA und Topiramate (TPM) bzw. PHT, Phenobarbital (PHB) und Pentobarbital (PB) war (D'Antuono et al. 2010, Brückner und Heinemann 2000). Dieser mit 4-AP induzierte Typ epileptiformer Aktivität wurde deshalb als „Modell für pharmakoresistente Aktivität“ postuliert.

Unser Ergebnis, dass am humanen resezierten chronisch epileptischen Gewebe periodische spike-artige Aktivität sensitiver auf AED bzw. Koapplikation von AED und MDTI reagiert, scheint also im Widerspruch zu o.g. Studienergebnissen zu stehen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es sich bei der mit 8 mM  $[K^+]$  und 50  $\mu$ M Bicucullin induzierten spike-artigen Aktivität um eine „inter-iktal-artige“ Aktivität handelt. Im Gegensatz zu den oben zitierten Studien ist die periodische spike-artige Aktivität in der vorliegenden Arbeit nicht durch zwischenzeitliches Auftreten krampf-artiger Aktivität unterbrochen. In einer Studie an Patienten

mit pharmakoresistenter Epilepsie zeigte sich die anhand von Streifen-, Grid- und Tiefenelektroden gemessene Spike-Rate inter-iktaler Aktivität (quantifiziert als Spikes pro Stunde) nach Absetzen der Antikonvulsiva vermindert (Spencer et al. 2008). Eine entsprechende Zusatzanalyse der spike-artigen Aktivität in der hier vorliegenden Arbeit ergibt, dass die Ereignisrate dieser Aktivität nach Gabe der AED bzw. Gabe der AED und MDTI abnimmt und nach Auswaschen der Medikamente wieder ansteigt. Die Frage, ob es sich bei der in der vorliegenden Arbeit induzierten spike-artigen Aktivität um ein Äquivalent der interiktalen Aktivität handelt, müsste – wie bereits unter 4.2.1 erörtert – durch entsprechende Zusatzuntersuchungen unter Einbeziehung histopathologischer und präklinischer Analysen geklärt werden.

#### **4.8. Patienten-orientierte Beziehungen zwischen verfügbaren klinischen Daten und in vitro erhobenen Befunden**

*4.8.1. Die Befunde zu Gewebe- und Serumkonzentration der Antiepileptika im untersuchten Patientenkollektiv schließen eine an der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte Pharmakoresistenz nicht aus.*

Insgesamt korrelieren die normierten AED-Konzentrationen in Gewebe und Serum positiv. Fünf der untersuchten 18 Patienten (das sind 27%) zeigten im Vergleich zum Serum eine sehr niedrige Gewebekonzentration. Diese Differenz wäre zum Beispiel durch MDT, die die Diffusion der AED aus dem Blut in das Hirngewebe behindern, zu erklären. Eine separate Untersuchung der Patientendaten und der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen im Gewebe dieser fünf Patienten ergab keine Unterschiede im Vergleich zu den anderen Patienten dieser Stichprobe. Eine Präidentifikation im diagnostischen Vorfeld ist also unwahrscheinlich.

In Tierstudien ist ein signifikant niedrigeres Gewebe-Serumverhältnis der AED in chronisch epileptischen Spezimen gegenüber Kontrollen beschrieben (Liu et al. 2007). Wie bereits in 4.6. diskutiert, sind beim Vergleich von Befunden zur Transportfunktion der MDT Spezies-abhängige Unterschiede zu berücksichtigen.

Da 27% der untersuchten Patienten nicht übersehen werden dürfen, aber von einer kleinen Stichprobe stammen, erscheint es sinnvoll, in vergleichbaren Studien immer die Serum- und Gewebe-Konzentration der AED zu erfassen, um gültige Aussagen machen zu können.

#### *4.8.2. Das Gewebe von 74% der Patienten ist pharmakoresistent.*

Applikation von AED (20 Minuten) verursachen überwiegend keine Veränderungen des Musters induzierter Aktivität (74%). Nur bei einem kleineren Teil der Patienten waren Übergang von SLE zu IIS (16%) und selten eine Suppression (10%) nach 20 Minuten zu beobachten. Es gibt keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Patientenkollektiven für die qualitativ unterschiedlichen Effekte.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits für 81% der Gewebeschnitte nachgewiesene und diskutierte Pharmakoresistenz gegenüber CBZ, VPA und PHT.

Der geringfügige Unterschied zwischen den Anteilen resistenter Gewebeschnitte und resistenter Patienten ist durch die Heterogenität der Effekte in den Gewebeschnitten einiger Patienten bedingt. Es ist zu berücksichtigen, dass in den Gewebeschnitten eines Patienten mit mehreren Gewebeschnitten in der Analyse nur einer der Schnitte mit Veränderung zu IIS auf die AED-Applikation reagiert und der Patient deshalb in die Kategorie „Mix mit Veränderung zu IIS“ fällt. Trotzdem ergibt sich in 74% der *in vitro* untersuchten Gewebeproben eine homogene Resistenz gegenüber den AEDs.

#### *4.8.3. Die Koapplikation von AED und MDTI bewirkt bezogen auf die Patienten einen größeren Anteil von Veränderungen der Aktivität – Hinweise für einen Beitrag der MRP zur Vermittlung der Pharmakoresistenz?*

Im Vergleich zur Applikation von AED oder MDTI allein reagierten nach zusätzlichen 20 Minuten Koapplikation von AED und MDTI mehr Patienten mit Veränderungen (21% vs. 58%,  $p = 0.011$ , abhängige Stichproben, McNemar-Test). Das trifft auch bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Veränderungen zu (Suppression 2.6% vs. 15.4% der Patienten, Übergang von SLE in IIS 17.9% vs. 38.5% und keine Veränderung 79.5% vs. 46.2%,  $p = 0.025$ , abhängige Stichproben, McNemar-Test). Für die Koapplikation ergaben sich keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den beiden Patientengruppen mit unterschiedlichen Behandlungsprotokollen (Präinkubation mit AED vs. Präinkubation mit MDTI).

Abweichend von der für SLEs in 57.9% der Gewebeschnitte bestehenden Resistenz gegenüber der Koapplikation zeigt sich nun ein kleinerer Prozentsatz resistenter Patienten von 46.6%. Im Rahmen der Betrachtungen auf Patientenebene existiert ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen alleiniger AED- und MDTI-Applikation und Koapplikation. Die Effektivität der

Koapplikation ist in Bezug auf Veränderungen der epileptiformen Aktivität höher als die der AED oder MDTI. Die klinischen Daten der Patienten mit qualitativ unterschiedlichen Veränderungen dokumentieren, dass Resistenz auf Koapplikation bei neurochirurgisch indizierten Operationen nicht zu beobachten ist und Veränderungen zu IIS bei Patienten mit hohen Anfallsfrequenzen auftreten. Wie bereits bei den Aktivitätsveränderungen der Gewebeschnitte diskutiert, ist die Beteiligung der Transportproteine an der Pharmakoresistenz nicht auszuschließen, aber aufgrund der möglichen antikonvulsiven Effekte von VPM und PBN nicht zu beweisen.

#### *4.8.4. Heterogene Effekte im Gewebe eines Patienten – Ausdruck einer nicht homogenen „Verteilung“ von Pharmakoresistenz im chronisch epileptischen Gewebe?*

Sowohl für die Effekte der AED als auch für die Koapplikation zeigten sich im Gewebe der Patienten, von denen mehr als ein Gewebeschnitt untersucht wurde, zum Teil heterogene Effekte. Hinsichtlich der Patientendaten ist zu betonen, dass bei Koapplikation heterogene Effekte signifikant häufiger in Gewebe von jüngeren Patienten und von Patienten mit hoher Anfallsfrequenz auftraten.

Die Heterogenität der Effekte von AED in verschiedenen Gewebeschnitten eines Patienten führt zu der Frage, ob die Pharmakoresistenz im Kortex des Temporallappens von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie „gleichförmig verteilt“ ist. Einleitend wurde davon ausgegangen, dass aufgrund der nach einer Resektion häufig wieder hergestellten Pharmakosensitivität das resezierte Gewebe pharmakoresistent sei oder in diesem Gewebe dominante Mechanismen zur Vermittlung der Pharmakoresistenz lokalisiert sein könnten (Kim et al. 2005, Schmidt et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies teilweise, zeigen jedoch auch, dass nicht alle Gewebeschnitte eines Patienten gleich reagieren. Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits für die Effekte von CBZ im Gyrus dentatus Ähnliches berichtet (Jandova et al. 2006). Die hier vorgelegten Ergebnisse im Temporalen Kortex zeigen erstmalig, dass im Rahmen der Temporalpolteilresektion (TLTR) auch Gewebe entfernt wird, das nicht nur auf Antikonvulsiva sondern insbesondere auf Koapplikation von AED und MDTI sowohl pharmakoresistent als auch pharmakosensitiv reagiert. Ursache und Bedeutung der heterogenen Verteilung der Pharmakoresistenz sind unklar. Eine molekularbiologische, genetische und histopathologische Untersuchung des untersuchten pharmakoresistenten und pharmakosensitiven Gewebes eines



Patienten könnte bei der weiteren Aufklärung von Mechanismen der Pharmakoresistenz von großem Nutzen sein. Der Befund, dass Heterogenität von Effekten der Koapplikation signifikant häufiger in Gewebe von jüngeren Patienten und von Patienten mit hoher Anfallsfrequenz auftrat, impliziert die Frage, ob die „Heterogenität“ eine Momentaufnahme in der Entwicklung der Pharmakoresistenz darstellt und/oder einen besonderen Mechanismus der Pharmakoresistenz charakterisiert.

## 5. Literaturverzeichnis

- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK.* Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res* 1971; 13 (2): 208 – 221.
- Annegers JF, Rocca WA, Hauser WA.* Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 570 – 575.
- Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, et al.* Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45 (5): 441 – 451.
- Bäckström P, Hyytiä P.* Attenuation of cocaine-seeking behaviour by the AMPA/kainite receptor antagonist CNQX in rats. *Psychopharmacology* 2003; 166 (1): 69 – 76.
- Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, et al.* Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glykoprotein. *Neuropharmacology* 2007; 52 (2): 333 – 346. (a)
- Baltes S, Fedrowitz M, Tortós CL, et al.* Valproic acid is not a substrate for P-glykoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320 (1): 331 – 343. (b)
- Beck H.* Plasticity of antiepileptic drug targets. *Epilepsia* 2007; 48 Suppl 1: 14 – 18.
- Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, et al.* Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* 2000; 11 (11): 1471 – 1476.
- Ben-Ari Y.* Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; 14 (2): 375 – 403.
- Benbadis SR.* Epileptic seizures and syndromes. *Neurol Clin* 2001; 19 (2): 251 – 270.
- Bleakman D, Lodge D.* Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 1998; 37 (10-11): 1187 – 1204.
- Böhme I, Lüddens H.* Zielstrukturen für Antiepileptika. *Pharm Unserer Zeit* 2007; 36: 262 – 268.
- Borck C, Jefferys JG.* Seizure-like events in disinhibited ventral slices of adult rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1999; 82 (5): 2130 -2142.
- Boulis NM, Kehne JH, Miserendino MJ, et al.* Differential blockade of early and late components of acoustic startle following intrathecal infusion of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) or D,L-2-amino-5-phosphoaleric acid (AP-5). *Brain Res* 1990; 520 (1-2): 240 – 246.

- Brandt C, Bethmann K, Gastens AM, et al.* The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2006; 24 (1): 202 – 211.
- Brodie MJ.* Drug interactions in epilepsy. *Epilepsia* 1992; 33 Suppl 1: 13 – 22.
- Brodie MJ, Dichter MA.* Antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 1996; 334 (3): 168 – 175.
- Brodmann K.* Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. Leipzig 1909: J.A: Barth.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, et al.* Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 1998; 4 (10): 1166 – 1172.
- Brückner C, Heinemann U.* Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res* 2000; 859 (1): 15 – 20.
- Butler D.* Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. *Nature* 2005; 438 (7064): 6.
- Campbell AM, Holmes O.* Bicuculline epileptogenesis in the rat. *Brain Res* 1984; 323 (2): 239 – 246.
- D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR.* Differential role of KIR channel and Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-pump in the regulation of extracellular K<sup>(+)</sup> in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 2002; 87 (1): 87 – 102.
- D'Antuono, Köhling R, Ricalzone S, et al.* Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia* 2010; 51 (3): 423 – 431.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R.* The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11 (7): 1156 – 1166.
- Declèves X, Regina A, Laplanche JL, et al.* Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2000; 60 (5): 594 – 601.
- De Curtis M, Avanzini G.* Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 2001; 63 (5): 541 – 567.
- De Moura JC, Tirapelli DP, Neder L, et al.* Amygdala gene expression of NMDA and GABA(A) receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2010; doi: 10.1002/hipo.20863. [Epub ahead of print].
- Dichter MA.* Old and new mechanisms of antiepileptic drug actions. *Epilepsy Res Suppl* 1993; 10: 9 – 17.

- Dietzel I, Heinemann U, Lux HD.* Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrode and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 1989; 2 (1): 25 – 44.
- Ding SL, van Hoesen GW, Cassel MD, et al.* Parcellation of human temporal polar cortex: A combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic and pathological markers. *J Comp Neurol* 2009; 514 (6): 595 – 623.
- Dlugos DJ.* The early identification of candidates for epilepsy surgery. *Arch Neurol* 2001; 58 (19): 1543 – 1546.
- Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, et al.* Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42 (12): 1501 – 1506.
- Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, et al.* Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review. *Neurology* 1987; 37 (33): 379 – 385.
- Economo C, Koskinas GN.* Die Zytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. Wien 1925: Springer Verlag.
- Eder HG, Jones DB, Fisher RS.* Local perfusion of diazepam attenuates interictal and ictal events in the bicuculline model of epilepsy in rats. *Epilepsia* 1997; 38 (5): 516 – 521.
- Ellerkmann RK, Remy S, Chen J, et al.* Molecular and functional changes in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience* 2003; 119 (2): 323 – 333.
- Engel J Jr.* Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 2001; 7 (4): 340 – 352.
- Epsztein J, Represa A, Jorquera I, et al.* Recurrent mossy fibers establish aberrant kainite receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci* 2005; 25 (36): 8229 – 8239.
- Escayg A, Goldin AL.* Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia* 2010; 51 (9): 1650 – 1658.
- European Federation of Neurological Societies Task Force.* Pre-surgical evaluation for epilepsy surgery – European Standards. *Eur J Neurol* 2000; 7 (1): 119 – 122.
- Fang M, Xi ZQ, Wu Y, et al.* A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis. *Med Hypotheses* 2011; 76 (6): 871 – 876.
- Feldberg W, Sherwood SL.* Effects of calcium and potassium injected into the cerebral ventricles of the cat. *J Physiol* 1957; 139 (3): 408 – 416.

- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46 (4): 470 – 472.
- Fountain NB.* Manual of antiepileptic drug therapy. Charlottesville (VA): University of Virginia. 2002.
- Franco R, Cidlowski JA.* SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281 (40): 29542 – 29557.
- Fröhlich F, Bazhenov M, Iragui-Madoz V, et al.* Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights in an old topic. *Neuroscientist* 2008; 14 (5): 422 – 433.
- Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, et al.* Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 2004; 24 (46):10416 – 10430.
- Hammond CL, Marchan R, Krance SM, et al.* Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* 2007; 282 (19): 14337 – 14347.
- Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA.* Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 578 – 586.
- Heinemann U, Hamon B.* Calcium and epileptogenesis. *Exp Brain Res* 1986; 65 (1): 1 – 10.
- Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ.* Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res* 1977; 27 (3 – 4): 237-243.
- Heinemann U.* Basic mechanisms of partial epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2004; 17 (2): 155 – 159.
- Hitiris N, Mohanraj R, Noriie J, et al.* Predictors of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2007; 75 (2-3): 192 – 196.
- Hosford DA, Crain BJ, Bonhaus DW, et al.* Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus. *J Neurosci* 1991; 11 (2): 428 – 434.
- Hwa GG, Avoli M, Oliver A, et al.* Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp Brain Res* 1991; 83 (2): 329 – 339.

- Ianetti P, Spalice A, Parisi P.* Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus. *Epilepsia* 2005; 46 (6): 967 – 969.
- Ianetti P, Parisi P, Spalice A, et al.* Addition of verapamil in the treatment of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsy Res* 2009; 85 (1): 89 – 95.
- Irita K, Fujita I, Takeshige K, et al.* Calcium channel antagonist induced inhibition of superoxide production in human neutrophils. Mechanisms independent of antagonizing calcium influx. *Biochem Pharmacol* 1987; 35 (20): 3465 – 3471.
- Isaev D, Isaeva E, Khazipov R, et al.* Anticonvulsant action of GABA in the high potassium-low magnesium model of ictogenesis in the neonatal rat hippocampus in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* 2005; 94 (4): 2987 – 2992.
- Jandova K, Päsler D, Antonio LL, et al.* Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* 2006; 129 (Pt 12): 3290 – 3306.
- Jones RS.* Epileptiform events induced by GABA-antagonists in entorhinal cortical cells in vitro are partly mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 1988; 457 (1): 113 – 121.
- Keinänen K, Wisden W, Sommer B, et al.* A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 1990; 249 (4968): 556 – 560.
- Kann O, Kovacs R, Njunting M, et al.* Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. *Brain* 2005; 128 (Pt 10): 2396 – 2407.
- Kim YD, Heo K, Park SC, et al.* Antiepileptic drug withdrawal after successful surgery for intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46 (2): 251 – 257.
- Klüver H, Bucy P.* „Psychic blindness“ and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 1937; 119: 352 – 353.
- Kofuji P, Newman EA.* Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 2004; 129 (4): 1045 – 1056.
- Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, et al.* Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 2002; 88 (6): 2909 – 2918.
- Kovács R, Raue C, Gabriel S, et al.* Functional testing of multidrug transporter activity in hippocampal-neocortical brain slices from epileptic patients. *J Neurosci Methods* Jul 7 2011 [Epub ahead of print].

- Kubota H, Ishihara H, Langmann T, et al.* Distribution and functional activity of P-glykoprotein and multidrug resistance associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2006; 68 (3): 213 – 228.
- Kwan P, Brodie MJ.* Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 342 (5): 314 – 319.
- Lambert JD, Jones RS.* A reevaluation of excitatory amino acid-mediated synaptic transmission in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 1990; 64 (1): 119 – 132.
- Landmark CJ.* Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Med Sci Monit* 2007; 13(1): 1 – 7.
- Lau YS, Trobough KL, Crampton JM, et al.* Effects of probenecid on striatal dopamine depletion in acute and long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Gen Pharmacol* 1990; 21 (2): 181 – 187.
- Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, et al.* ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48 Suppl 5: 140 – 149.
- Lee G, Dallas S, Hong M, et al.* Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4): 569 – 596.
- Librizzi L, de Curtis M.* Epileptiform discharges are prevented by periodic interictal spiking in the olfactory cortex. *Ann Neurol* 2003; 53 (3): 382 – 389.
- Liu X, Yang Z, Yang J, et al.* Increased P-glykoprotein expression and decreased phenobarbital distribution in the brain of pentylenetetrazole-kindled rats. *Neuropharmacology* 2007; 53 (5): 657 – 663.
- Liu Y, Lo YC, Qian L, et al.* Verapamil protects dopaminergic neuron damage through a novel anti-inflammatroy mechanism by inhibition of microglial activation. *Neuropharmacology* 2011; 60 (2-3): 373 – 380.
- Löscher W, Schmidt D.* New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. *Epilepsy Res* 2004; 60 (2 – 3): 77 – 159.
- Löscher W, Potschka H.* Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005; 76 (1): 22 – 76.
- Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, et al.* Selective alterations in GABA(A) receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2000; 20 (40): 5401 – 5419.
- Lüllmann-Rauch R.* Schichten des Isokortex. In: Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2006: 192.

- Lunas-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W.* Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glykoprotein. *Neuropharmacology* 2008; 55 (8): 1364 – 1375.
- Lux HD, Neher E.* The equilibration time course of (K<sup>+</sup>)<sub>o</sub> in cat cortex. *Exp Brain Res* 1973; 17 (2): 190 – 205.
- Macdonald RL, Kelly KM.* Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 1993; 34 Suppl 5: 1 – 8.
- Mantegazza M, Rusconi R, Scalmani P, et al.* Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully, back again. *Epilepsy Res* 2010; 92 (1): 1 – 29.
- Marchi N, Guiso G, Rizzi M, et al.* A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxyl-5H-dibenzo(b,f)azepine-carboxamide and MDR 1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine. *Epilepsia* 2005; 46 (10): 1613 – 1619.
- Marcus HJ, Carpenter KL, Price SJ, et al.* In vivo assessment of high-grade glioma biochemistry using microdialysis: a study of energy-related molecules, growth factors and cytokines. *J Neurooncol* 2010; 97 (1): 11 – 23.
- Mason RM.* Studies on the effect of probenecid (benemid) in gout. *Ann Rheum Dis* 1954; 13 (2): 120 – 130.
- McLean MJ, McDonald RL.* Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapid firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238 (2): 727 – 738.
- Meldrum BS, Horton RW.* Convulsive effects of 4-deoxypridoxine and of bicuculline in photosensitive baboons (*Papio papio*) and in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain Res* 1971; 35 (2): 419 – 36.
- Mody I, Heinemann U.* NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature* 1987; 326 (6114): 701 – 704.
- Morisett RA, Chow C, Nadler JV, et al.* Biochemical evidence for enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate in the hippocampal formation of kindled rats. *Brain Res* 1989; 496 (1-2): 25 – 28.
- Nadler JV.* Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 1981; 29 (20): 2031 – 2042.
- Neels HM, Sierens AC, Naelerts K, et al.* Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42 (11): 1228 – 1255.
- Németh H, Robotka H, Kis Z, et al.* Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol-induced seizures. An electrophysiological and behavioural study. *Neuropharmacology* 2004; 47 (6): 916 – 925.



- Németh H, Toldi J, Vécsei L.* Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2 (3): 249 – 260.
- Ogata N, Katsuda N.* The correlation between extracellular potassium concentration and hippocampal activity in vitro. *Brain Res* 1976; 110 (2): 371 – 375.
- Olson IR, Plotzker A, Youssef E.* The enigmatic temporal pole: a review of findings on social and emotional processing. *Brain* 2007; 130: 1718 – 1731.
- Palmer GC, Stagnitto ML, Ray RK, et al.* Anticonvulsant properties of calcium channel blockers in mice: N-methyl-D-,L-aspartate- and Bay K 8644-induced convulsions are potently blocked by dihydropyridines. *Epilepsia* 1993; 34 (2): 372 – 380.
- Panuccio G, D'Antuono M, De Guzman P, et al.* In vitro ictogenesis and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2010; 39 (3) 372 – 380.
- Patrylo PR, Schweitzer JS, Dudek FE.* Potassium-dependent prolonged field bursts in the dentate gyrus: effects of extracellular calcium and amino acid receptor antagonists. *Neuroscience* 1994; 61 (1): 13 – 19.
- Petroske E, Meredith GE, Callen S, et al.* Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/Probenecid treatment. *Neuroscience* 2001; 106 (3): 589 – 601.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W.* P-glykoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport* 2001; 12 (16): 3557 – 3560.
- Potschka H, Löscher W.* Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport* 2001; 12 (11): 2387 – 2389. (a)
- Potschka H, Löscher W.* In vivo evidence for P-glykoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia* 2001; 42 (10): 1231 – 1240. (b)
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W.* Multidrug resistance protein MRP2 contributes to the blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306 (1): 124 – 131.
- Potschka H, Volk HA, Löscher W.* Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glykoprotein in kindled rats. *Neuroreport* 2004; 15 (10): 1657 – 1661.
- Regesta G, Tanganelli P.* Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res* 1999; 34 (2 – 3): 109 – 122.
- Remy S, Gabriel S, Urban BW, et al.* A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53 (4): 469 – 479. (a)

- Remy S, Urban BW, Elger CE, et al.* Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci* 2003; 17 (12): 2648 – 2658. (b)
- Remy S, Beck H.* Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 2006; 129 (pt 1): 18 – 35.
- Rogan AM, Hamilton TC, Young RC, et al.* Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 1984; 224 (4652): 994 – 996.
- Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D.* Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus. *J Neurophysiol* 1985; 54 (4): 1363 – 1374.
- Sarang SS, Yoshida T, Cadet R, et al.* Discovery of molecular mechanisms of neuroprotection using cell-based bioassays and oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2002; 11 (2): 45 – 52.
- Schmidt D, Baumgartner C, Löscher W.* Seizure recurrence after planned discontinuation of antiepileptic drugs in seizure-free patients after epilepsy surgery: a review of current clinical experience. *Epilepsia* 2004; 45 (2): 179 – 186.
- Schmitt FC, Dehnicke C, Merschhemke M, et al.* Verapamil attenuates the malignant treatment course in recurrent status epilepticus. *Epilepsy Behav* 2010; 17 (4): 565 – 568.
- Scism JL, Powers KM, Artru AA, et al.* Probenecid-inhibitable efflux transport of valproic acid in the brain parenchymal cells of rabbits: a microdialysis study. *Brain Res* 2000; 884 (1 – 2): 77 – 86.
- Selzer ME.* The Action of phenytoin on a composite electrical-chemical synapse in the lamprey spinal cord. *Ann Neurol* 1978; 3 (3): 202 – 206.
- Shneker BF, Fountain NB.* Epilepsy. *Dis Mon* 2003; 49 (7): 426 – 478.
- Sirotnak FM, Moccio DM, Hancock CH, et al.* Improved methotrexate therapy of murine tumors obtained by probenecid-mediated pharmacological modulation at the level of membrane transport. *Cancer Res* 1981; 41 (10): 3944 – 3949.
- Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, et al.* Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet* 2001; 357 (9249): 42 – 43.
- Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, et al.* Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 2002; 125 (Pt 1): 22 – 31.
- Söderpalm B.* Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *Eur J Pain* 2002; 6 *Suppl A*: 3 – 9.

- Somjen GG.* Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist* 2002; 8 (3): 254 – 267.
- Speckmann EJ, Walden J, Bingmann D.* Functional implication of calcium ions in epileptic seizures. Antiepileptic effects of organic calcium antagonists. *Arzneimittelforschung* 1989; 39 (1A): 149 – 156.
- Spencer SS.* Depth electrodes. *Epilepsy Res* 1992; Suppl 5: 3 – 13.
- Spencer SS, Kim J, DeLanerolle N, et al.* Differential neuronal and glial relations with parameter of ictal discharge in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999; 40 (6): 708 – 712.
- Spencer SS, Goncharova II, Duckrow RB, et al.* Interictal spikes on intracranial recording: behavior, physiology, and implications. *Epilepsia* 2008; 49 (11): 1881 – 1892.
- Stefan H, Fröscher W, Krämer G, Schmidt D.* 2000 Drug therapy before and after surgery for epilepsy. Critical review and recommendations. *Nervenarzt* 71 (6): 451 – 458.
- Straub H, Köhling R, Lüke A, et al.* The effects of verapamil and flunarizine on epileptiform activity induced by bicuculline and low Mg<sup>2+</sup> in neocortical tissue of epileptic and primary non-epileptic patients. *Brain Res* 1996; 733 (2): 307 – 311.
- Streit AK, Derst C, Wegner S, et al.* RNA editing of Kv1.1 channels may account for reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2011; 52 (3): 645 – 648.
- Summers MA, Moore JL, McAley JW.* Use of verapamil as a potential P-glykoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Ann Pharmacother* 2004; 38 (10): 1631 – 1634.
- Tanriverdi T, Olivier A, Poulin N, et al.* Long-term seizure outcome after mesial temporal lobe surgery: cortical amygdalohippocamectomy versus selective amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg* 2008; 108 (3): 517 – 524. (a)
- Tanriverdi T, Poulin N, Olivier A.* Life 12 years after temporal lobe epilepsy surgery: a long term, prospective clinical study. *Seizure* 2008; 17 (4): 339 – 349. (b)
- Taylor DL, Urenjak J, Zilkha E, et al.* Effects of probenecid on the elicitation of spreading depression in the rat striatum. *Brain Res* 1997; 764 (1 – 2): 117 – 125.
- Timcheva CV, Todorov DK.* Does verapamil help overcome multidrug resistance in tumor cell lines and cancer patients? *J Chemother* 1996; 8 (4): 295 – 299.
- Tolner EA, Frahm C, Metzger R, et al.* Synaptic responses in superficial layers of medial entorhinal cortex from rats with kainate-induced epilepsy. *Neurobiol Dis* 2007; 26: 419 – 438.

- Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, et al.* Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 1995; 15(4): 3110 – 3117.
- Turner DA, Adamson DC.* Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70 (3): 167 – 176.
- Van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, et al.* Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46 (10): 1569 – 1580.
- Van Vliet EA, Van Schaik R, Edelbroek PM, et al.* Inhibition of the multidrug transporter P-glykoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2006; 47 (4): 672 – 680.
- Van Vliet EA, Van Schaik R, Edelbroek PM, et al.* Region-specific overexpression of P-glykoprotein at the blood brain barrier affects uptake of phenytoin in epileptic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322 (1): 141 – 147.
- Verma A, Radtke R.* EEG of partial seizures. *J Clin Neurophysiol* 2006; 23 (4): 333 – 339.
- Vielhaber S, Von Ortzen JH, Kudin AF, et al.* Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44 (2): 193 – 199.
- White HS.* Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1999; 40 Suppl 5: 2 – 10.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, et al.* A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001; 345 (5): 311 – 318.
- Wiemann M, Jones D, Straub H, et al.* Simultaneous blockade of intracellular calcium increases and of neuronal epileptiform depolarizations by verapamil. *Brain Res* 1996; 734 (1 – 2): 49 – 54.
- Wozny C, Gabriel S, Jandova K, et al.* Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats. *Neurobiol Dis* 2005; 19 (3): 451 – 460.
- Yaari Y, Pincus JH, Argov Z.* Depression of synaptic transmission by diphenylhydantoin. *Ann Neurol* 1977; 1 (4): 334 – 338.
- Yasargil MG, Türe U, Yasargil DC.* Impact of temporal lobe surgery. *J Neurosurg* 2004; 101 (5): 739 – 746.

- Zahn RK, Tolner EA, Derst C, et al. U.* Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats. *Neurobiol Dis* 2008; 29 (2): 186 – 200.
- Zhu L, Gao J, Wang Y, et al.* Neuron degeneration induced by verapamil and attenuated by EGb761. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1997; 8 (4): 301 – 314.
- Zuckermann EC, Glaser GH.* Changes in hippocampal-evoked responses induced by localized perfusion with high-potassium cerebrospinal fluid. *Exp Neurol* 1968; 22 (1): 96 –117.

## **6. ERKLÄRUNG**

Ich, Nora Sandow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Faktoren der Pharmakoresistenz: Untersuchungen in Gewebeschnitten des Temporalen Kortex von chronisch epileptischen Patienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 13.08.2011

Nora Sandow

## 7. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann für die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung und Förderung sowie für die Möglichkeit „Neuro“ auch über nationale Grenzen hinaus zu erfahren.

Dr. Siegrun Gabriel möchte ich für ihre Ausdauer, Motivation, konstruktive Kritik und wissenschaftliche Überzeugung danken.

Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Dr. Herbert Siegmund und Bernd Schacht und danke ich sehr für ihre zuverlässige technische Unterstützung, die vieles möglich gemacht hat.

Dr. Peter Horn, Dr. Thomas-Nicolas Lehman und Prof. Dr. Peter Vajkoczy möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit und Weiterentwicklung von „gewebefreundlichen“ Resektions-techniken danken.

Dennis Päsler und Simon Kim danke ich für ihre Unterweisungen in der Elektrophysiologie und viele gemeinsam durchstandene Nächte im Labor.

Dr. Kathrin Schulze danke ich für ihre Hilfe bei Materialbestellungen und Organisation von Fördermitteln. Petra Rohrmoser und Sonja Ferl danke ich für Ihre technische Assistenz beim Umgang mit Gewebe und Lösungen.

Doris Meinken-Jäggi und Sabine Bartsch danke ich für die akribische Archivierung und Pflege der Patientendaten.

Laura Wagner, Gesine Könze, Stephanie Bäsler und Carolin Kokol danke ich für ihren außerordentlichen Support.

Dr. Julius Dengler und meiner Familie danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung.

## **8. LEBENSLAUF**

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