

Aus dem Institut für Neurophysiologie
Johannes Müller Centrum für Physiologie im CC2
der Medizinischen Fakultät Charité
– Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekte von Barium auf reizinduzierte Änderungen der
extrazellulären Kaliumkonzentration im Hippocampus der
Ratte in verschiedenen Modellen der
Temporallappenepilepsie**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Völker geb. Eilers

aus Berlin

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. U. Heinemann
2. Prof. Dr.med. A. Draguhn
3. Prof. Dr. I.D. Dietzel-Meyer

Datum der Promotion: 07.09.2012

Erklärung an Eides statt

„Ich, Alexander Eilers, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Effekte von Barium auf reizinduzierte Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration im Hippocampus der Ratte in verschiedenen Modellen der Temporallappenepilepsie“ 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.“

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Uwe Heinemann und Frau Dr. med. Siegrun Gabriel von mir selbst ausgeführt und ausgewertet worden. Teile der Arbeit sind bereits publiziert oder in Manuskriptform in Bearbeitung.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann möchte ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Begleitung während der experimentellen Bearbeitung danken. Stets ermöglichte und förderte er den methodischen und inhaltlichen Austausch zwischen den Arbeitsgruppen. Dies sowie der große und durchgängig von ihm gewährte experimentelle Freiraum verschafften mir Zugang zu einer Reihe elektrophysiologischer und histologischer Arbeitstechniken. Professor Heinemann stand mir dabei sowohl bei allen fachlichen und experimentellen als auch organisatorischen Fragen mit großzügigem persönlichem und zeitlichem Einsatz hilfreich zur Verfügung.

Frau Dr. Siegrun Gabriel sei an dieser Stelle mein besonderer Dank ausgesprochen, einerseits für ihre große Hilfsbereitschaft während des Erlernens und der Durchführung der Experimente, andererseits für ihre Unterstützung bei der Datenanalyse und der Erstellung der Publikationsmanuskripte. Das hohe Maß an persönlichem Engagement von Frau Dr. Gabriel im Experiment wie im theoretischen Diskurs ist untrennbar mit dem Gelingen dieser Arbeit verbunden.

In Fragen elektrotechnischer Grundlagen zur Datenerfassung sowie der elektronischen Datenverarbeitung war oft beratende und tatkräftige Unterstützung notwendig; sie wurde durch Herrn Dr. Hans-Jürgen Gabriel und Herrn Dr. Herbert Siegmund verlässlich und außerordentlich hilfreich gewährt.

Meinen Dank möchte ich auch Frau Astrid Düerkop und Frau Dr. Katrin Schulze aussprechen, die eine reibungslose Koordination und Unterstützung während der studienbegleitenden Labortätigkeit ermöglichten.

1 Inhaltsverzeichnis

Erklärung an Eides statt	3
Danksagung	4
1 Inhaltsverzeichnis	5
2 Einleitung	7
2.1 Epidemiologie der Epilepsien	8
2.2 Ursachen von Epilepsien und epileptischen Anfällen	8
2.3 Temporallappenepilepsie (TLE)	9
2.4 Mechanismen der Iktogenese	10
2.5 Die CA1-Region und epileptische Anfälle	11
2.6 Extrazelluläre Kaliumkonzentration und Anfallsentstehung	11
2.7 Die Glia vermittelte Kaliumpufferungshypothese	13
2.8 Eigenschaften reaktiver Astrozyten	16
2.9 Das Pilocarpinmodell	17
2.10 Die Kindlingepilepsie	17
2.11 Fragestellung	18
3 Material und Methoden	18
3.1 Anatomie des Hippocampus	18
3.2 Versuchstiere	20
3.2.1 Pilocarpinmodell der Ratte	21
3.2.2 Gekindelte Tiere	21
3.3 Anfertigung hippocampaler Hirnschnittpräparate der Ratte	22
3.4 Schneidekammer	23
3.5 Aufbewahrung der Hirnschnittpräparate	23
3.6 Mikroelektroden	24
3.7 Reizelektroden	25
3.8 Versuchsaufbau	26

3.9	Verwendete Perfusionsmedien	27
3.10	Datenerfassung	28
3.11	Auswertung und Untersuchungsparameter	29
3.11.1	Feldpotenzialtransienten	29
3.11.2	Berechnung der Kaliumkonzentrationen aus den gemessenen Spannungsänderungen	29
3.11.3	Stromsenken-Dichte-Analyse (CSD-Analyse)	30
3.12	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Reizinduzierte Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration, begleitende langsame Feldpotenziale und schnelle Feldpotenzialtransienten in der Area CA1 der Ratte	31
4.2	Wirkungen von Barium auf laminare Profile der Änderungen der Kaliumkonzentration und der langsamen Feldpotenziale bei Reizung des Alveus	36
4.3	Wirkungen von Barium auf laminare Profile der Feldpotenziale und der Kaliumkonzentration in Hirnschnittpräparaten von Tieren, die nach Behandlung mit Pilocarpin eine Epilepsie entwickelten	42
4.4	Untersuchungen der Effekte von Barium an gekindelten Tieren	44
5	Diskussion	46
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis	53
8	Abkürzungen	62
9	Publikationsliste	64
10	Lebenslauf	65

2 Einleitung

Das Wort „Epilepsie“ leitet sich aus dem griechischen Wort „epilepsia“ ab und bedeutet, „Anfall“ oder „Fallsucht“. In der Geschichte wurden epileptische Anfälle mal als göttliche Anfälle, mal als Strafe oder dämonische Besessenheit angesehen. Die Ursachen für die Epilepsie wurden insofern lange im Übersinnlichen gesucht. Auch heute noch wird die Erkrankung bisweilen stigmatisiert und ihr gesellschaftliches Ansehen erstreckt sich vom Vorurteil bis hin zur Akzeptanz. So variieren auch die Behandlungsarten und es finden sich Scharlatanerie und Teufelsaustreibung neben rationaler Therapie. Dabei begann die empirische Beschreibung der Erkrankung bereits um das 4. Jahrhundert v. Chr. durch Hippokrates. Er charakterisierte die Epilepsie als eine „Krankheit des Gehirns, die durch Diät und Medikamente, und nicht durch religiöse Zaubersprüche zu heilen ist“.

Als Epilepsie werden Erkrankungen bezeichnet, bei denen mindestens zwei stereotype Anfälle mit Verhaltensänderungen aufgetreten sind, die entweder auf eine Übersynchronisation oder auf synchrone Überaktivität von Nervenzellen zurückgeführt werden können (Holthausen, 2001). Die Verhaltensänderungen hängen von den Eigenschaften der am Anfall beteiligten Strukturen ab. Epilepsien stehen deshalb im Zusammenhang mit cerebralen Erkrankungen, die aus einer Vielzahl endogener oder exogener pathologischer Prozesse hervorgegangen sein können (Rohkamm, 2000, 192–199). Die cerebrale Dysfunktion äußert sich also in vorübergehenden, rezidivierenden und anfallsartigen Episoden, die zu unwillkürlichen, sensorischen oder motorischen Phänomenen führen und häufig das Bewusstsein beeinträchtigen (Holthausen, 2001). Man unterscheidet Anfälle, die nur eine bestimmte Hirnregion betreffen (partiale Anfälle) und primär oder sekundär generalisierte Anfälle, in die beide Hemisphären involviert sind und die folglich mit Bewusstseinsverlust während des Anfalls einhergehen. Man spricht bei sekundär generalisierten Anfällen dann von komplex-partialen Anfällen. Mit cerebralen Anfällen werden meist tonisch-klonische Konvulsionen, ein Bewusstseinsverlust, viszerale Phänomene wie Stuhl- oder Urinabgang oder komplexe Störungen der Wahrnehmung und des Bewusstseins assoziiert (Holthausen, 2001). Die Einteilung der Epilepsien richtet sich nach Anfallsmuster, Ursache, Lebensalter bei Krankheitsbeginn, auslösenden Faktoren, EEG-Befund und Prognose (Holthausen, 2001).

2.1 Epidemiologie der Epilepsien

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Zentralnervensystems. Grundsätzlich ist jedes Gehirn unabhängig von seiner phylogenetischen Entwicklungsstufe krampffähig. Etwa zehn Prozent der Bevölkerung weisen Zeichen einer erhöhten cerebralen Erregbarkeit im EEG auf, 5 % erleiden im Laufe ihres Lebens einen Gelegenheitsanfall. Etwa 0,5–1 % aller Menschen leiden an einer Epilepsie. Die Inzidenz für die Entwicklung einer Epilepsie verändert sich altersabhängig. Sie liegt um 90 pro 100 000 Einwohner und Jahr zwischen dem vierten und zehnten Lebensjahr, sinkt auf 40/100 000 zwischen 25 und 40 Jahren und steigt bis zum 70. Lebensjahr auf über 150/100 000 an. Bei Alterserkrankungen sind Epilepsien besonders häufig mit Multiinfarkten (Olsen & Kammergaard, 2005; Epsztein *et al.*, 2008) und mit der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert (Mendez *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 2011). Die Ursachen symptomatischer Epilepsien variieren. Retrospektive Analysen überschätzen dabei die Wahrscheinlichkeit, dass Epilepsien nach einer Hirnschädigung auftreten und gute prospektive Studien, z. B. zu Fieberkrämpfen als Ursache einer späteren Epilepsie, fehlen. Insofern sind die nachfolgend angegebenen Ursachen nur als Hinweise anzusehen.

2.2 Ursachen von Epilepsien und epileptischen Anfällen

Man unterscheidet idiopathische Ursachen (ca. 50 %) von symptomatischen Ursachen (wie z. B. perinatale Schädigungen, Schädel-Hirn-Traumata, Hirntumore, Alkoholabhängigkeit), von vaskulären Ursachen und Enzephalitiden, sowie von kryptogenen Ursachen, von denen man annimmt, dass sie symptomatische sind, aber deren organische Ursachen noch nicht gefunden wurden (wie z. B. Lennox-Gastaut-Syndrom und West-Syndrom; Matthes & Schneble, 1992). Durch die modernen bildgebenden Verfahren nimmt die Zahl der kryptogenen Epilepsien in den letzten Jahren deutlich ab. Bis auf wenige Ausnahmen (= idiopathische fokale Epilepsien, z. B. Rolando-Epilepsie und Lese-Epilepsie) sind alle fokalen Anfälle (solche mit und ohne Bewusstlosigkeit bzw. einfache und komplexe fokale sowie sekundär generalisierte tonisch-klonische Anfälle) bzw. Epilepsien symptomatisch.

Wenig verstanden sind die akuten Auslöser eines epileptischen Anfalls selbst wenn Entzug von Medikamenten oder Alkohol vorliegt. Besser verstanden sind metabolische Ursachen (Urämie, Thyreotoxikose, Hyponatriämie, Leberzirrhose, Diabetes). Durch

Hyperventilation ausgelöste Anfälle beruhen auf einer durch Alkalose ausgelösten Erregbarkeitssteigerung und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an den Fieberkrämpfen des Säuglings und Kleinkindes beteiligt (Schuchmann & Kaila, 2011).

2.3 Temporallappenepilepsie (TLE)

Komplex-partiale Anfälle mesialer Temporallappenstrukturen (Hippocampus, Amygdala und entorhinaler Kortex) sind die häufigsten fokalen epileptischen Anfälle (McNamara, 1994; Liu *et al.*, 1995). Temporallappenanfälle sind nach Gates & Cruz-Rodriguez klinische und elektrische Ereignisse als Folge lokalisierter epileptischer Entladungen von Neuronen innerhalb des Temporallappens (Gates & Cruz-Rodriguez, 1990). 85 % der TLE gehen von mesial gelegenen Strukturen des Temporallappens aus (mTLE; Spencer & Spencer, 1994). Klinisch ist die TLE gekennzeichnet durch

- Auren und viszerale Sensationen,
- iktale Symptome in Form oraler Automatismen mit oder ohne Bewusstseinsverlust,
- eine prolongierte postiktale Reorientierungsphase und Gedächtnisstörungen,
- elektroenzephalografisch nachweisbare epileptiforme Aktivität im Bereich der anterioren Temporalhörner mit Videoaufzeichnung des Verhaltens, sowie
- durch bildmorphologische Abnormitäten des mesialen Temporallappens (Wieser *et al.*, 1993).

TLE sind häufig – aber keineswegs immer – durch typische pathologische Veränderungen im Bereich des Hippocampus charakterisiert (Ammonshornsklerose, AHS). Sie sprechen oft zunehmend schlechter auf derzeit verfügbare medikamentös-antikrampftherapeutische Therapie an. Bis zu 70 % der Patienten mit TLE entwickeln pharmakoresistente Anfälle (Shorvon, 1996; Wilder, 1995) und dieser Anteil nimmt noch weiter zu, wenn eine Sklerose mit einer Entwicklungsstörung assoziiert ist (Schmidt & Löscher, 2005; Mathern, 2009).

Als Ammonshornsklerose bezeichnet man einen segmentalen Neuronenverlust mit einer assoziierten reaktiven Gliose vor allem in der Area CA1 und dem Hilus der Area dentata (Endfoliumsklerose). Die Zellverluste in der Area CA3 fallen geringer aus und Pyramidenzellen der Area CA2 scheinen kaum anfällig gegenüber Schädigungen zu sein (Represa *et al.*, 1995; Lothman *et al.*, 1991; Margerison & Corsellis, 1966; Mathern *et al.*, 1997; Blümcke *et al.*, 1999; Zentner *et al.*, 1995). Da nicht alle Patienten mit einer

Temporallappenepilepsie eine AHS aufweisen, ist offen, ob die AHS Folge rekurrerender epileptischer Anfälle oder eines Status epilepticus ist (Spielmeyer, 1927; Falconer *et al.*, 1964) oder sich nach einem cerebralen Trauma, komplizierten Fieberkrämpfen, einem perinatalen Trauma mit Hypoxie bzw. einer Enzephalitis entwickelt. Ebenso ist offen, ob die mit einer AHS im Hippocampus vergesellschafteten Reorganisationsprozesse wirklich Ursache der Epilepsie sind (Mathern *et al.*, 1994; Lehmann *et al.*, 2001). Tatsächlich wird zunehmend erkannt, dass auch Entwicklungsstörungen in mesialen Temporallappenstrukturen Ursachen einer TLE sein können; und es zeigt sich, dass Patienten mit pharmakoresistenter TLE auch epileptogene Läsionen außerhalb des Hippocampus aufweisen können (Tumore, Gefäßmalformationen, kortikale Dysplasien oder Narben). In solchen Fällen bleiben die Neuronenverluste in der Area CA1 oft unterhalb von 25 % (Spencer & Spencer, 1994; Babb & Brown, 1987) und sind mit einer milden Gliose assoziiert (Scheffler *et al.*, 1997). Trotz Entfernung einer extrahippocampalen Läsion kann der Hippocampus – in situ belassen – noch epileptogen sein (Cascino *et al.*, 1993).

2.4 Mechanismen der Iktogenese

Paroxysmale Depolarisationen (PDS) gelten als Grundlage interiktualer Ereignisse. Dabei handelt es sich um synchrone, hochfrequente und salvenartige Entladungen, ausgelöst durch große, lang andauernde Membran-Depolarisationen von 30–40 mV, die für 80–200 ms anhalten (Matsumoto & Marsan, 1964; Prince, 1978). Sie verschmelzen während eines Anfalls. Als Voraussetzung für die Entwicklung eines epileptischen Anfalls werden folgende Mechanismen diskutiert:

1. Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts zwischen erregenden und hemmenden Prozessen zugunsten erregender Prozesse (Jung & Tönnies, 1950). Dabei kann die Verschiebung entweder auf *zellulärer* Ebene mit Zunahme erregender Natrium- oder Calciumströme (Beck & Yaari, 2002), Abnahme inhibitorischer Kalium- oder Chloridströme (Bernard *et al.*, 2004) vorhanden sein oder auf *synaptischer* Ebene mit Zunahme glutamaterger oder cholinergischer Übertragung, Abnahme inhibitorischer GABAerger Übertragung (γ -Aminobuttersäure; engl.: *gamma-amino butyric acid*) bestehen (Mutani, 1986).

2. Zellen, die in der Lage sind, autonom Entladungen generieren zu können, können über exzitatorische Kollaterale weitere Neuronenpopulationen in ein Anfallsgeschehen

mit einbeziehen (Wong & Prince, 1990; Miles, Wong & Traub, 1988; Jensen *et al.*, 1994).

3. Zusätzliche synchronisierende Mechanismen wie die aktivitätsinduzierte Verstärkung synaptischer Verbindungen oder nichtsynaptischer Mechanismen wie ephaptische Interaktionen und Änderungen im Ionenmilieu ermöglichen ebenfalls selbst-erhaltende Krampfaktivitäten (Dudek *et al.*, 1986; Konnerth *et al.*, 1987; Jefferys, 1995).

2.5 Die CA1-Region und epileptische Anfälle

Im Allgemeinen wird angenommen, dass epileptische Anfälle von der CA3-Region ausgehen. Allerdings lassen sich Anfälle experimentell auch durch Absenken der Kalziumkonzentration, der Magnesiumkonzentration und/oder Anheben der Kaliumkonzentration aus der Region CA1 auslösen, nachdem die CA3-Region entfernt wurde. Hierbei ist zu bemerken, dass der Neuronenverlust auch in der oft stark betroffenen Region CA1 in der septotemporalen Achse variiert und es in Teilen des Hippocampus deshalb auch in der CA1-Region zu erheblichen Reorganisationsprozessen kommen kann (Lehmann *et al.*, 2001). Pyramidenzellen aus der Region CA1 projizieren zum Subiculum und oft auch direkt über das Subiculum in nachgeschalteten Strukturen (Heinemann, Behr *et al.*, 2011). Damit ist die Region CA1 eine wichtige Relaisstation für die Ausbreitung und sekundäre Generalisierung von Anfällen. In Bezug auf die Area CA1 wurden Zellen mit einem salvenartigen Entladungsverhalten beschrieben, das sich mit steigender extrazellulärer Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$) erhöht (Jensen *et al.*, 1994). Hinzu kommt, dass die Packungsdichte von Pyramidenzellen in der CA1-Region besonders hoch sowie der Extrazellulärraum besonders klein ist (McBain *et al.*, 1990). Dies bedingt besonders große Änderungen der extrazellulären Feldpotenziale und eine ephaptische Interaktion zwischen Nervenzellen, die zur Synchronisation neuronaler Überaktivität beitragen kann.

2.6 Extrazelluläre Kaliumkonzentration und Anfallsentstehung

Die $[K^+]_o$ des Liquor cerebrospinalis liegt unter physiologischen Bedingungen bei ca. 3 mM (Heinemann & Lux, 1975); die intrazelluläre neuronale Kaliumkonzentration beträgt etwa 150 mM. Daraus ergibt sich nach der Nernst-Gleichung ein

Gleichgewichtspotenzial für Kaliumionen von ca. -90 mV. Da das Membranpotenzial von Pyramidenzellen im Hippocampus um -65 mV variiert, besteht eine treibende Kraft für Kaliumausstrom, der über K_{IR} und vor allem über Two-pore-domain-Kaliumkanäle erfolgt (Päsler *et al.*, 2007).

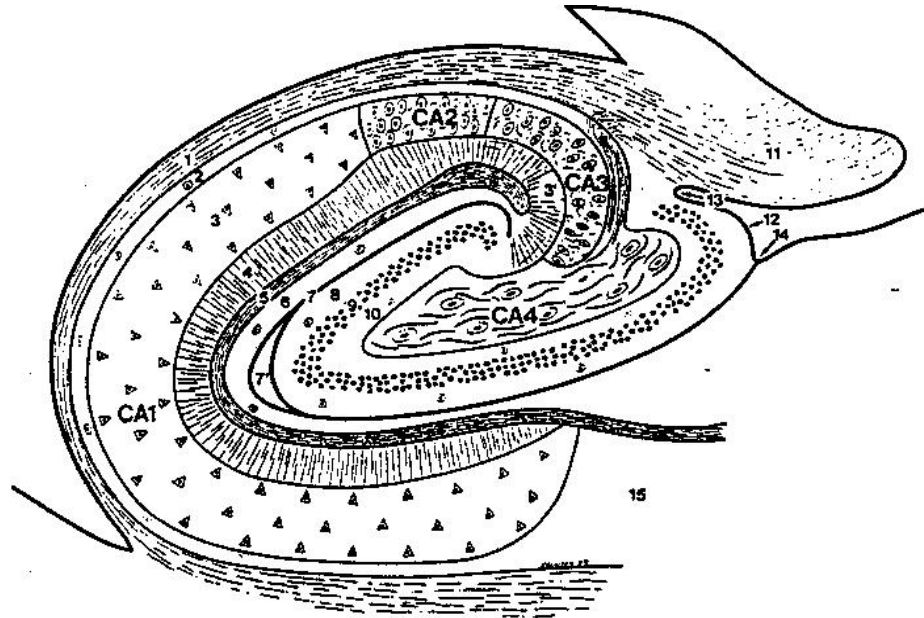


Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Hippocampus; Koronarschnitt. CA1–CA4-Felder des *Cornu ammonis*: 1 Alveus, 2 Stratum oriens, 3 Stratum pyramidale, 4 Stratum radiatum, 5 Stratum lacunosum, 6 Stratum moleculare, 7 Sulcus hippocampalis. *Gyrus dentatus*: 8 Stratum moleculare, 9 Stratum granulosum, 10 polymorphe Schicht, 11 Fimbrie, 12 Margo denticulatus, 13 Sulcus fimbriodentatus, 14 Sulcus hippocampalis superficialis, 15 Subiculum (Duvernoy, 1998).

Erhöhte neuronale Aktivität führt demnach zu beträchtlicher Akkumulation von Kalium im Extrazellulärraum (Lux *et al.*, 1986), die allerdings normalerweise auf ca. 10–12 mM begrenzt wird (Heinemann & Lux, 1977). Spontane oder artifizielle Kaliumakkumulationen im EZR führen über folgende Mechanismen zu einer erhöhten Erregbarkeit des Gewebes und damit zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung und Unterhaltung epileptiformer Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Jensen *et al.*, 1994; Haglund & Schwartzkroin, 1990; Fetziger & Ranck, Jr., 1970; Zuckermann & Glaser, 1968; Liotta *et al.*, 2011):

1. Durch die Verschiebung des Kaliumgleichgewichtspotenzials in depolarisierender Richtung werden die Nervenzellen näher an ihre Erregungsschwelle geführt. Aktionspotenziale werden verlängert, da die repolarisierenden spannungsge-

steuerten K^+ -Auswärtsströme aufgrund reduzierter treibender Kraft vermindert werden. Zusätzlich wird die treibende Kraft für Chlorideinstrom in Zellen reduziert, da der neuronale Chloridtransporter KCC2 vom transmembranalen Kaliumgradienten abhängt (Liotta *et al.*, 2011; Korn *et al.*, 1987; Misgeld *et al.*, 2006).

2. Durch die $[K^+]_o$ -induzierte Depolarisation wird zusätzlich die Freisetzungswahrscheinlichkeit für Neurotransmitter an den Axonterminalen erhöht (Jensen & Yaari, 1997).
3. Durch die osmotisch bedingte Schwellung von Gliazellen kommt es zu einer Abnahme des EZR-Volumens und damit zu einer weiteren Anfälligkeit für $[K^+]_o$ -Erhöhungen (Dietzel & Heinemann, 1980; Walz & Hinks, 1985), sodass zunehmend nichtsynaptische Mechanismen zur Entstehung und Fortleitung epileptischer Aktivität beitragen können (Jefferys, 1995).
4. Extrazelluläre Kaliumakkumulationen bei neuronaler Überaktivität können eine ektopische Erregungsbildung und dadurch antidrome Erregungseinbrüche in afferenten und efferenten Axonen begünstigen (Pinault & Pumain, 1985).

Die Begrenzung extrazellulärer Kaliumakkumulation ist daher eine unerlässliche Voraussetzung für die regelrechte Funktionsweise des Nervengewebes.

2.7 Die Glia vermittelte Kaliumpufferungshypothese

Für die Begrenzung von Anstiegen der Kaliumkonzentration stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. So ist beschrieben worden, dass Kaliumerhöhung gliale Na-K-ATPasen aktiviert (Xiong & Stringe, 2000). Ist die Kaliumakkumulation im Gewebe homogen, kommt es zu einer Kaliumchloridaufnahme (Walz *et al.*, 2005). Bei inhomogener Kaliumakkumulation kann die Kaliumpufferung über Gliazellen zu einer raschen Umverteilung von Kalium führen (Orkand *et al.*, 1966).

Kaliumionen, die ständig durch neuronale Aktivität freigesetzt werden, führen im Neokortex und Hippocampus – insbesondere bei epileptischer Aktivität – zu extrazellulären Kaliumakkumulationen von bis zu 12 mM (Lux *et al.*, 1986; Hablitz & Heinemann, 1987). Unter experimentellen Bedingungen werden Anstiege der $[K^+]_o$ auf 12 mM in adultem Gewebe auch nicht durch starke elektrische Stimulation oder Applikation epileptogener Substanzen überschritten (Heinemann & Lux, 1977; Dietzel & Heinemann, 1986). Es gibt verschiedene Hinweise, dass Astrozyten an der Begrenzung

der Kaliumakkumulation beteiligt sind. Astrozyten besitzen eine vorwiegend kaliumpermeable Membran (Ransom & Goldring, 1973) und bilden mit langen und verzweigten Fortsätzen über niederohmige interzelluläre Verbindungen (Gap Junctions) ein elektrisch gekoppeltes Synzytium (Enkvist & McCarthy, 1994; Gutnick *et al.*, 1981; Wallraff *et al.*, 2006). Die höhere Kaliumkonzentration des Intrazellulärraums gegenüber dem EZR stellt daher im adulten Gewebe ein Ruhemembranpotenzial von etwa -80 mV ein (Ballanyi *et al.*, 1987). Kommt es durch neuronale Aktivität zu einem lokalen Kaliumanstieg, wird das Kaliumgleichgewichtspotenzial (E_K) über der angrenzenden Zellmembran eines Astrozyten in positive Richtung verschoben. Die Verschiebung breitet sich elektrotonisch im Astrozytennetzwerk aus. Dadurch entsteht am Ort maximaler Kaliumakkumulation eine geringere Depolarisation als nach der Kaliumakkumulation zu erwarten wäre (Futamachi & Pedley, 1976). Die Differenz zwischen E_K und dem Membranpotenzial führt dann zu einer Triebkraft für Kaliumeinstrom in die Zelle. Während die Depolarisation am Ort hoher $[K^+]_o$ niedriger ausfällt als nach der Nernst-Gleichung zu erwarten wäre, ist sie an entfernten Orten des Synzytiums durch die elektrische Kopplung höher als aus der dortigen transmembranen Kaliumverteilung zu erwarten wäre. Folglich entsteht zur gleichen Zeit eine Triebkraft für einen Kaliumausstrom an Orten ohne extrazelluläre Kaliumakkumulation. Dieser Mechanismus wurde das erste Mal im Jahr 1966 von Orkand (Orkand, 1966) vorgeschlagen und als räumlicher Kaliumumverteilungs- oder auch Kaliumpufferungsmechanismus bezeichnet. Die folgenden beiden Abschnitte stellen astrozytäre Leitfähigkeiten vor, die im Zusammenhang mit der glialen Kaliumpufferung diskutiert werden. Klassische Astrozyten sind anders als die weitverbreiteten NG2-positiven Gliazellen durch Glutamattransporter und die Expression von $K_{IR}4.1$ -Kaliumkanälen charakterisiert (Steinhäuser *et al.*, 2011). Der astrozytäre K_{IR} ist vor allem bariumsensitiv (bis zu $100 \mu\text{M}$), weist eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit beim RMP auf und gewährleistet dadurch ein stabiles negatives Membranpotenzial; seine Leitfähigkeit erhöht sich mit steigender $[K^+]_o$ (Ransom & Sontheimer, 1995) und seine Expression konnte in hippocampalen Astrozyten der Area CA3 und Area CA1 immunhistochemisch und elektrophysiologisch nachgewiesen werden (Tse *et al.*, 1992; Kressin *et al.*, 1995; Bordey & Sontheimer, 1997; Poopalasundaram *et al.*, 2000; Zawar *et al.*, 1999). Für den astrozytären K_{IR} wird daher eine Beteiligung am Kaliumaufnahme- und -umverteilungsmechanismus diskutiert. Neben K_{IR} Kanälen exprimieren Astrozyten noch Two-pore-domain-Kaliumkanäle (Bang *et al.*, 2000). Es handelt sich um eine sehr

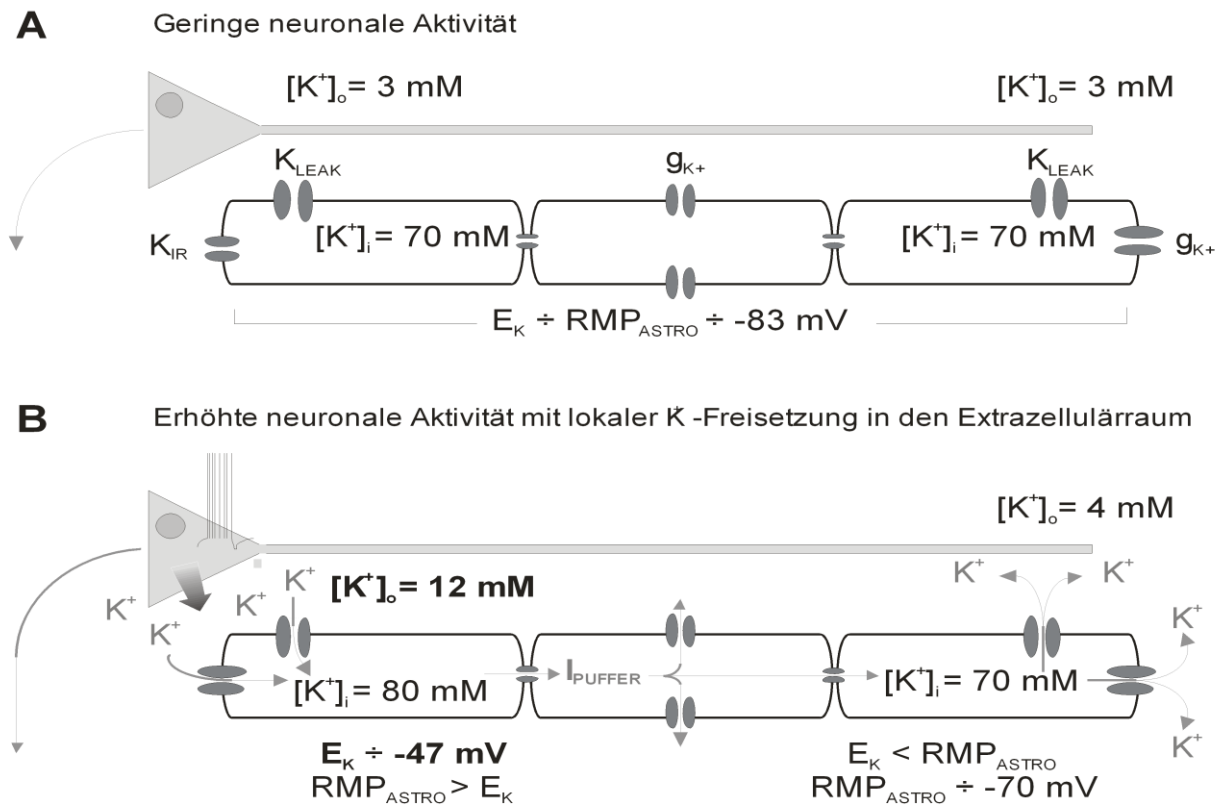


Abb. 2: Gliapufferungshypothese. Schematisiert dargestellt sind Pyramidenzellen mit apikalen Dendriten und basal entspringendem Axon (gebogener Pfeil) sowie jeweils drei Astrozyten, die über niederohmige Gap junctions elektrisch gekoppelt sind. K_{IR} (einwärtsgerichtete Kaliumleitfähigkeit), K_{LEAK} (schwach spannungs- und zeitabhängige Kaliumleck- oder -hintergrundleitfähigkeit) und g_{K^+} (übrige kaliumpermeable Leitfähigkeiten). (A) Bei geringer neuronaler Aktivität beträgt die $[K^+]_o$ über das gesamte astrozytäre Synzytium annähernd 3 mM. Bei einer $[K^+]_{ASTRO}$ von ca. 70 mM (Ballanyi *et al.*, 1987) ergibt sich ein Kaliumgleichgewichtspotenzial (E_K) von -83 mV und wegen der hohen Kaliumpermeabilität der Zellmembran ein ähnliches Ruhemembranpotenzial (RMP_{ASTRO}). (B) Steigt mit erhöhter neuronaler Aktivität die $[K^+]_o$, verschiebt sich E_K (hier -47 mV), während RMP_{ASTRO} durch die synzytiale Kopplung negativer als E_K bleibt. Dadurch entsteht an diesem Ort eine Triebkraft für einen K^+ -Einstrom in die Zelle (links im Bild). An entfernten Orten fällt zur gleichen Zeit durch den Pufferstrom innerhalb des Synzytiums (I_{PUFFER}) die Depolarisation höher aus als E_K , sodass hier Kalium aus dem Zellverband in den EZR strömt (rechts im Bild) (Kivi, 2002).

große Familie von Kaliumkanälen (Fink *et al.*, 1998). Sie bedingen auch außerhalb des Nervensystems das Ruhemembranpotenzial vieler Zellen. Die astrozytären 2P-Kaliumkanäle sind neben Quinin- und Quinidine- auch Ba^{2+} in höheren Konzentrationen empfindlich. Konzentrationen von Ba^{2+} bis zu 2 mM werden für eine Blockade benötigt (Zheng *et al.*, 2011; Päsler *et al.*, 2007). Damit eignet sich Ba^{2+} zur Untersuchung der glialen Pufferungsfähigkeit. So konnte gezeigt werden, dass eine iontophoretische

Applikation von Kalium in Gegenwart von TTX und/oder von Glutamatrezeptoragonisten zu Kaliumsignalen führt, die durch Applikation von Barium stark vergrößert werden. Während fokaler Applikation von Kalium treten negative Feldpotenziale auf (Jauch *et al.*, 2002; Ivens *et al.*, 2006). Solche extrazellulären langsamen Feldpotenziale korrelieren zeitlich und räumlich mit der Kaliumakkumulation (Dietzel & Heinemann, 1980; 1982) und in ihrer Amplitude auch mit Astrozytendepolarisationen (Somjen, 1970; Castellucci & Goldring, 1970; Glötzner & Grüsser, 1968; Krnjevic & Morris, 1975 a). Aus der räumlichen und zeitlichen Analyse solcher Feldpotenziale (Stromquellen-Dichte-Analyse, CSD für engl.: *current source density*) lässt sich ein Nettozugewinn bzw. -verlust an Ladungsträgern an einem Ort über einen bestimmten Zeitraum im EZR abschätzen (Nicholson & Freeman, 1975; Dietzel *et al.*, 1982; 1989). Dieser kann in Bezug zu den Ionenverschiebungen im Extrazellulärraum gesetzt werden. Dabei würde Kaliumpufferung am Ort maximaler Kaliumakkumulation durch Aufnahme von Kaliumionen in Gliazellen zu negativen Potenzialen führen, während an entfernten Orten positive Potenziale – abhängig von der Geometrie des neuronalen Verbundes – auftreten können. Eine CSD-Analyse langsamer Feldpotenziale unter verschiedenen experimentellen Bedingungen kann deshalb Hinweise auf die Funktionsfähigkeit der glialen Zellen liefern.

2.8 Eigenschaften reaktiver Astrozyten

Astrozyten zeigen als unspezifische Reaktion auf Gewebeschädigungen des Gehirns Veränderungen ihrer Morphologie und funktionellen Parameter. Derartige *reaktive Astrozyten* findet man in pathologisch verändertem Gewebe, so auch in chronisch epileptischem Gewebe bei TLE; diese Veränderungen umfassen unter anderem sowohl den Verlust von K_{IR} -Kanälen als auch einen Anstieg astrozytärer Eingangswiderstände. Dabei muss konstatiert werden, dass reaktive Astrozyten verschiedene Eigenschaften besitzen können, dass der Begriff „aktivierter Astrozyt“ noch wenig differenziert genutzt wird und wahrscheinlich nicht immer die gleichen Funktionsveränderungen beinhaltet. Die Eigenschaften aktivierter Astrozyten entsprechen weitgehend denen NG2-positiver Gliazellen in der Expression von spannungsgesteuerten Ionenkanälen und der Expression von Glutamatrezeptoren (MacFarlane & Sontheimer, 1997; Francke *et al.*, 1997; Hinterkeuser *et al.*, 2000; Bordey & Sontheimer, 1998; Steinhäuser *et al.*, 2011). Zusätzlich wird die Expression von glialen Connexinen herabreguliert. Direkte Hinweise über Expression von K_{LEAK} -Leitfähigkeiten in reaktiven Astrozyten aus sklerotischem

Gewebe liegen nicht vor.

TLE-Patienten mit einer Läsion außerhalb des Hippocampus zeigen keinen segmentalen Zellverlust im Hippocampus und allenfalls diskrete Zeichen einer Gliose (Scheffler *et al.*, 1997). Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle in Astrozyten aus solchem Gewebe sind in geringerem Maß herunterreguliert als in sklerotischem Gewebe mit ausgeprägter Gliose (Hinterkeuser *et al.*, 2000). Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die verschiedenen Ausprägungsgrade einer Gliose mit verschieden stark ausgeprägten Veränderungen astrozytärer Eigenschaften zwischen der AHS- und der Non-AHS-Gruppe, insbesondere bezüglich der Kaliumleitfähigkeiten, einhergehen, die an der Kaliumpufferung beteiligt sind. Dazu sollten Tiere mit und ohne Sklerose bei TLE im Vergleich mit Normaltieren untersucht werden.

2.9 Das Pilocarpinmodell

Tierexperimentell lassen sich TLE mit hippocampaler Sklerose durch einen experimentell induzierten Status epilepticus nachahmen. Geeignet sind Substanzen, die die neuronale Erregbarkeit stark erhöhen. In der Literatur werden verschiedene Varianten von Statusmodellen verwendet. In einigen dieser Modelle wird der Glutamat-Agonist „Kainsäure“ entweder systemisch, intraventriculär oder intrakortikal und/oder intrahippocampal verwendet. Intrahippocampale Injektion führt zu einer lokalen Sklerose, während bei den anderen Applikationen Läsionen weitverbreitet auftreten. Eine Alternative stellt das weniger aufwendige Pilocarpinmodell dar, bei dem nach Vorbehandlung mit Skopolamin ein Status epilepticus entsteht. Mit einer Latenz von einigen Wochen treten dann spontane Anfälle auf, die denen limbischer Anfälle entsprechen. Die Tiere weisen eine ausgeprägte hippocampale Sklerose auf. Die Anfallshäufigkeit ist allerdings geringer als im Kainatmodell und deshalb für die Tiere weniger belastend. Der Zellverlust in der Area CA1 ist besonders in ventralen Bereichen recht ausgeprägt und die Region ist durch eine ausgeprägte Astrozytose gekennzeichnet. Insofern sind die Muster von Zellverlusten denen anderer TLE-Modelle ähnlich (Turski *et al.*, 1983).

2.10 Die Kindlingepilepsie

Ein limbischer Status epilepticus ist elektrografisch durch andauernde oder in kurzen

Intervallen wiederkehrende, einzelne und komplexe epileptiforme Entladungen (*spikes and waves*) charakterisiert. Sie treten dabei selten nur in limbischen Strukturen, häufig auch in anderen neokortikalen und thalamischen Regionen auf. Im Verhalten der Tiere zeigen sich nacheinander eine Reihe von Symptomen, die als Akinesie, Sträuben der Fellhaare, Zittern des Körpers, Kaubewegungen, Myoklonus der Gesichtsmuskulatur, Kopfnicken, Aufrichten des Körpers und Tremor der Vorderextremitäten sowie als generalisierte motorische Krämpfe mit vorausgehendem Verlust der Kontrolle über die Körperhaltung beschrieben werden. Diese Symptome entsprechen jenen, die nach elektrischer Reizung der Mandelkerne im Kindlingmodell der Epilepsie beschrieben worden sind. Die Kindlingepilepsie kann durch elektrische Reizung unterschiedlicher limbischer Strukturen (z. B. der Amygdala oder des Hippocampus) ausgelöst werden. Sie wurde von Racine genutzt, um fünf Klassen epileptischer Aktivität zu beschreiben. Im Verlaufe der Ausbildung eines Status zeigen sich Symptome der Stadien II–V nach Racine (Racine, 1972). Kindling der basolateralen Amygdala führt innerhalb von 20 bis 40 Reizwiederholungen zu reizinduzierten Anfällen des Stadiums V nach Racine (partial, complex). Chronische spontane Anfälle treten nicht auf, da die elektrische Stimulation vorher eingestellt wird. In diesem Modell treten minimale Verluste von Nervenzellen selten auf und die Astrozytose ist selten ausgeprägt.

2.11 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurden die Wirkungen von Barium auf reizinduzierte Änderungen der Kaliumkonzentration untersucht. Diese sollten in laminaren Profilen mit den Ionenverschiebungen verglichen und zu Änderungen der Stromsenkendichte in Beziehung gesetzt werden, um danach vergleichend in hippocampalen Schnitten aus gekindelten (nicht spontan epileptischen) und aus mit Pilocarpin behandelten (spontan epileptischen) Ratten, untersucht zu werden. Ich erhoffte mir dadurch Aufschluss über Veränderungen in der Kaliumregulation im Gewebe.

3 Material und Methoden

3.1 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus ist dem entorhinalen Kortex nach- und vorgeschaltet. Afferenzen aus den oberen Schichten des entorhinalen Kortex erreichen die Area dentata, die Area

CA3 und die Area CA1. Die Area dentata projiziert zur CA3-Region, welche die CA1-Region erreicht. Die Zellen der CA1-Region projizieren teils umgeschaltet im Subiculum zum entorhinalen Kortex. Vom Subiculum werden auch andere Strukturen im Gehirn erreicht. Im Cornu ammonis wird eine Zellschicht (Stratum pyramidale) vom Stratum radiatum und Stratum moleculare unterschieden. In diese Schichten reichen die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen. Dort wird auch die Mehrzahl der synaptischen Kontakte aufgenommen. Im Stratum oriens finden sich basale Dendriten der Pyramidenzellen und ihre Axone, die über den Alveus andere Zielstrukturen erreichen. Ca. 90 % der Zellen im Hippocampus sind glutamaterg und ca. 10 % GABAerg. In den durchgeführten Experimenten wurde hauptsächlich die antidrome Stimulation des Alveus genutzt, um Pyramidenzellen der Area CA1 zu aktivieren. Durch einen Cocktail von NBQX und APV konnte die Aktivierung anderer Zellen über rekurrente Axonkollaterale verhindert werden. Die beschriebene Organisation des Hippocampus erlaubt die weitgehende Erhaltung des neuronalen Netzwerkes in Hippocampus-Hirnschnitten, deren Organisation in den folgenden Abbildungen dargestellt ist:

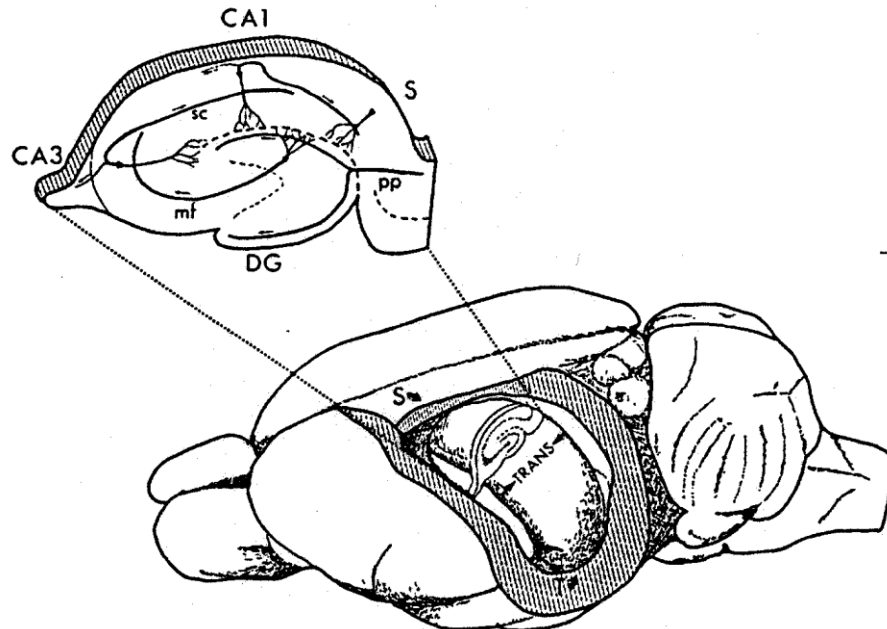


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lage des Hippocampus im Temporallappen der Ratte nach Resektion der den Hippocampus bedeckenden Kortexoberfläche (unten). Im oberen Teil der Abbildung: Darstellung transversaler Schnitttrichtung des Präparates zur septotemporalen Achse des Hippocampus (Amaral & Witter, 1989).

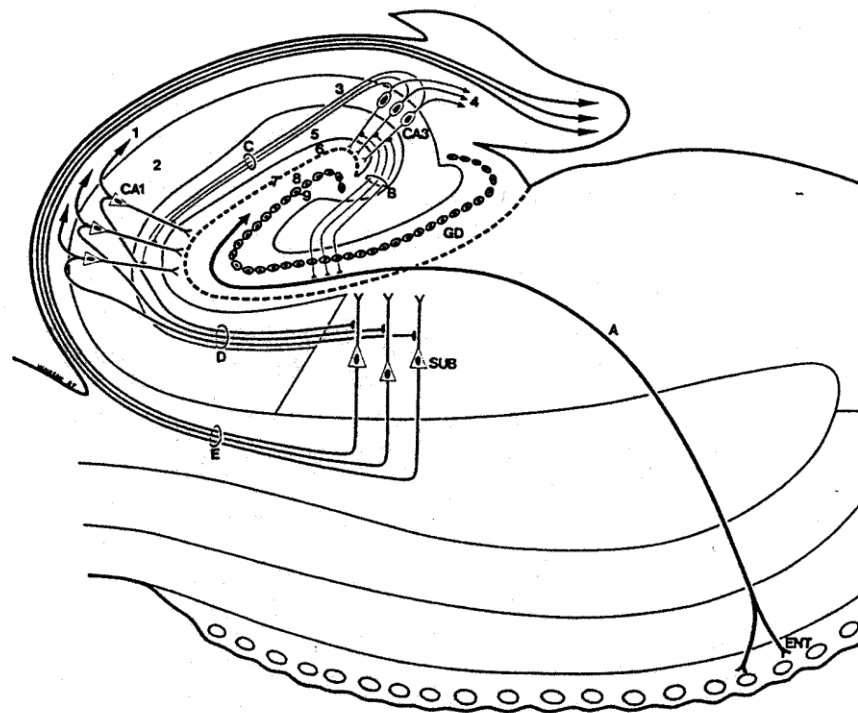


Abb. 4: Intrahippocampale Verbindungen in einer schematischen Darstellung des menschlichen Hippocampus. *Cornu ammonis*: 1 Alveus, 2 Stratum pyramidale (SP), 3 Schaffer-Kollateralen, 4 Axone von Pyramidenzellen, 5 Stratum lacunosum moleculare (SLM) und Stratum radiatum (SR), 6 Stratum moleculare (SM), 7 Sulcus hippocampalis, *Gyrus dentatus*: 8 Stratum moleculare, 9 Stratum granulosum, *SUB*: Subiculum (Duvernoy, 1998).

3.2 Versuchstiere

Die Behandlung der Ratten erfolgte nach den Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaft und den Anweisungen der lokalen Tierschutzbehörde innerhalb des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (G0327/98, G0328/98).

Für die Experimente an Hirnschnittpräparaten der Ratte wurden folgende Präparate verwendet: 65 hippocampale Schnittpräparate von 42 männlichen und weiblichen Wistar-Ratten, 84 hippocampale Schnitte von 27 männlichen Wistar-Ratten, die mit Pilocarpin behandelt worden sind, und 85 hippocampale Schnittpräparate von 21 männlichen und weiblichen Wistar-Ratten, welche der Kindlingprozedur unterlagen. Die Tiere entstammten der Tierzucht-Abteilung der Charité.

3.2.1 Pilocarpinmodell der Ratte

Erwachsenen männlichen Wistar-Ratten (240–300g) wurde 350 mg/kg Pilocarpinhydrochloride intraperitoneal (i. p.) verabreicht, nachdem sie 30 Minuten vorher 1 mg/kg KG s.c. Scopolaminhydrobromide erhalten hatten, um die peripheren Wirkungen des Pilocarpin zu minimieren und damit die Überlebensrate der Ratten zu erhöhen (Mello *et al.*, 1993). Nach der Pilocarpin-Injektion bekamen die Ratten einen Status epilepticus. Die ersten psychomotorischen Symptome zeigten sich 5–10 Minuten nach der Pilocarpin-Injektion und entwickelten sich innerhalb von 20–60 Minuten zu einem Vollbild eines Status des Stadiums V nach Racine, der nach 2 Stunden mit 1 mg/kg KG i. m. Diazepam beendet wurde. Nach dem Anfall wurden die Ratten in videoüberwachten Einzelkäfigen gehalten. Nach 5–34 Tagen entwickelten 5 von 7 Tieren spontane limbische Anfälle. Die Experimente wurden 3–4 Monate nach Status epilepticus durchgeführt.

3.2.2 Gekindelte Tiere

Die 180–200 g schweren männlichen Wistar-Ratten wurden mit 60 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylazinso i. m. tief anästhesiert, dass einerseits auf Schmerzreize keine motorischen und vegetativen Reaktionen mehr erfolgten, die Atmung jedoch andererseits nicht beeinträchtigt war. Vor dem Eingriff wurde zur Vermeidung von intraoperativen Infektionen das Fell über der Schädeldecke abrasiert sowie die Haut desinfiziert. Die Tiere wurden in einem stereotaktischen Rahmen über den Meatus acusticus externus beidseits sowie eine spezielle Gebisshalterung fixiert. Dann wurde an den literaturbekannten stereotaktisch ermittelten Koordinaten je ein Bohrloch für die Stimulations- und für die Ableitelektrode (EEG-Ableitung zur Charakterisierung der reizinduzierten epileptischen Entladungen) gesetzt. Nach Durchbohren des knöchernen Schädels wurde die Dura mit einer abgestumpften Nadel durchstoßen. Zur Stillung von etwaigen Blutungen wurde ein dünner Streifen Zellstoff in das Bohrloch eingeführt. Danach wurden zwei kleinere intraossäre Bohrlöcher gesetzt und in diese Schrauben eingeführt, die für eine stabile Verbindung zwischen der Schädeldecke und der am Ende der Operation auf diese aufgetragene Acrylpaste sorgen sollten. In je eins der beschriebenen Bohrlöcher wurde dann die Stimulationselektrode bis in den basolateralen Kern des Amygdalums und die Ableitelektrode in den dorsalen Hippocampus vorgeschoben. Anschließend wurden die Elektroden mit der Acrylpaste fixiert und die Enden in einer Plastikbuchse zusammengefasst, die als ‚Steckdose‘ für

die später durchgeführte Stimulation diente. Diese Buchse wurde ebenfalls mit der Acrylpaste an die Schädeldecke fixiert. Die Acrylpaste deckte den am Beginn der Operation freigelegten Teil der Schädeldecke vollständig ab. Die gesamte Operation dauerte etwa 40–60 Minuten. Kurz vor Ende der Operation wurde den Ratten zur systemischen Schmerztherapie 1,5 mg/kg KG Nubain (Nalbuphin) intraperitoneal appliziert. Postoperativ erfolgte die lokale Schmerztherapie mit 1 % Xylocain Gel. Postoperativ blieb das jeweilige Tier solange unter direkter Beobachtung des Experimentators, bis es vollständig aus der Narkose erwacht war. Ebenfalls abgewartet wurde der erste Harnabgang (fast immer vor vollständigem Erwachen aus der Narkose), um ein intra- oder postoperatives Nierenversagen auszuschließen. Postoperativ erholten sich die Ratten für 7–9 Tage und wurden in diesem Zeitraum unter den präoperativen Standardbedingungen gehalten. Nach dieser postoperativen Erholungsphase wurden die erwachsenen Tiere täglich (5-mal pro Woche) 1 Sekunde elektrisch gereizt (60 Hz, maximal 400 μ A, 0,1 ms Pulsdauer), bis sie 5- bis 10-mal „Stadium V“ nach Racine (fully kindled) (Racine, 1972) erreicht hatten, d. h. generalisierte Anfälle unmittelbar im Anschluss an die Reizung, jedoch keine spontane epileptische Aktivität außerhalb der Reizung zeigten.

3.3 Anfertigung hippocampaler Hirnschnittpräparate der Ratte

Die Ratten wurden mit einer Äther-Inhalations-Anästhesie betäubt und mit einer Kleintierguillotine geköpft. Die Galea wurde mit dem Skalpell in Längsrichtung gespalten, die Schädeldecke an den Nähten schonend geöffnet und die feste Hirnhaut (Dura) mit Augenschere und Pinzette entfernt. Das Hirn wurde an der kaudalen Grenze der vorderen Schädelgrube in Querrichtung scharf durchtrennt, der kaudale Pol (mit unter anderem dem Hippocampus) wurde aus dem Schädel gelöst und in 4–6 °C kalte karbogenisierte ACSF (Karbogen: 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid; ACSF artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit, engl.: *artificial cerebrospinal fluid*) transferiert. Die weiteren Schritte erfolgten auf einer eisgekühlten Petrischale mit einem Filterpapier, welches mit ACSF durchtränkt war. Das Kleinhirn wurde vom Großhirn, dann die Großhirnhälften im Balken getrennt. Die dorsalen Anteile der Hirnhälften wurden entfernt, dann die Hemisphären gekippt, sodass die basalen Seiten nach oben zeigten. Diese wurden auf dem Teflonzylinder der Schneidekammer (s. u.) mit Sekundenkleber (Cyanacrylatkleber der Firma UHU) befestigt. Die Schneidekammer wurde mit kalter karbogenisierter ACSF gefüllt und dann in ein Vibratom der Firma Campden

Instruments (Leicester, UK) gespannt. Die Horizontalschnitte wurden mit einer Dicke von 400 μm von „basal“ nach „dorsal“ bei langsamer Vorschubgeschwindigkeit mit regulierbarer horizontaler Vibrationsrate angefertigt. Mit einer Augenschere wurde die Hippocampusformation mit temporalem und entorhinalen Kortex (vgl. Abb. 3 und 4 oben) vom übrigen Gewebe gelöst und mit einem Spatel in die Messkammer (s. u.) überbracht. Mindestens eine Stunde Ruhepause wurde eingehalten, bevor mit den Experimenten begonnen wurde.

3.4 Schneidekammer

Ein 1 cm hoher Teflonzylinder (Durchmesser: 2,5 cm), mittig auf dem Boden einer offenen Plexiglasschale mit den Abmessungen 4 x 7 x 3 cm (B x L x H) positioniert, diente als Schneidekammer. An der Unterseite einer Plexiglasschale befand sich eine Metallschiene, mit der die Kammer am Vibratom befestigt wurde. Zur Vorbereitung der Experimente wurde die Kammer am Vortag knapp 1 cm hoch mit karbogenisiertem Perfusionsmedium (ACSF) gefüllt – gerade so viel, dass die runde Oberfläche des Teflonblocks nicht benetzt wurde – und danach tiefgefroren.

3.5 Aufbewahrung der Hirnschnittpräparate

Nach der Präparation wurden die Hirnschnitte in die Interface-Kammer transferiert, in der die Schnitte vor den elektrophysiologischen Messungen ruhten. Die Kammer bestand aus einem nach oben abgeschlossenen Polyvinylchloridgehäuse, das mit Magnetfüßchen stabil auf dem vibrationsgedämpften Stahltisch befestigt war. Auf diesem Stahltisch standen auch die Mikromanipulatoren, mit denen die Messelektroden manipuliert werden können. Unter zwei 1,5 x 3,3 cm großen Auslassungen (Messkammern) befand sich eine zweite Kammer, die teilweise mit destilliertem Wasser gefüllt war. Dieses wurde beheizt, um die Carbogengasmixtur auf die Kammertemperatur zu erwärmen und anzufeuchten. Das Gas wurde durch seitlich an jeder Kammer befindliche Austrittsschlitze in die Messkammern geleitet. Durch das erwärmte destillierte Wasser wurde auch die Messlösung geleitet, die der Versorgung der Hirnschnitte diente. Ein Temperatursensor regulierte die Temperatur des Carbogengases auf $34,5 \pm 0,5$ °C. Drei Lagen Kodak-Linsenpapier bildeten die Unterlage für die Präparate. In jeder Kammer mit dem Papier war ca. 0,5 ml Flüssigkeit, welche durch eine gasförmige Phase überschichtet war. Die Mess- bzw.

Aufbewahrungskammern wurden über Walzenpumpen (Gilson, Villiers, France) kontinuierlich mit 1,4–1,8 ml/min ACSF perfundiert, welche in einem Wasserbad vorgewärmt und karbogenisiert wurde. Der Wärmeverlust in den Transportschläuchen wurde ausgeglichen, indem die letzte Strecke in dünnen Polyethylenschläuchen durch das gewärmte Wasser im Gehäuse unter der Messkammer geführt wurde. Die Kammerdrainage verfügt über ein Abflussloch. Die Schnitte konnten unter diesen Bedingungen mehr als 18 Stunden vital gehalten werden. Am Ende des Experimentes wurden alle Schläuche und die Kammer mit reichlich destilliertem Wasser gespült. Mindestens einmal pro Woche wurde das System zusätzlich mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung gereinigt und dann mit Wasser ausgespült.

3.6 Mikroelektroden

Für die Experimente wurden, wie von Lux & Neher 1973 beschrieben, ionensensitive Mikroelektroden zur Messung extrazellulärer DC-Potenziale (engl.: *direct current*) und der extrazellulären Kaliumkonzentration, $[K^+]_o$, hergestellt. Dabei handelt es sich um doppelläufige Thetaglaskapillaren, die durch eine Trennwand elektrisch isoliert sind.

Thetaglas aus Borosilikat mit Durchmessern von 2,4–2,8 mm wurde auf etwa 8 cm Länge geschnitten. An beiden Enden wurde ein Schenkel um mehrere Millimeter gekürzt, um Kurzschlüsse durch Flüssigkeitsbrücken zu vermeiden. Die Enden wurden feuerpoliert. Die Kapillaren wurden mit konzentrierter Schwefelsäure und 30 % Wasserstoffperoxid (im Verhältnis 3 zu 1) für 30 Minuten gewaschen. Anschließend wurde das Glas in destilliertem Wasser über 24 Stunden gespült, sodass sich ein pH-Wert von annähernd 7.0 einstellte. Die Aufbewahrung der Glasrohlinge bis zur Verarbeitung erfolgte in Azeton. Nach Trocknung und Reinigung der Glaskapillaren mit Druckluft wurden die Elektrodenrohlinge in ein vertikales Ziehgerät (Typ „Chicago“) so eingespannt, dass sich eine Heizwendel genau auf halber Höhe des Glases befand. So konnten aus einem Rohling unter definierter Hitze und Zugkraft zwei Elektroden gezogen werden, deren Spitzen unter Sicht auf einen Durchmesser von 3-4 μm gebrochen wurden. Die spätere Referenzseite der Elektrode zur Messung von Feldpotenzialen wurde mit 154 mM Natriumchlorid (in Annäherung an das extrazelluläre Milieu) gefüllt, mit einem chlorierten Silberdraht versehen und mit Dentalwachs dicht verschlossen. Die spätere ionensensitive Seite wurde mit 100 mM Kaliumchlorid gefüllt, zum späteren Einziehen des Ionenaustauschers mit einem feinen Teflonschlauch

versehen und ebenfalls mit Dentalwachs luftdicht verschlossen. Vor dem Einziehen des Ionophoren war es notwendig, die hydrophile Oberfläche des Borosilikatglases auf der kaliumsensitiven Seite mit Silan (5 % Trimethyl-1-chlorosilan in 95 % CCl_4) zu beschichten, um das Einziehen des Ionenaustauschers zu ermöglichen und ein anschließendes Auslaufen zu verhindern. Die Elektrodenspitze wurde dazu in ein silanhaltiges Gefäß getaucht und Silan 3-mal mit Unter- bzw. Überdruck 200–500 μm in die Elektrodenspitze eingezogen und wieder ausgetrieben. Anschließend wurde der Ionenaustauscher „Cocktail A“ (Fluka 60031 Kalium Ionophor Selectophore®, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz, Valinomycin-basiert) per Unterdruck in die kalium-sensitive Seite der Elektrode bis zur oberen Silangrenze hineingezogen. Abschließend wurde der Teflonschlauch durch einen chlorierten Silberdraht ersetzt. Vor jedem Experiment wurden die ionenselektiven Elektroden mit drei bzw. 30 mM K^+ -haltiger Natriumchloridlösung auf ihre Sensitivität für Kalium in einem Differenzverstärker getestet. Für ionensensitive Elektroden verschiedener Typen sind bestimmte Werte bekannt, die gut funktionierende Elektroden erreichen. Die Halbwertszeiten der Elektroden, auf Veränderungen der $[\text{K}^+]_o$ anzusprechen, sollten bei 2–50 ms liegen (Lux & Neher, 1973). Akzeptiert wurde dabei eine Potenzialänderung von $57 \pm 2 \text{ mV}$ für eine zehnfache Änderung der Kaliumkonzentration wie sie für K^+ -sensitive Fluka-Elektroden bei einer physiologischen Hintergrundkonzentration von 154 mM NaCl bekannt ist. Die ionensensitive Seite der Elektrode misst Änderungen der langsamen Feldpotenziale gleichzeitig mit dem Ionensignal. Der Ionenaustauscher trennt die Konzentrationen der Ionen im EZR von der Lösung in der Elektrode (100 mM), ähnlich einer semipermeablen Membran. Das sich über die Ionenaustauschermembran einstellende Diffusionspotenzial wird von dem Verhältnis beider Konzentrationen bestimmt. Das Ionensignal ergibt sich aus der Subtraktion des Referenzseitensignals vom Gesamtsignal der ionensensitiven Seite über einen Differenzverstärker.

3.7 Reizelektroden

Die Reizelektroden wurden aus doppelumigen Borosilikatglas hergestellt. Der Herstellungsprozess verlief wie oben beschrieben. Es erfolgte aber ein Spitzenabbruch auf ca. 100–120 μm . Silberdraht mit ca. 5 cm Länge wurde mit Platindraht (Durchmesser 50 μm) umwickelt und verlötet. Je ein Draht wurde in ein Luminium gefädelt, sodass der Platindraht ca. 2 mm über die Elektrodenspitze ragte. Das obere

Ende der Drähte wurde mit Dentalwachs im Glas fixiert, wodurch die Drähte auch elektrisch isoliert wurden. Unter dem Mikroskop wurden die Platindrähte parallel ausgerichtet und dann mit verflüssigtem Schellack elektrisch isoliert und gleichzeitig befestigt.

3.8 Versuchsaufbau

Da vorrangig mit hochohmigen Elektroden gearbeitet wurde, die sehr empfindlich auf Bewegungen im Raum reagieren und auch Potenzialfelder im Raum aufnehmen, war es notwendig, den Messplatz durch einen Faradaykäfig abzuschirmen. Dieser umgab den schwingungsgedämpften Tisch, auf dem Messkammern und Mikromanipulatoren aufgebracht wurden. Für die Positionierung der Präparate und der Elektroden wurde eine aufrecht befestigte Zeisslupe genutzt, die an einer horizontalen Stange im Käfig befestigt war.

Für die Untersuchungen an Hirnschnittpräparaten der Ratte wurden Reizelektroden im Alveus positioniert. Dieser enthält hauptsächlich Axone aus Pyramidenzellen. Allerdings werden auch Informationen aus dem entorhinalen Kortex und benachbarten Strukturen über den alveären Teil des temporoammonischen Weges zur Area CA1 gesandt. Durch Reizung im Alveus wurden deshalb hauptsächlich Pyramidenzellen antidrom aktiviert. Synaptische Komponenten wurden durch Gabe eines Glutamatrezeptoren blockierenden Cocktails unterbrochen. Die Messungen in den Hirnschnitten mit kaliumsensitiven Referenzelektroden wurden in einer Tiefe von 80–120 μm unterhalb der Oberfläche des Präparates vorgenommen. Die Reizelektroden waren so platziert, dass ein Mindestabstand zwischen Mess- und Reizelektroden von mindestens 350 μm eingehalten wurde.

In der Region CA1 der Ratte wurden laminare Profile von transienten und langsamen Feldpotenzialen und reizinduzierten Veränderungen der $[\text{K}^+]_o$ mit bis zu 17 Positionen im Abstand von 50 μm erfasst. Die Positionen erfassten Signale aus allen Schichten der Area CA1 (SO, SP, SR und SLM) in einer rechtwinklig zur Zellschicht stehenden Linie. Die Ableitpositionen in Richtung Fissur erhielten ein positives Vorzeichen, in Richtung Alveus ein negatives.

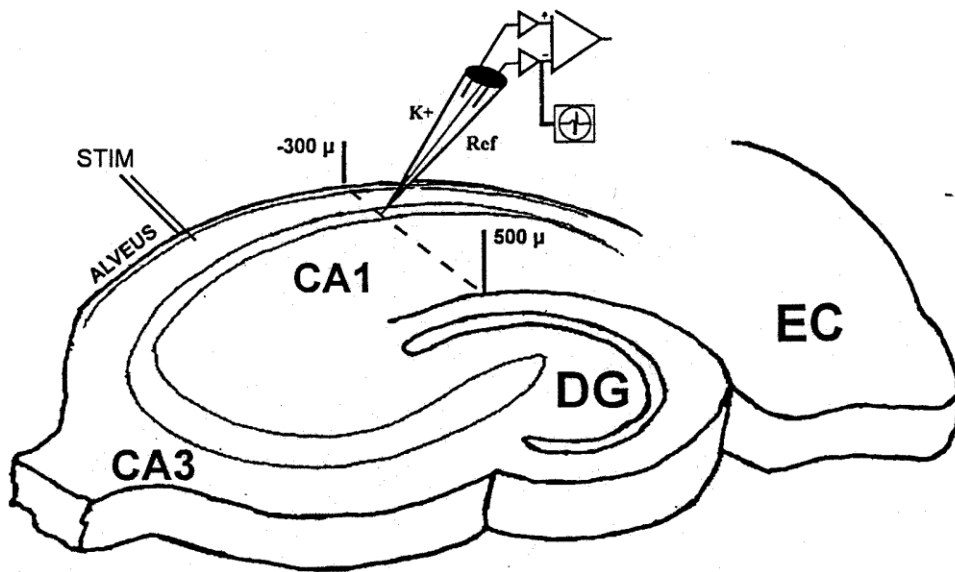


Abb. 5: Schematische Darstellung des hippocampalen Schnittpräparates Area CA1, CA3, Gyrus dentatus (DG) und medialem entorhinalen Kortex (EC). Die ionensensitive Mikroelektrode (K⁺/Ref) ist im Stratum pyramidale (SP) der Area CA1 positioniert. Sie wurde in 50 µm-Schritten rechtwinklig zum Verlauf des SP bis 300 µm in Richtung Alveus und bis 500 µm in Richtung Fissur bewegt. An jeder Position wurden schnelle Feldpotenzialtransienten, stimulusinduzierte [K⁺]_o-Anstiege und langsame Feldpotenziale aufgezeichnet. STIM = Position der Stimulations-Elektrode (Kivi, 2002).

3.9 Verwendete Perfusionsmedien

1. Normales Perfusionsmedium (Kontrollbedingungen, ACSF):

Was Zusammensetzung, pH-Wert und Temperatur angeht, wurde eine Nährlösung verwendet, die den natürlichen Gegebenheiten im ZNS der Ratte nahekommt. Sie enthielt (in mM): NaCl 129; KCl 3; NaH₂PO₄ 1,25; Glukose 10; MgSO₄ 1,8; CaCl₂ 1,6; NaHCO₃ 21. Da 25 % des Kalziums in der ACSF durch Bikarbonat gebunden wurde, betrug die effektive extrazelluläre Kalziumkonzentration 1,2 mM. Der pH-Wert betrug bei 34,5 °C unter äquilibriertem Karbogen 7,4 ± 0,5.

2. Bariumhaltiges Perfusionsmedium:

Um das Ausfällen von BaSO₄ zu verhindern, wurde in der bariumhaltigen Perfusionslösung das MgSO₄ durch MgCl₂ ersetzt. Die Endkonzentration von BaCl₂ betrug 2mM.

3. Weitere verwendete Substanzen:

- L-2-Amino-5-phosphonopentanoat (2-APV, 30 μM): Blockade des N-Methyl-D-aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor); Tocris.
- 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzol[f]quinoxalin-7-sulfonamid (NBQX, 10 μM): Blockade des α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat-Rezeptors (AMPA-Rezeptor); Tocris.

3.10 Datenerfassung

Auf einem Oszilloskop wurden die Feldpotenzialtransienten dargestellt; stimulusinduzierte Veränderungen der $[\text{K}^+]_o$ und die dazugehörigen langsamen Feldpotenziale wurden auf einem Thermoschnellschreiber (Astro-Med, Inc., West Warwick) ausgegeben. Die analogen Experimentaldaten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler (Cambridge Electronic Designs) gewandelt und dann mit einem IBM-kompatiblen Computer (486 MHz Taktfrequenz) erfasst. Über die chlorierten Silberdrähte wurden die Signale der Referenzseite und der ionensensitiven Seite der Elektrode einem Vorverstärker (10-fache Verstärkung) zugeführt. Die Kapazitätskompensation, die notwendig war, um die kapazitive Verbindung der Flüssigkeiten in der Elektrode und im Präparat auszugleichen, erfolgte im Differenzverstärker. Der Eingangswiderstand am Verstärkereingang für die ionensensitive Seite musste 10^{14} Ohm betragen, da der Elektrodenwiderstand der ionensensitiven Seite bei dem verwendeten Valinomycin-basierten Ionenaustauscher bis zu 10^{11} Ohm betragen konnte. Die Signale wurden dann einem Zwischenverstärker zugeführt, wo eine weitere Verstärkung und Filterung der Signale erfolgte. Feldpotenzialtransienten wurden mit der verwendeten Software in einer Taktfrequenz von 8 kHz aufgezeichnet, sodass Frequenzen bis zu 3 kHz erfasst werden konnten. Die Aufzeichnungsrate für die Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ und die langsamen Feldpotenziale betrug 100 Hz. Alle Signale wurden mit Signal-Averager-Software (Science Products) aufgezeichnet und nach dem Experiment ausgewertet. Zur weiteren Analyse wurde folgende Software benutzt: „Microsoft Office“ (Versionen 5.0, 6.0, 7.0, XP und 2010); „Microsoft CorelDraw“ (Versionen 8, 9, 12 und X4); Statistiksoftware: „IBM SPSS Statistics“, GNU-Software „PSP“ (Version 0.7.8.).

3.11 Auswertung und Untersuchungsparameter

3.11.1 Feldpotenzialtransienten

Transiente Feldpotenziale indizieren als Summenpotenziale synaptische Übertragungs- und Erregungsprozesse. Die Anzahl der aktivierten Zellen und die Synchronizität im Verbund bestimmen die Form und Amplitude des Feldpotenzials. Ausgewertet wurde die Amplitude des Populations-Spikes, die Populations-Spike-Breite, die Latenz von Beginn des Reizartefakts bis zur maximalen Negativität des Populations-Spikes, die Amplitude des positiven Nachpotenzials, sowie der Dauer des gesamten Feldpotenzialtransienten.

3.11.2 Berechnung der Kaliumkonzentrationen aus den gemessenen Spannungsänderungen

Die Messwerte, die mit ionensensitiven Mikroelektroden erhoben werden, folgen im sensitiven Bereich der Nernst-Gleichung:

$$E_i = S \log (I_1/I_2) \quad (1)$$

E_i entspricht dabei dem Wert des gemessenen Ionensignals in Millivolt, S der Steigung bei einer 10-fachen Konzentrationsänderung, I_2 und I_1 den Konzentrationen der Ionen vor Beginn einer repetitiven Reizung nach Zellaktivität und I_2 dem Maximalwert während repetitiver elektrischer Reizung entspricht.

Durch Umformung und Einsetzen der in der Perfusionslösung verwendeten Kaliumkonzentration von 3 mM ergibt sich:

$$I_2 = 10^{* \exp((E_i/-S)+\log(3))} \text{ [mM]} \quad (3)$$

Der Faktor „S“ wurde für jede Elektrode vor jedem Experiment individuell ermittelt.

Wegen der nicht absoluten Selektivität des Ionenaustauschers für Kaliumionen wäre es genaugenommen notwendig, in die Berechnung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen auch die Aktivität anderer Ionen wie Natrium, Kalzium oder Chlorid mit einzubeziehen (Amman, 1986). Praktisch von Bedeutung ist die Natriumkonzentration, die mit einem Selektivitätsfaktor von 0,02 bei 150 mM einen Fehler von 3 mM ergibt.

Störion	Natrium	Magnesium	Kalzium	Cäsium	Barium	Azetylcholin
K_{ij}	-3,2	-5,0	-4,5	-0,4	-5,0	-2,5

Tab. 1: Selektivitätskoeffizienten Valinomycin-basierter kaliumsensitiver Mikroelektroden. Daten nach Fluka, Selectophore, 1991, 30–31; Cäsium und Barium nach Ammann, 1986; Erläuterungen im Text.

Aus der Tabelle geht hervor, dass Valinomycin-basierte ionensensitive Mikroelektroden gegenüber Bariumionen nahezu insensitive sind. Die kaliumsensitiven Mikroelektroden waren weder für NBQX noch für 2-APV sensitiv.

3.11.3 Stromsenken-Dichte-Analyse (CSD-Analyse)

Die Entstehung von Feldpotenzialen im Extrazellulärraum geht auf neuronale Ensembleaktivität zurück. Ihnen liegen ionengetragene Ströme über neuronale und nichtneuronale Zellmembranen im Gewebeverbund zugrunde (Mitzdorf, 1985). Eine Stromsenke entsteht, wenn an einem Ort pro Zeiteinheit der Einstrom von positiven Ladungsträgern aus dem extrazellulären Kompartiment in intrazelluläre Kompartimente den Ausstrom von intra- nach extrazellulär überwiegt (Mitzdorf, 1985). Ich habe eine eindimensionale Stromsenken-Dichte-Analyse (CSD-Analyse) durchgeführt, da Voruntersuchungen ergeben hatten, dass der Potenzialabfall am stärksten in der Vertikalausrichtung der Pyramidenzell-Dendriten liegt, während in der y- und z-Achse die Potenzialgradienten relativ schwach sind.

Fehler bei der Berechnung der CSD sind also allenfalls von quantitativer, nicht aber von qualitativer Bedeutung (Holsheimer, 1987). Unter diesen Bedingungen kann die *eindimensionale* Form der CSD-Analyse zur Anwendung kommen:

$$I_m(z) = -\sigma z (\delta^2\phi/\delta^2z^2)$$

Praktisch ging ich so vor, dass ich die Differenzen zwischen 50 µm benachbarten Messpunkten gebildet habe und dadurch die Stromflussrichtung ermittelte. Aus diesen Werten wurde durch eine weitere Differenzbildung die Stromsenken-Quellenverteilung geschätzt.

3.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der Daten wurden folgende Rangsummentests verwendet: U-Test von Mann, Whitney für unverbundene Stichproben, der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen bei verbundenen Stichproben (SPSS-Software). Auf dichotome Binomialverteilungen unverbundener Stichproben wurden zweiseitig die Vierfeldertestverfahren Exakter Fisher-Test und χ^2 -Verteilung angewendet. Die Mittelwerte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Das Signifikanzniveau betrug $p \leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Reizinduzierte Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration, begleitende langsame Feldpotenziale und schnelle Feldpotenzialtransienten in der Area CA1 der Ratte

Reizung im Stratum radiatum induziert typische Potenzialänderungen im Stratum pyramidale der CA1-Region, die aus einem afferenten Volley, einer synaptischen Komponente und einem überlagerten Summenaktionspotenzial bestehen. Nach Applikation von NBQX und 2-APV blieben nur die afferenten Volley erhalten. Dies indizierte eine weitgehende Blockade synaptischer Transmission (Watkins *et al.*, 1982; Turski *et al.*, 1992). Im Weiteren wurden dann die meisten Experimente in Gegenwart von NBQX und 2-APV durchgeführt und der Alveus wurde gereizt. Bei Reizung des Alveus werden Fasern aktiviert, die überwiegend aus CA1-Pyramidenzellen entspringen und Informationen zum Subiculum weiterleiten. Typische Antworten auf eine Alveusreizung sind für Einzelreize in der Abbildung 6 dargestellt. Reizung des Alveus löste ein Summenaktionspotenzial aus, das von einem positiven Nachpotenzial gefolgt wurde. Repetitive Reizung löste einen Anstieg der Kaliumkonzentration aus, der von einem negativen Feldpotenzial begleitet wurde. Die Amplituden der Kaliumsignale und der Feldpotenziale variierten mit der Reizstärke, der Reizfrequenz und der Dauer der Reizung. Es wurden 10 s 20-Hz-Reizserien angewandt. Diese Frequenz wurde gewählt, weil dort die größten Signale auftreten. Der Anstieg der $[K^+]_o$ war im Stratum pyramidale am größten. Dort wurden die Anstiege der Kaliumkonzentration von einem negativen Potenzial begleitet, während im SR die langsamen Feldpotenziale positiv waren.

Um in die Kaliumpufferung einzugreifen, wurde der Effekt von 2 mM Ba^{2+} untersucht, der auf einer extrazellulären Blockade von 2P-Kaliumkanälen und vor allem von $K_{ir}4.1$ -Ionenkanälen beruht (Päsler *et al.*, 2007; Kivi, 2002). Ba^{2+} tritt daneben durch Kalziumkanäle ins Zellinnere und blockiert die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle, wodurch die Erregbarkeit der Zellen steigen kann. Abbildung 6 illustriert den Effekt von Ba^{2+} auf reizinduzierte schnelle Feldpotenziale, auf Kaliumsignale und auf die langsamen Feldpotenziale. Es zeigte sich, dass die reizinduzierten Signale stark zunahmten und diese Zunahme mit einer erhöhten Kaliumakkumulation verbunden war. Diese konnte Werte über 20 mM erreichen, was überraschend ist, da der Kaliumkonzentrationsanstieg normalerweise auf 12 mM begrenzt ist (Nixdorf-Bergweiler, 2004). Dies gilt auch, wenn spannungsabhängige Kaliumkanäle z. B. durch

4-AP oder TEA blockiert werden. Bei großen Reizstärken konnte der Kaliumanstieg Werte erreichen, durch die sich langsam ausbreitende Depolarisationen (*spreading depolarisation*, SD) ausgelöst wurden. Es wurde in der Folge darauf geachtet, Reizstärken zu verwenden, bei denen nur selten SDs ausgelöst wurden. Deshalb wurde die Reizintensität auf Werte begrenzt, die 60–80 % der maximalen Reizantwort evozierten. Durch mit 50 % der maximalen Reizintensität alvearer Einzelreize ausgelöste Summenaktionspotenziale (engl.: *population spike*, PS) im Stratum pyramidale wurden im Mittel von $3,8 \pm 0,5$ auf $6,2 \pm 0,9$ mV ($n = 11$ Hirnschnitte von 9 Tieren, $p = 0,023$) verstärkt. Die Dauer der PS nahm von $3,5 \pm 0,21$ auf $5,3 \pm 0,68$ ms zu ($n = 11$ Hirnschnitte von 9 Tieren, $p = 0,005$). Das positive Nachpotenzial vergrößerte sich von $3,1 \pm 0,35$ auf $5,9 \pm 0,53$ mV ($n = 11$ Hirnschnitte von 9 Tieren, $p = 0,004$). Während des Einwaschens wurden häufiger auch repetitive Entladungen beobachtet (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 6 gezeigt, vergrößerte Ba^{2+} auch die Kaliumsignale. Im Mittel wurden die Kaliumanstiege von $3,90 \pm 0,29$ mM auf $7,0 \pm 0,59$ mM vergrößert ($n = 11$ Hirnschnitte von 9 Tieren, $p = 0,002$). Barium hatte neben der starken Vergrößerung der Kaliumsignale auch einen Effekt auf die reizinduzierten langsamen Feldpotenziale (sfp). Diese waren unter Kontrollbedingungen im SP negativ und wurden nun weitgehend positiv. Die Veränderungen begannen ca. 14 Minuten nach Beginn der Ba^{2+} -Applikation und erreichten ihr Maximum nach ca. 30 Minuten. Die Effekte sind weitgehend reversibel nach Waschen mit normaler Ba^{2+} -freier ACSF nach ca. 90 Minuten. Da bei erhaltener synaptischer Transmission gelegentlich Werte von mehr als 20 mM erreicht wurden und dann gehäuft Spreading-Depolarisationen auftraten, wurden die nächsten Messungen zu laminaren Profilen an Hirnschnitten von Kontrolltieren in Gegenwart von NBQX und 2APV durchgeführt. Hierdurch wurde die glutamaterge synaptische Übertragung blockiert und die reizinduzierten Kaliumsignale verkleinert. Unter diesen Bedingungen konnte die Ortsabhängigkeit der Kaliumakkumulation untersucht werden. Sie war bei repetitiver Reizung aus dem Alveus unter Kontrollbedingungen im SP am größten und nahm in Richtung auf das Stratum lacunosum moleculare stark ab. Auch in Richtung auf den Alveus sank die Amplitude der Kaliumsignale. Ebenso waren die sfps ortsabhängig. Sie waren bei Entfernungen von mehr als ca. 150 μ m vom SP im Stratum radiatum (SR) immer positiv. Wenn in Gegenwart von NBQX und APV mit ca. 50 % der maximalen Reizstärke im Alveus gereizt wurde, wurden im SP Kaliumamplituden von $4,0 \pm 0,13$ mM ($n = 15$ Hirnschnitte von 9 Tieren) registriert. Eine Erhöhung der Reizintensität auf ca. 90 % der maximalen

Reizintensität bewirkte eine Zunahme der Kaliumamplituden auf $4,8 \pm 0,28$ mM (n = 8 Hirnschnitte von 8 Tieren).

In Abbildung 7 A sind die Amplituden der langsamen Feldpotenziale während alvearer Reizung im laminaren Profil dargestellt. Aus diesen Feldpotenzialen lässt sich die Stromsenkendichte (CSD, Abb. 7 B) berechnen. Es zeigt sich eine große Stromsenke im SP, die von Stromquellen bei 50 μ m in beiden Richtungen vom SP flankiert wird. Stromquellen und -senken traten auch in weiteren Abständen zum Stratum pyramidale auf. In Abbildung 7 C sind die laminaren Profile der Kaliumsignale dargestellt. Abhängig von der Reizintensität waren die Signale unterschiedlich groß, aber immer maximal im SP. In Abbildung 7 D wurden die Werte der CSD-Analyse über den Verlauf der Reizung integriert. Es zeigte sich, dass die Stromsenken im SP maximal waren und über den ganzen Verlauf der weiteren Ableitpunkte kleine Stromquellen und -senken beobachtet werden konnten.

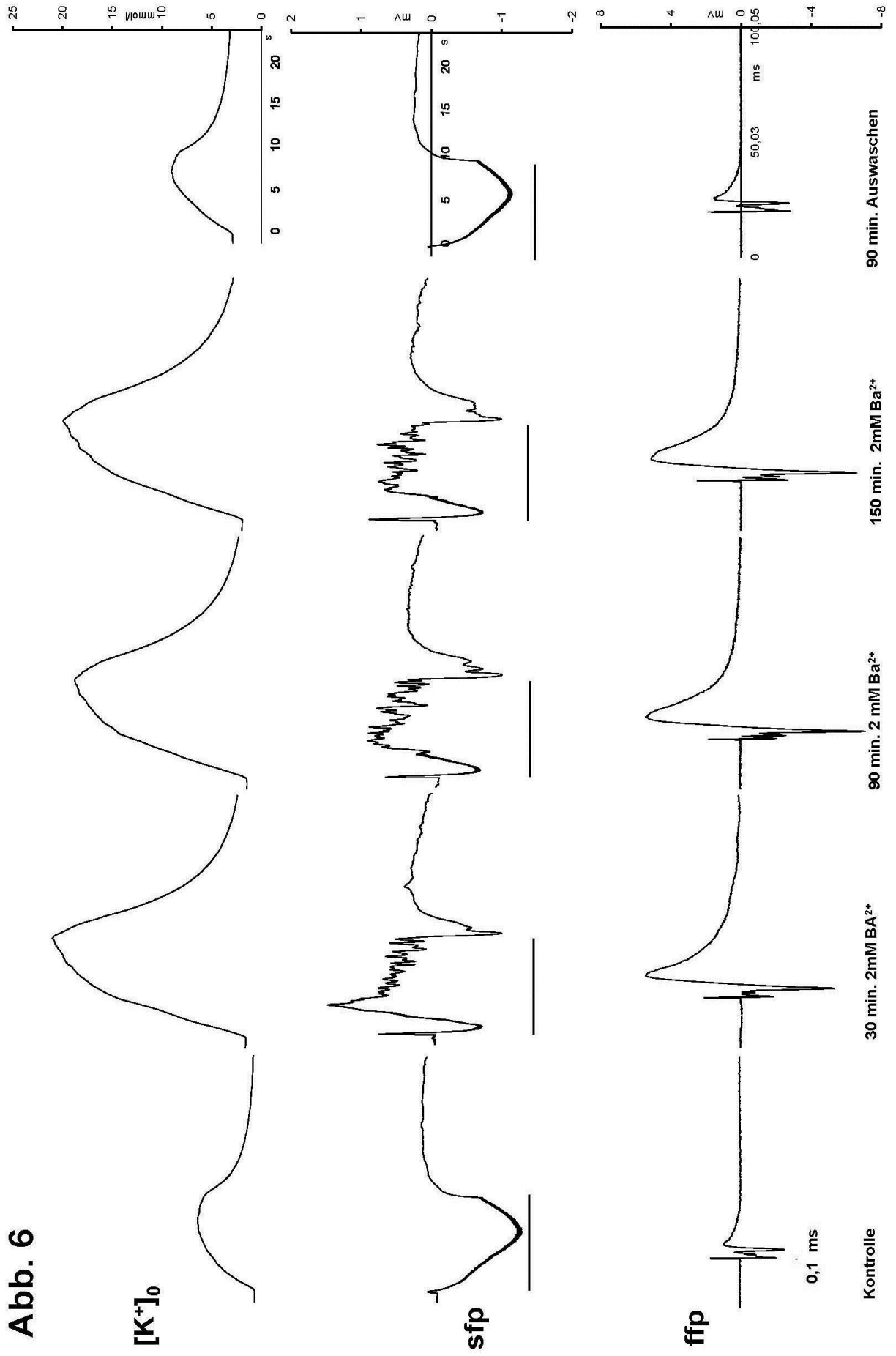
Abb. 6: Effekte von Barium auf reizinduzierte Signale in der CA1-Region des Hippocampus

Oben: Effekt auf reizinduzierte Kaliumsignale. Gereizt wurde der Alveus mit 20 Hz für 10 s. Dargestellt sind Signale ohne Applikation von Barium (Kontrolle) 30, 90 und 150 Minuten nach Beginn der Bariumapplikation sowie 90 Minuten nach Beginn des Auswaschens von Barium.

Mitte: Effekt von Barium auf reizinduzierte langsame Feldpotenziale, die simultan zu den Kaliumsignalen erfasst wurden.

Unten: Effekt von Barium auf einzelreizinduzierte Signale. Gereizt wurde der Alveus mit 0,1 ms Pulsen. Es wurde die gleiche Reizstärke wie für die repetitiven Reizserien verwandt. Die Dauer der Reizserien wird durch die horizontalen Balken angezeigt.

Abb. 6



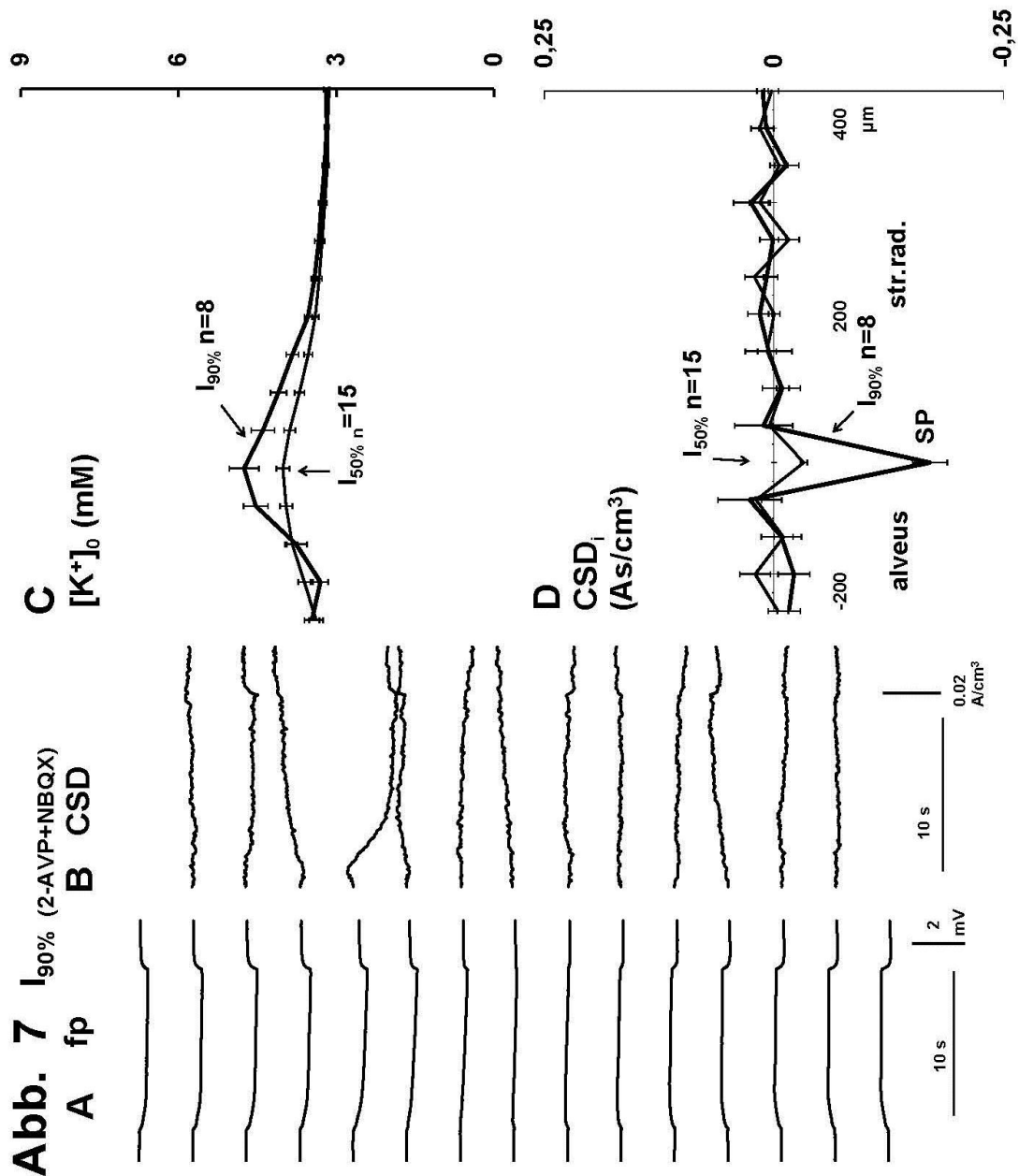


Abb. 7: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen bei unterschiedlichen Reizintensitäten unter NBQX/APV-Bedingungen

- Laminare Profile von reizinduzierten Feldpotenzialen ausgelöst mit 90 % der maximalen Reizintensität in Gegenwart der Glutamaterezeptorblocker NBQX und APV. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplitudenzeichnungen betreffen alle Signale.
- Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
- Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen wurden zwei Reizintensitäten. „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
- Durchschnittliche CSD-Werte mit 50 % Intensität (dünne Linie) und 90 % Intensität (dicke Linie). Schnitte wurden Normaltieren entnommen.

4.2 Wirkungen von Barium auf laminare Profile der Änderungen der Kaliumkonzentration und der langsamen Feldpotenziale bei Reizung des Alveus

In Abbildung 8 sind Experimente zusammengefasst, bei denen laminare Profile langsamer Feldpotenziale und der Kaliumkonzentrationsänderungen vor und nach Applikation von Ba^{2+} (2 mM) bei erhaltener glutamaterger synaptischer Transmission gemessen wurden. In Abbildung 8 A sind die laminaren Profile der Feldpotenziale für eine Beispielmessung dargestellt. Man erkennt die relativ großen negativen Feldpotenziale im SP, die sich in einiger Entfernung (150 μ m) vom SP im SR in positive Potenziale umkehren. In Abbildung 8 B ist die aus diesen Potenzialen berechnete Stromsenkendichteverteilung dargestellt. Man sieht eine deutliche Senke im SP. In 8 C und D sind die Wirkungen von Ba^{2+} auf diese Signale dargestellt. Die negativen Potenziale im SP werden weitgehend blockiert, wenn man von einer initialen Negativität absieht und kehren sich in positive Signale um. Entsprechend verändern sich die Profile der CSD. In Abbildung 8 E ist die Wirkung auf die laminaren Profile der Kaliumkonzentration dargestellt. Man sieht, dass das laminare Profil sich qualitativ nicht ändert. Der Anstieg der Kaliumkonzentration blieb weiter maximal im SP. Allerdings wurden die Anstiege der Kaliumkonzentration in allen Schichten der CA1-Region deutlich vergrößert und die Amplitude der Kaliumsignale am Maximalwert nahm um ca. 73 % zu (9,2 \pm 0,55 mM, n = 15 von 9 Tieren; zu 12,57 \pm 0,62 mM, n = 18 von 14 Tieren; p = 0,008). In 8 F wurde das laminare Profil der integrierten CSD dargestellt. Dazu wurden die Werte während der Reizung gemittelt, mal 10 s genommen und so ein integriertes Signal ermittelt. Wie in den Kontrollmessungen der Abbildung 7 ergab sich eine große Senke im SP, begleitet von Quellen in den benachbarten Schichten. In Gegenwart von 2 mM Ba^{2+} wurde diese Senke in eine Quelle gewandelt.

Wie erwähnt, konnte die Behandlung mit Ba^{2+} bereits unter Kontrollbedingungen erhebliche Erregbarkeitssteigerungen bewirken und es traten vermehrt epileptiforme Entladungen und sogar Spreading Depolarisations auf. Um diese Veränderungen zu blockieren, wurden weitere Messungen in Gegenwart von NBQX und 2-APV durchgeführt, wodurch die glutamaterge synaptische Übertragung blockiert wurde (Abb. 9). Auch unter diesen Bedingungen blieb die Kaliumakkumulation von Reizstärke, Reizdauer und Reizfrequenz abhängig. Allerdings waren die Signale deutlich reduziert, da rekurrente Erregungen anderer Zellen – insbesondere von Interneuronen – ausblieben. Unter diesen Konditionen blieb nur der Beitrag der durch antidrome Aktivie-

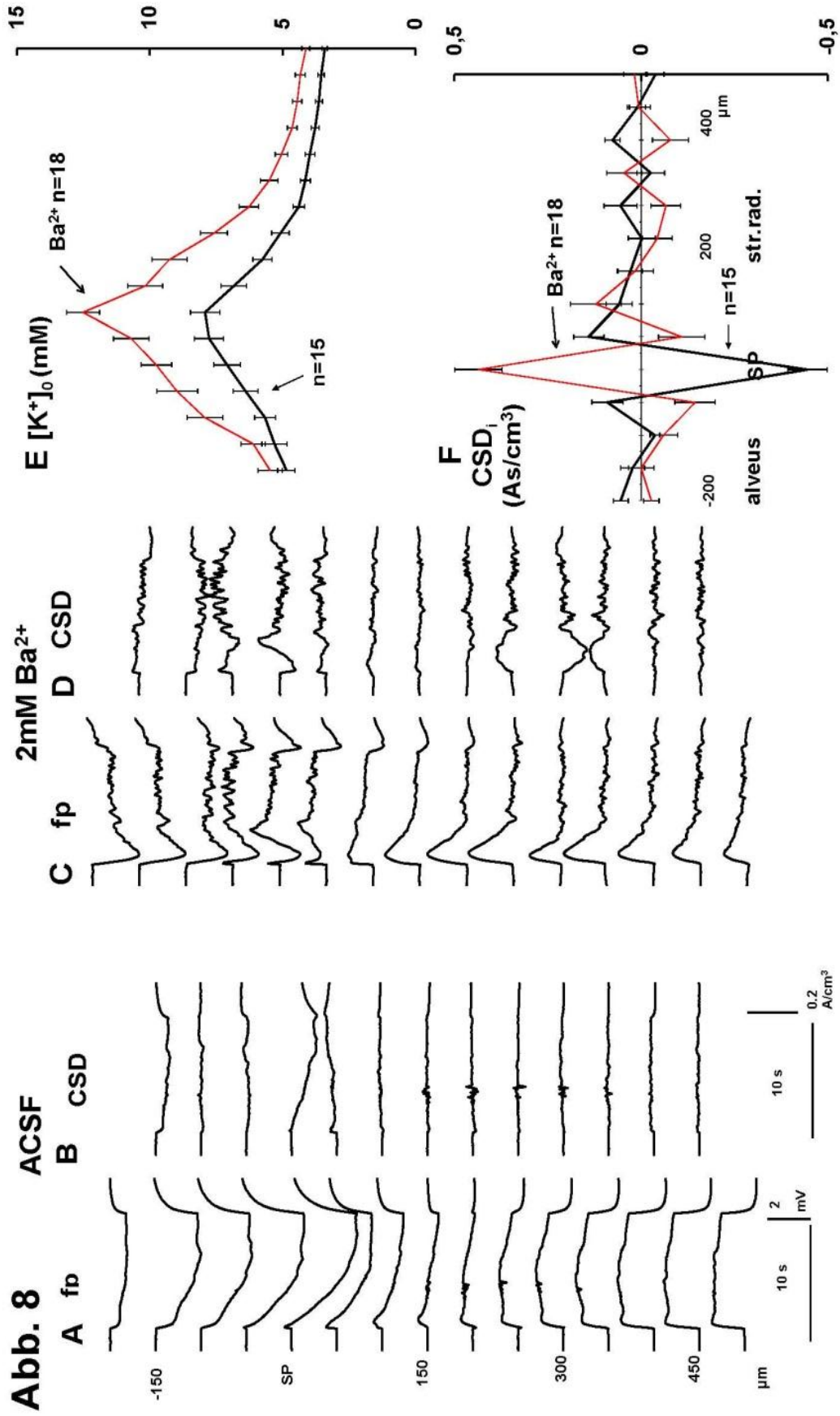


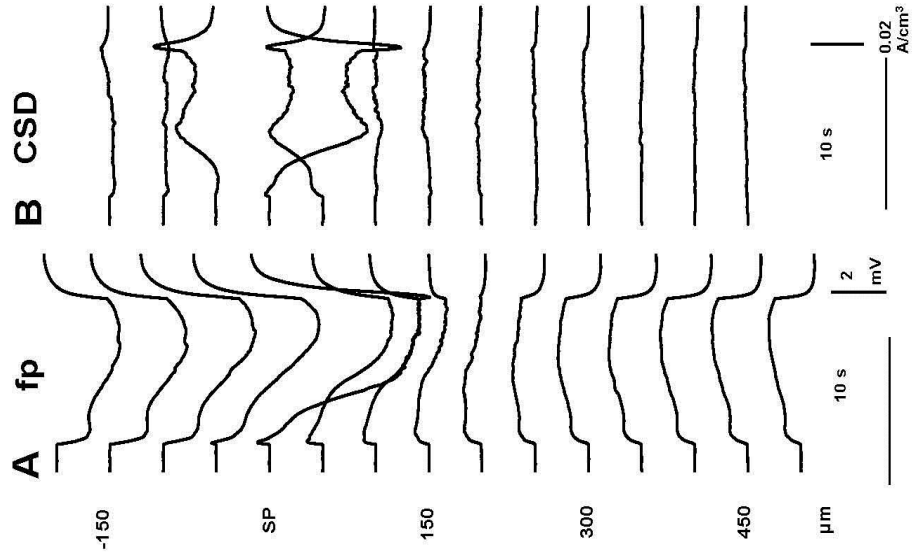
Abb. 8: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen unter ACSF- und Bariumbedingungen

- A. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen unter ACSF-Bedingungen. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplitudeneichungen betreffen alle Signale.
 - B. Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - C. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart von 2mM Ba²⁺.
 - D. Das aus den Feldpotenzialen in C errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - E. Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen wurden Signale ausgelöst in ACSF (schwarze Linie) und in Gegenwart von Ba²⁺ (rote Linie). „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
 - F. Durchschnittliche CSD-Werte in ACSF (schwarze Linie) und unter Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). Schnitte wurden Normaltieren entnommen.
-

rung bedingten neuronalen Signale erhalten. Tatsächlich bleibt die Amplitude der Populations-Spikes nach Einwaschen von NBQX und APV fast unverändert. Die Amplitude nahm nicht signifikant von $4,3 \pm 0,79$ auf $4,0 \pm 0,51$ mV ab ($n = 50$ Hirnschnitte von 27 Tieren, $p = 0,269$). Allerdings nahm die Dauer der PS geringfügig von $2,3 \pm 0,1$ auf $2,0 \pm 0,1$ ms ab ($p = 0,003$). Besonders stark hat die positive Nachschwankung abgenommen. Sie verringerte sich von $1,2 \pm 0,32$ auf $0,8 \pm 0,14$ mV ($p = 0,005$).

Durch Reizung freigesetztes Kalium kann Gliazellen depolarisieren und damit zur Genese langsamer Potenziale beitragen. In der Beispielmessung in Abbildung 9 A ist ein laminares Profil dargestellt und in B die dazugehörige CSD. Unter Kontrollbedingungen waren wiederum große negative Potenziale während der repetitiven Reizung beobachtbar. Nach Applikation des Glutamatrezeptoren blockierenden Cocktails waren die Signale deutlich kleiner und entsprechend wurden auch die Werte in der Senken-Quellen-Verteilung kleiner (Abb. 9 C und D). Im Abbildungsteil E sind die laminaren Profile der Kaliumkonzentrationsänderungen illustriert. Auch unter diesen Bedingungen blieb das laminares Profil der Kaliumkonzentrationsänderungen qualitativ gleich. Allerdings wurde der maximale Kaliumanstieg stark abgeschwächt. Die Abnahme der Kaliumsignale betrug ca. 37 % ($6,4 \pm 0,77$ mM, $n = 25$ Hirnschnitte von 15 Tieren, zu $4,0 \pm 0,22$ mM, $n = 27$ Hirnschnitte von 11 Tieren; $p < 0,001$). Hierbei ist zu beachten, dass es sich um unterschiedliche Messserien mit unabhängigen Daten handelt.

Abb. 9 ACSF



2-APV, NBQX

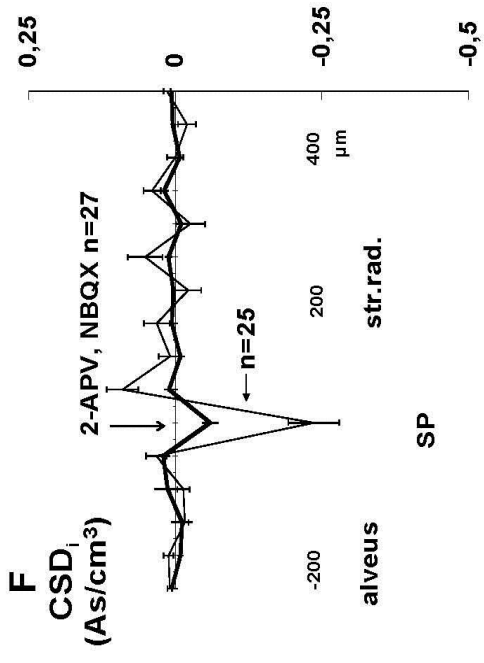
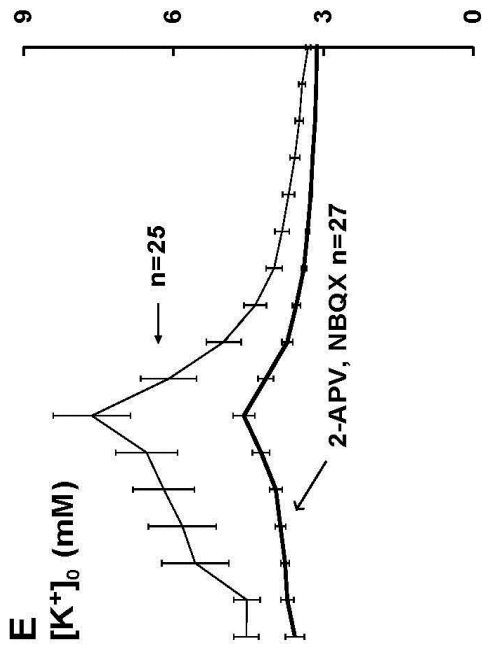
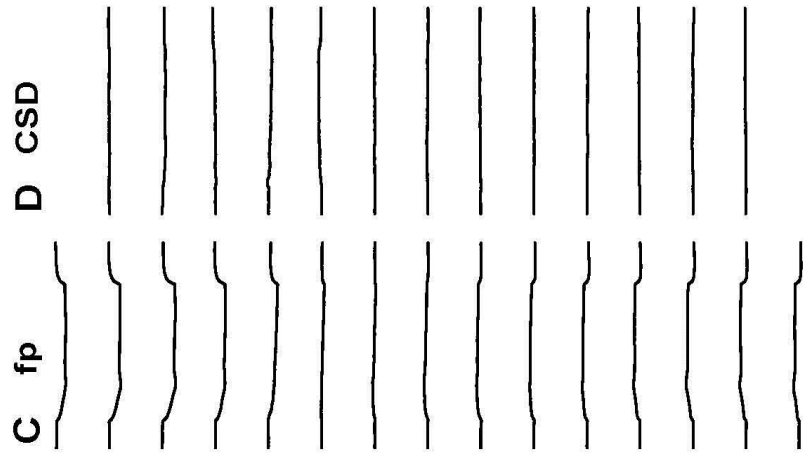
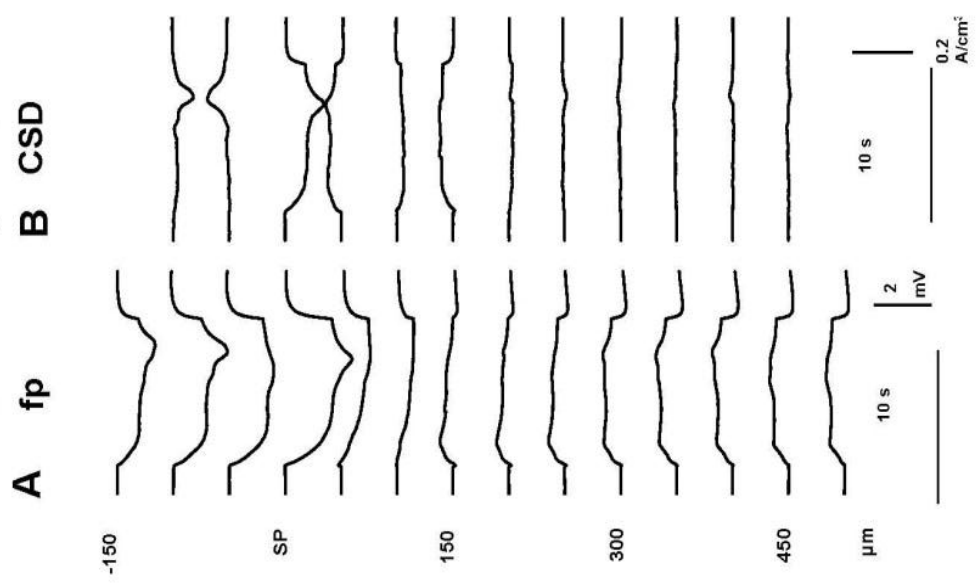


Abb. 9: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen unter ACSF- und NBQX/APV-Bedingungen

- A. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen unter ACSF-Bedingungen. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplitudeneichungen betreffen alle Signale.
 - B. Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - C. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart der Glutamat-rezeptorblocker NBQX und APV.
 - D. Das aus den Feldpotenzialen in C errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - E. Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen wurden Signale ausgelöst in ACSF (dünne Linie) und unter NBQX/APV-Bedingungen (dicke Linie). „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
 - F. Durchschnittliche CSD-Werte in ACSF (dünne Linie) und unter NBQX/APV-Bedingungen (dicke Linie). Schnitte wurden Normaltieren entnommen.
-

In F sind die laminaren Profile der integrierten CSD-Signale dargestellt. Qualitativ war das laminare Profil nicht verändert. Die große Stromsenke im SP blieb erhalten, wurde allerdings stark um ca. 75 % reduziert. Abbildung 10 zeigt ein anderes Experiment, in dem ein Kontrollprofil in Gegenwart von NBQX und 2-APV ermittelt wurde. Die Ergebnisse ließen sich gut mit den Daten der Abbildung 9 vergleichen. Anschließend wurde 2 mM Ba²⁺ appliziert. Auch in diesem Experiment war die Stromsenke im SP in eine Quelle umgewandelt worden. Im Mittel dieser Experimente bewirkte Ba²⁺ wieder einen starken Anstieg der [K⁺]_o-Signale. Die Amplitude nahm um ca. 62 % zu (4,2 ± 0,49 mM, n = 15 Hirnschnitte von 10 Tieren, zu 6,8 ± 0,50 mM, (n = 13 Hirnschnitte von 9 Tieren; p < 0,001) und die Senke wurde in eine starke Quelle umgewandelt. Auch in diesen Experimenten wurden die Wirkungen von Barium auf antidrom vom Alveus ausgelöste Signale in Gegenwart von NBQX und APV ausgewertet. Die Effekte waren gut mit den Kontrollmessungen ohne Glutamat-rezeptorantagonisten vergleichbar. Die Amplitude der PS nahm von 3,2 ± 0,7 auf 4,9 ± 0,9mV (n = 30, p < 0,001) zu. Die Dauer der PS wurde von 3,0 ± 0,3 auf 10,8 ± 1,4 ms verlängert (p < 0,001). Auch die Nachpositivität nahm von 0,6 ± 0,1 auf 1,8 ± 0,3 mV (p = 0,005) zu.

Abb. 10 2-APV, NBQX



Ba²⁺ 2-APV, NBQX

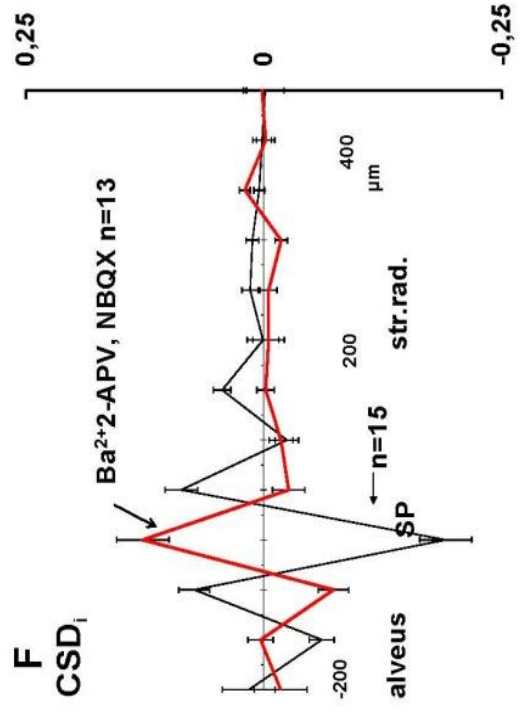
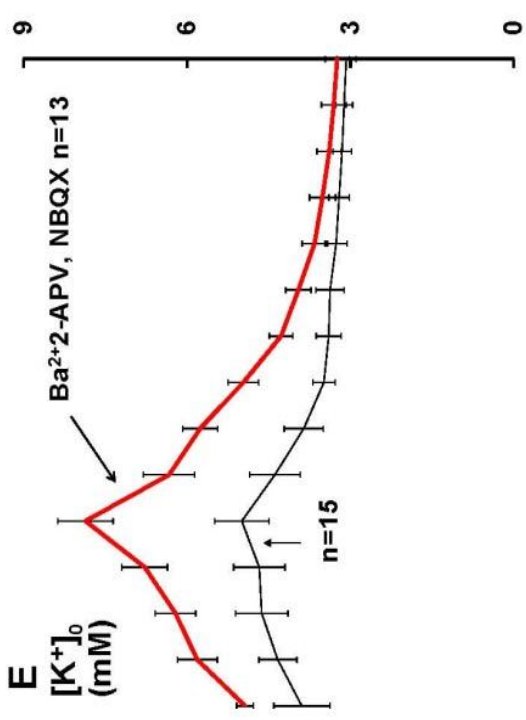
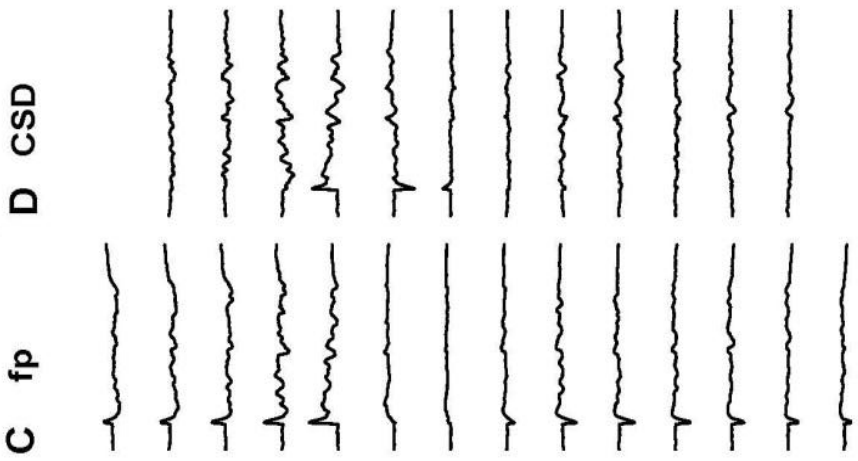


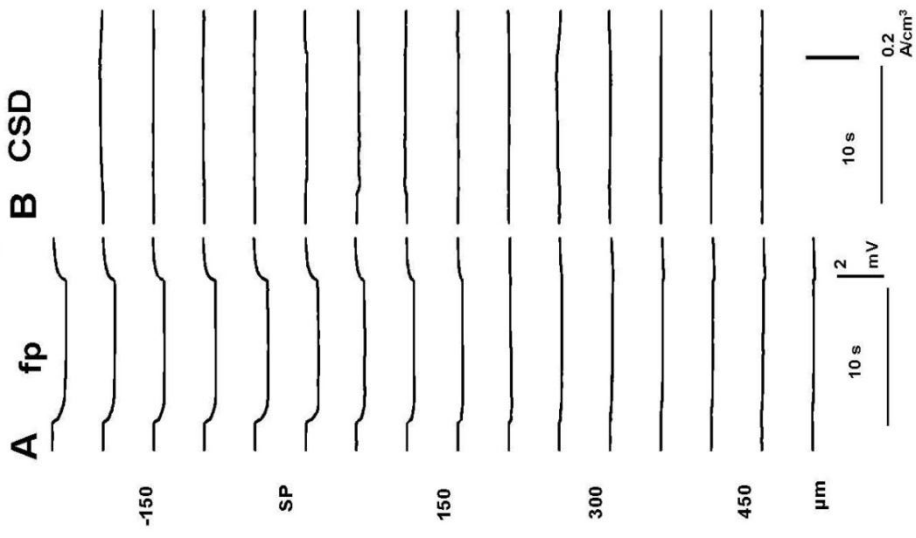
Abb. 10: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen unter NBQX/APV- und NBQX/APV+Ba²⁺-Bedingungen

- A. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart der Glutamatrezeptorblocker NBQX und APV. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplitudeneichungen betreffen alle Signale.
 - B. Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - C. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart von NBQX, APV und 2 mM Ba²⁺.
 - D. Das aus den Feldpotenzialen in C errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung
 - E. Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen werden Signale ausgelöst unter NBQX/APV-Bedingungen (schwarze Linie) und NBQX/APV+Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
 - F. Durchschnittliche CSD-Werte unter NBQX/APV-Bedingungen (schwarze Linie) und NBQX/APV+Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). Schnitte wurden Normaltieren entnommen.
-

4.3 Wirkungen von Barium auf laminare Profile der Feldpotenziale und der Kaliumkonzentration in Hirnschnittpräparaten von Tieren, die nach Behandlung mit Pilocarpin eine Epilepsie entwickelten

In den Hirnschnittpräparaten von mit Pilocarpin behandelten Tieren war die Zahl der Nervenzellen in der CA1-Region deutlich reduziert. Gleichzeitig entwickelte sich eine Astrozytose. Dennoch ließen sich auch in diesen Präparaten in der Regel signifikante Änderungen der Kaliumkonzentration induzieren (Abb. 11). Diese waren ebenso wie die durch Einzelreize evozierten Signale deutlich kleiner und es konnte deshalb auf die Gabe von NBQX und APV verzichtet werden. Die reizinduzierten Kaliumsignale im SP waren mit relativ kleinen Senken assoziiert (Abb. 11 F). Die Applikation von Barium bewirkte einen nur noch geringen Anstieg der Kaliumsignale um ca. 22 % (5,1 ± 0,6 mM, n = 7 Hirnschnitte von 7 Tieren, zu 6,3 ± 0,72 mM, n = 7 Hirnschnitte von 7 Tieren). Diese Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Dennoch wurde auch unter diesen Bedingungen an Hirnschnitten epileptischer Tiere eine Umkehr der Stromsenke in eine Quelle beobachtet. Im Vergleich von Kontrolltieren und mit Pilocarpin behandelten epileptischen Tieren ergab sich kein Unterschied in der Amplitude des PS bei Reizung aus dem Alveus. Der Effekt von Ba²⁺ auf die Dauer der PS war signifikant kleiner als an Kontrolltieren, während der Effekt von Ba²⁺ auf die Postspikepositivität im Vergleich zu Kontrolltieren größer war (p < 0,005).

Abb.11 Pilocarpintier
ACSF



C fp **D** CSD

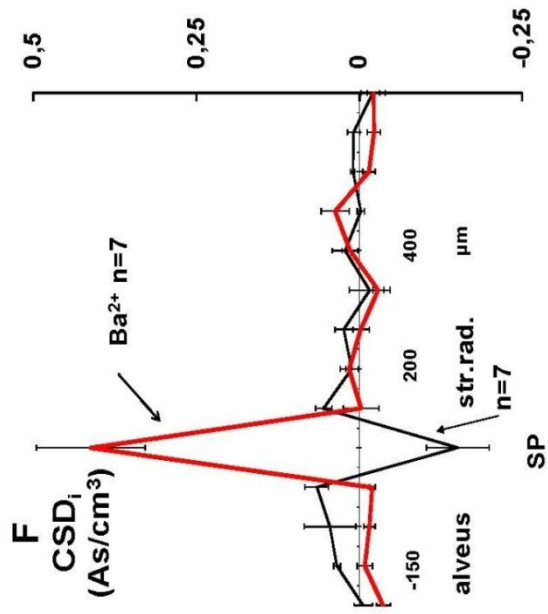
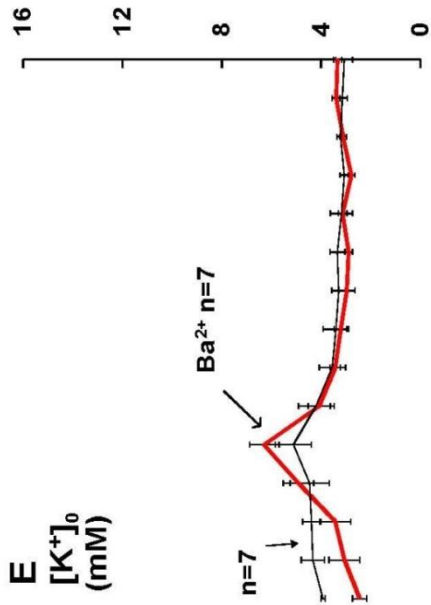
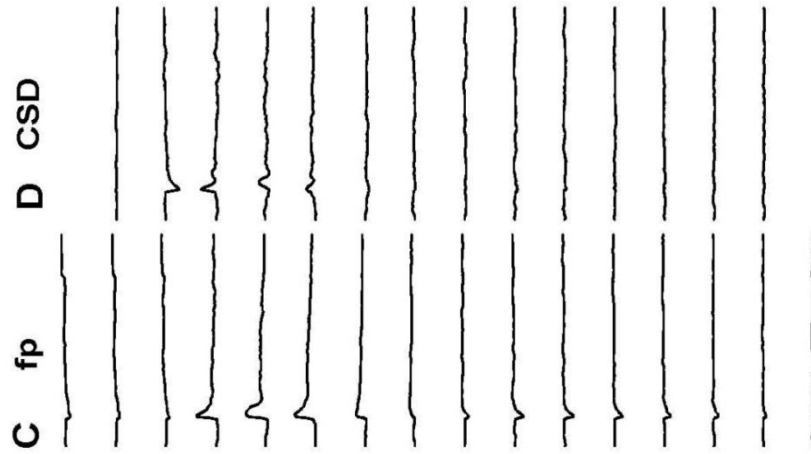


Abb. 11: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen von Pilocarpintieren unter ACSF- und Ba²⁺-Bedingungen

- A. Laminare Profile von reizinduzierten Feldpotenzialen unter ACSF-Bedingungen. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplitudeneichungen betreffen alle Signale.
 - B. Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - C. Laminare Profile von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart von 2mM Ba²⁺.
 - D. Das aus den Feldpotenzialen in C errechnete Profil der Stromsenkendichteverteilung.
 - E. Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen werden Signale ausgelöst in ACSF (schwarze Linie) und unter Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
 - F. Durchschnittliche CSD-Werte in ACSF (schwarze Linie) und unter Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). Schnitte wurden Pilocarpintieren entnommen.
-

4.4 Untersuchungen der Effekte von Barium an gekindelten Tieren

Bei der Kindlingepilepsie werden durch repetitive Reizungen in der Amygdala oder anderen Strukturen des limbischen Systems epileptische Anfälle induziert, die im Laufe der Reizwiederholungen zunehmend generalisieren. Dies wird durch die Racine-Skala beschrieben. Die Tiere wurden demgemäß nach fünf konsekutiven Stadium-V-Anfällen untersucht. Durch diese Anfälle ist es noch nicht zu einem signifikanten Verlust der Nervenzellen gekommen und auch eine Astrozytenaktivierung ist selten zu beobachten (Sutula). Allerdings nimmt die Erregbarkeit im Gewebe zu. In Abbildung 12 sind typische Daten aus dieser Experimentalserie dargestellt. Die laminaren Profile wurden an diesen Tieren mit denen von Kontrolltieren gut vergleichbar (Abb. 12 A–D). Erneut wurde eine Stromsenke im SP beobachtet (Abb. 12 F). Nach Applikation von Ba²⁺ kam es zu einer starken Zunahme der Kaliumsignale (Abb. 12 E). Insgesamt nahm die Amplitude der Kaliumsignale um ca. 105 % zu (6,6 ± 0,42 mM, n = 13 Hirnschnitte von 6 Tieren, zu 13,6 ± 1,07 mM, n = 15 Hirnschnitte von 9 Tieren, p < 0,000). Assoziiert waren die Kaliumsignale nun mit einer Quelle im SP (Abb. 12 E). Auch die Effekte von Ba²⁺ auf die Amplitude und Dauer der PS sowie der Nachpotenziale waren qualitativ gut mit den Befunden an Kontrolltieren vergleichbar. Allerdings waren die Effekte von Ba²⁺ signifikant größer als an Kontrolltieren (n = 12 Hirnschnitte von 9 gekindelten Tieren, p < 0,005).

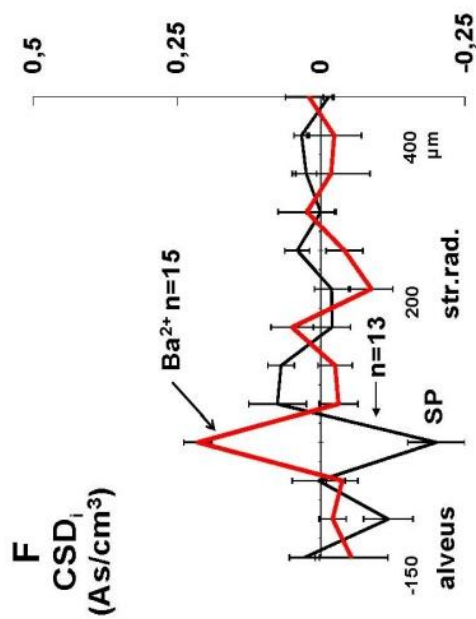
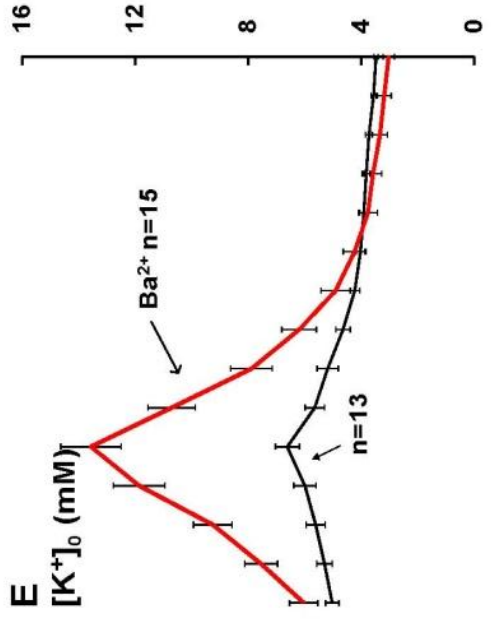
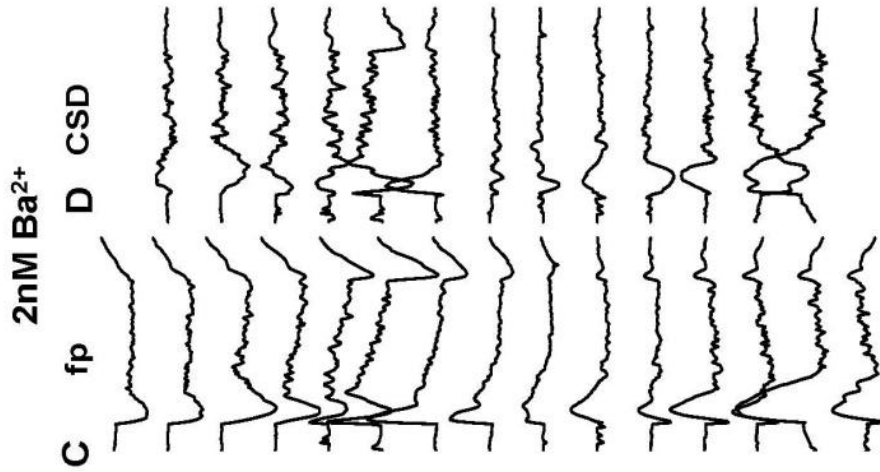
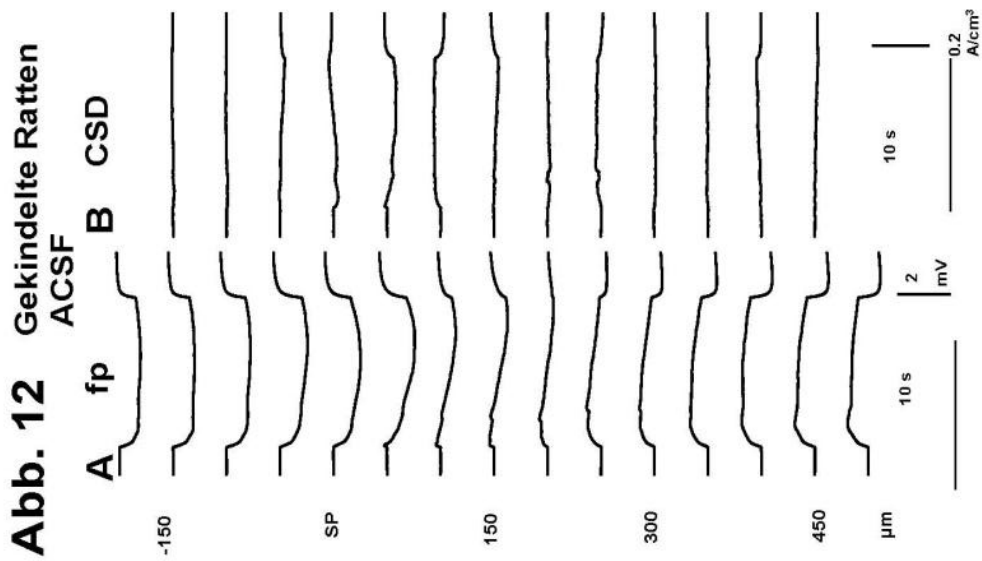


Abb. 12: Laminare Profile von Feldpotenzialen, Stromsenkendichteverteilung und von Kaliumsignalen gekindelter Tiere unter ACSF- und Ba²⁺-Bedingungen

- A. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen unter ACSF-Bedingungen. Die Reizserie wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Die Amplituden-eichungen betreffen alle Signale.
 - B. Das aus den Feldpotenzialen in A errechnete Profil der Stromsenkendichte-
verteilung.
 - C. Laminare Profil von reizinduzierten Feldpotenzialen in Gegenwart von 2mM Ba²⁺.
 - D. Das aus den Feldpotenzialen in C errechnete Profil der Stromsenkendichte-
verteilung.
 - E. Gemittelte laminare Profile reizinduzierter Kaliumsignale. Verglichen werden Signale ausgelöst in ACSF (schwarze Linie) und unter Ba²⁺-Bedingungen (rote Linie). „n“ gibt die Zahl der genutzten Hirnschnittpräparate an.
 - F. Durchschnittliche CSD-Werte in ACSF (schwarze Linie) und unter Ba²⁺-
Bedingungen (rote Linie). Schnitte wurden gekindelten Tieren entnommen.
-

5 Diskussion

Meine Untersuchungen zeigen, dass in Hirnschnitten von Kontrolltieren Barium reizinduzierte Kaliumsignale vergrößert und dass dieser Effekt zwar an Tieren mit einer Kindlingepilepsie bestehen bleibt, nicht aber bei Tieren, die eine Epilepsie mit spontanen Anfällen nach einem durch Pilocarpin induzierten Status epilepticus entwickelt hatten. Barium blockiert verschiedene Kaliumkanäle, allerdings mit unterschiedlicher Affinität (Päsler *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2007). Es hat des Weiteren die Eigenschaft, als Ladungsträger Ca²⁺-Ionen substituieren zu können (Carbone & Lux, 1987), ohne die für Ca²⁺ üblichen sekundären Signalkaskaden anzustoßen. Hierzu zählen Sekretion, Kontraktion, von Calmodulin-Kinasen abhängige und durch Proteinkinase C aktivierte Prozesse sowie die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Kaliumkanäle. Aufgrund dieser Wirkungen verstärkt Barium die neuronale Aktivität und kann auch epileptiforme Entladungen begünstigen (Olpe *et al.*, 1991). Ein Teil, der durch Barium blockierten Kaliumkanäle findet sich auf Astrozyten (Ballanyi *et al.*, 1987). Diese exprimieren einerseits die generell bariumsensitiven Two-pore-domain-(2p)-Kaliumkanäle, die wichtig für die Einstellung des Ruhemembranpotenzials sind, und die K_{ir}4.1-Kanäle (Seiffert *et al.*, 2009). Letztere sind schon bei geringen Konzentrationen von Ba²⁺ blockiert (Ivens *et al.*, 2007). Diese Effekte erklären den von Ballanyi *et al.* erhobenen Befund, nach dem Gliazellen in Gegenwart von Ba²⁺ auf Werte bis zu –30 mV depolarisieren können (Ballanyi *et al.*, 1987). Ein vergleichbarer Effekt wurde an Nervenzellen nicht gefunden.

Was ist die Funktion der $K_{IR.4.1}$ -Kanäle? Sie sollen an der räumlichen Kaliumpufferung beteiligt sein. Gliazellen reagieren auf Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration mit einer starken Depolarisation, welche sich in den räumlich ausgedehnten astrozytären Gliazellen ausbreiten kann. Da Astrozyten über Connexine elektrisch gekoppelt sind, formen sie ein Synzytium, in dem sich die Depolarisationen weiter ausbreiten können. Im Ergebnis ist die Depolarisation am Ort der Kaliumakkumulation kleiner als erwartet und es entsteht eine treibende Kraft für Kaliumverschiebungen. Da die Astrozyten im Wesentlichen nur Kaliumkanäle exprimieren, wird dieser Ausgleich über einen einwärts gerichteten Kaliumstrom vermittelt (Orkand *et al.*, 1966; Dietzel *et al.*, 1980, 1982; Wallraff *et al.*, 2006).

Es gilt:

$$I_K = g_K (E_M - E_K),$$

wobei I_K der transmembranale Kaliumstrom ist und g_K die Leitfähigkeit der Membran für Kalium, E_M das Membranpotenzial sowie E_K das Kaliumgleichgewichtspotenzial anzeigen. Aus diesem Grund wird ein Teil des Kaliums am Ort maximaler Kaliumakkumulation aufgenommen. An entfernten Orten ist die Depolarisation größer als von der lokalen Kaliumakkumulation zu erwarten wäre. Infolgedessen wird an diesen Stellen Kalium abgegeben. Dieser Prozess wird als räumliche Kaliumpufferung beschrieben (Orkand & Nicholls, 1966); er ist weitgehend energieunabhängig. Neben diesem Mechanismus verfügen Gliazellen auch über einen Kalium-Cl-Kotransport und über Cl-Leitfähigkeiten (Walz & Kimelberg, 1985). Da die Cl-Leitfähigkeit niedrig ist und dadurch ratenbestimmend, spielt sie bei inhomogenen Kaliumakkumulationen nur eine untergeordnete Rolle. Für die Gültigkeit der Gliapufferungshypothese im Zentralnervensystem gibt es eine Reihe von Hinweisen. Die ersten Hinweise ergaben sich aus dem Vergleich künstlich evozierter Kaliumerhöhungen zu Agar-Agarplatten. Es zeigte sich, dass im Gewebe der Kaliumanstieg 6-fach größer als im Agar war, wenn iontophoretisch Kalium appliziert wurde (Lux & Neher, 1973). Erwartet werden musste ein etwa 12-facher Anstieg der Kaliumkonzentration, da die Größe des Extrazellulärraums und die Tortuosität des Extrazellulärraums die Ionendiffusion beeinflussen (Phillips & Nicholson, 1981; Nicholson & Hrabitová, 2007; Nicholson *et al.*, 2000). Ein Teil dieses Kaliums muss also in Zellen aufgenommen worden sein. Führt man die Kaliumiontophorese in Gegenwart von Ba^{2+} durch, werden die Kaliumsignale

mehr als verdoppelt (Jauch *et al.*, 2002) Dieser Effekt bleibt auch bestehen, wenn synaptische Potenziale und die Erregung durch TTX und durch NBQX/APV blockiert werden, wodurch die synaptische erregende Übertragung unterbrochen wird (Jauch *et al.*, 2002).

Die räumliche Kaliumpufferung ist mit der Entstehung von langsamen Feldpotenzialen verbunden (Dietzel *et al.*, 1980). Wenn Kalium in die Zelle aufgenommen wird, nimmt die Zahl positiv geladener Teilchen im Extrazellulärraum ab. Es entsteht ein negatives Feldpotenzial am Ort maximaler Kaliumaufnahme und ein positives Potenzial an entfernten Orten. Tatsächlich konnte in Ionophorese-Experimenten gezeigt werden, dass die negativen Feldpotenziale mit der Größe des Kaliumanstiegs korrelieren und blockiert werden, wenn die Aufnahme von Kalium in Gliazellen durch Barium blockiert wird (Jauch *et al.*, 2002). In diese Untersuchungen wurde auch epileptisches Gewebe des Menschen mit und ohne Hippocampusklerose einbezogen. Während im sklerotischen Gewebe mit einer starken Astroglieose der Effekt von Barium stark abgeschwächt war, war er im nichtsklerotischen humanen Gewebe erhalten (Jauch *et al.*, 2002). Interessanterweise können Astroglieose und veränderte Kaliumpufferung der Epileptogenese vorausgehen (Seiffert *et al.*, 2004; Ivens *et al.*, 2007; David *et al.*, 2009).

Diese Befunde waren ein Ausgangspunkt für meine Untersuchungen. Ich vermutete, dass

1. die Kaliumsignale in Gegenwart von Barium vergrößert sein und
2. die laminaren Profile der Feldpotenziale verändert würden.

Diese Vermutungen bestätigten sich. In Gegenwart von Barium waren die reizinduzierten Kaliumsignale deutlich vergrößert, während die begleitenden negativen Signale im Stratum pyramidale bi-phasisch wurden. Da ein Teil der negativen Feldpotenziale durch Natriumeinstrom in Nervenzellen bedingt ist, war dieser Effekt nicht unerwartet. Wenn man allerdings die Ladungsverschiebung aus der Stromsenkendichteanalyse integriert, ergab sich in der Pyramidenzellenschicht eine Umkehr von einer Senke, in der netto Ladungen in Zellen verschoben werden, in eine Quelle, die vermutlich auf dem depolarisationsbedingten Ausstrom von Kalium aus Nervenzellen beruht. Insgesamt veränderten sich die laminaren Profile außerordentlich

stark. Es ergab sich fast eine rhythmische Strom-Quellen-Senken-Verteilung entlang der dendritischen Ausrichtung, der in der CA1-Region dominierenden Pyramidenzellen. Interessanterweise sind Gliazellen im Stratum oriens und noch stärker im Stratum radiatum an erwachsenen Tieren prominent zu den Dendriten der Pyramidenzellen parallelisiert. Ihre Zellkörper sind nicht in einer Schicht arrangiert, sondern überlappend angeordnet, sodass eine Gliazelle an einem Ort Kalium abgibt, an dem eine andere erst anfängt Kalium aufzunehmen. Die bestehenden bleibenden Senken und Quellen nach Blockade der Kaliumaufnahme in Gliazellen – wenn auch räumlich anders verteilt – mögen auf Prozessen an Nervenzellen beruhen. In den durchgeführten Experimenten wurde antidrom gereizt und die synaptische Übertragung durch NBQX und APV blockiert. Die antidrom propagierenden Aktionspotenziale wurden nur teilweise in den apikalen Dendriten aktiv regeneriert, sodass sich eine Verteilung von Hotspots auf den Dendriten ergeben könnte, die für die Senken- und Quellenverteilung verantwortlich sein könnte. Dies könnte durch fokale Applikation von TTX überprüft werden (Astman *et al.*, 2006).

In den Voruntersuchungen an normalen Tieren war verglichen worden, wie sich bei antidromer Reizung aus dem Alveus die Kaliumprofile und die Verteilung der Stromsenkendichte verhalten, wenn unter Kontrollbedingungen abgeleitet und wenn die erregende synaptische Transmission unterdrückt wurde. Hintergrund dieses Vergleichs war zunächst die Überlegung, dass vom Alveus auch afferente Fasern in das Hippocampusgewebe abbiegen und dass es rekurrende Verschaltungen von CA1-Pyramidenzellen auf benachbarte Interneurone gibt. Tatsächlich waren die Kaliumsignale in Gegenwart von NBQX und APV verkleinert, aber an den laminaren Profilen traten nur quantitative und keine qualitativen Änderungen auf. In den Untersuchungen an chronisch epileptischem Gewebe wurde deshalb auf die Applikation von NBQX und APV verzichtet. Dabei spielte sicher auch eine Rolle, die Zahl der Tiere zu reduzieren, an denen eine Epilepsie für diese Untersuchungen induziert werden musste.

Die nachfolgenden Experimente waren von dem Gedanken getragen, ob Veränderungen von Astrozyteneigenschaften für eine veränderte Kaliumpufferung sorgen könnten. In den letzten Jahren konnte durch Untersuchungen an Mäusen, die unter dem GFAP-Promoter GFP exprimieren, die Eigenschaften verschiedener Typen

von Astrozyten bestimmt werden (Kirchhoff & Kettenmann, 2001). Dazu wurden Patchclammessungen an Hirnschnittpräparaten relativ junger Mäuse durchgeführt. Es wurden zwei Klassen von Astrozyten beschrieben: Solche, die elektrisch gekoppelt sind, sich weitgehend passiv verhalten und über Glutamattransporter verfügen, und solche, die spannungsgesteuerte Natrium- und Kaliumkanäle sowie Glutamatrezeptoren exprimieren und nicht elektrisch gekoppelt sind. Diese Zellen werden teils als simple und komplexe Astrozyten, teils als Glutamattransporterzellen und Glutamatrezeptorzellen unterschieden. Die Glutamatrezeptorzellen scheinen NG2-positiven Zellen zu entsprechen, die zumindest in der weißen Substanz Stammzellen für Oligodendrozyten zu sein scheinen (Bergles *et al.*, 2010). Im chronisch epileptischen Gewebe wurden nun wesentlich mehr der Komplexzellen gefunden. Dies galt sowohl für humanes Gewebe mit Hippocampusklerose, aber auch für Tiere, die nach einem Status epilepticus eine Epilepsie mit spontan wiederkehrenden Anfällen entwickelt hatten (Hinterkeuser *et al.*, 2002). Diese Zellen sind deutlich depolarisiert und sie exprimieren auch weniger einwärtsgerichtete Kaliumströme. Ob die vermehrt auftretenden Komplex- oder Glutamatrezeptorzellen durch eine Transformation passiver Astrozyten entstehen oder aus NG2-Gliazellen nachgebildet werden, ist gegenwärtig offen. Ihre Eigenschaften entsprechen weitgehend denen der komplexen bzw. Glutamatrezeptorzellen.

Wenn eine Mehrzahl der Astrozyten keine K_{ir} -Kanäle mehr exprimieren und zudem stark depolarisiert sind, also vermutlich auch weniger $2p$ -Kaliumkanäle exprimieren, wäre zu erwarten, dass die Gliapufferung eingeschränkt ist. Tatsächlich ließ sich das laminare Profil der Kaliumkonzentrationsänderungen durch Barium kaum ändern. Die Kaliumsignale waren bei mit Pilocarpin behandelten Tieren durch Barium nur noch geringfügig vergrößert.

In humanem Gewebe wurden allerdings variable Effekte beobachtet, die mit dem Zellverlust und einer sekundären Astrogliose korrelieren konnten (Gabriel *et al.*, 2004). Die Untersuchungen meiner Studie wurden deshalb auf gekindelte Tiere ausgedehnt. Bei der Kindlingepilepsie handelt es sich um ein Modell der Epilepsie, bei dem durch kurze repetitive Reizungen zunächst lokale Nachentladungen in der gereizten Struktur entstehen, die bei Wiederholung der Reize zunehmend länger werden und sich schließlich auch weiter im Gewebe ausbreiten, also sekundär generalisieren. In der

Entwicklung der Kindlingepilepsie werden unterschiedliche Stadien unterschieden (Racine *et al.*, 1972). Wir haben die Tiere bis zum Stadium V gekindelt und dann 5 Stadium-V-Anfälle ausgelöst. In diesem Stadium ist noch keine Astrozytose, kein Zellverlust und auch keine Reorganisation neuronaler Verbindungen im Gewebe beobachtbar (Sutula, 2004). Erst wenn nach Erreichen des Stadiums V lange weitergereizt wird, entstehen spontane epileptische Anfälle. Es handelt sich also bei der Kindlingepilepsie um ein relativ mildes Modell der Epileptogenese, bei dem vor allem eine funktionelle Änderung der Zellerregbarkeit und der synaptischen Interaktion im Vordergrund stehen. In diesem Modell hatte Barium interessanterweise ähnliche Effekte wie im Kontrollgewebe. Daraus lässt sich schließen, dass Veränderungen der Konnektivität und der Neuronenzahl eine der Vorbedingungen für die Aktivierung von Astrozyten sein könnten. Allerdings bieten sich auch andere Möglichkeiten der Astrozytenaktivierung an. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Öffnen der Bluthirnschranke mit Austritt von Serumproteinen in den Extrazellulärraum bzw. Applikation von Albumin eine Astrozytenaktivierung bewirken, bei der $K_{ir}4.1$ -Kanäle und Connexine stark herabgeregelt sind (Cacheux *et al.*, 2009). Auch in diesem Modell verliert Barium seine Wirkung. Diese Veränderungen sorgen für eine verstärkte Akkumulation von Kalium und Glutamat im Gewebe und bedingen mit einiger Latenz eine Hyperexzitabilität und eventuell das Auftreten epileptischer Spontanfälle (Seiffert *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2009). Unter Umständen gehen die Veränderungen so weit, dass auch Spreading-Depolarisationen im Gewebe entstehen können, die an Schadensprozessen nach z. B. einem Schlaganfall beteiligt sein könnten (Lapilover *et al.*, in Vorbereitung).

Zusammenfassend gesagt, zeigen meine Untersuchungen, dass Veränderungen der Astrozyteigenschaften zu Veränderungen in der Homöostase von Kalium im Extrazellulärraum führen können und diese in der Folge das Gewebe erregbarer machen könnten.

6 Zusammenfassung

Epilepsien sind häufig mit einer Astrozytenaktivierung verbunden, die möglicherweise mit Veränderungen der Pufferfunktion für Kalium verbunden ist. Normale Astrozyten besitzen eine hohe Kaliumleitfähigkeit, sind räumlich ausgedehnt und durch Connexine zu einem Synzytium verbunden. Eine lokale Kaliumakkumulation bewirkt eine Depolarisation der Astrozyten, die allerdings lokal kleiner ausfällt, als aufgrund der Kaliumakkumulation zu erwarten wäre. Dies beruht auf einer Ladungsverschiebung innerhalb des glialen Netzwerkes. An entfernten Orten ist dadurch die Depolarisation größer. Diese Ungleichgewichte bedingen Kaliumaufnahme in Astrozyten am Ort maximaler Kaliumakkumulation und Abgabe von Kalium an entfernten Orten. Die Pufferung soll über $K_{IR4.1}$ - und 2P-Leckkaliumkanäle erfolgen. Diese sind durch Barium blockierbar. Es bot sich deshalb an, den Effekt von Barium auf reizinduzierte Anstiege der Kaliumkonzentration zu ermitteln. Um eine möglichst geringe Kontamination durch synaptische Potenziale zu erreichen, wurden Pyramidenzellen der Area CA1 aus dem Alveus aktiviert. Die Gabe von Glutamatrezeptorblockern reduzierte die Amplitude der Kaliumsignale, veränderte aber die laminare Verteilung der Kaliumsignale, die mit ionenselektiven Mikroelektroden erfasst wurden, nicht qualitativ. Die Gabe von Barium vergrößerte die Kaliumsignale, ohne das laminare Profil qualitativ zu verändern. Diese Zunahme ist teilweise auf eine Zunahme der reizinduzierten Signale zurückzuführen. Der Kaliumstrom am Ort maximaler Kaliumakkumulation ist mit der Generierung negativer Feldpotenziale verbunden. Deshalb wurden die laminaren Profile der Feldpotenziale bestimmt und daraus die Verteilung der Stromsenken und Stromquellen errechnet. Im Stratum pyramidale am Ort der maximalen Kaliumakkumulation war eine große Stromsenke zu beobachten, die durch Bariumapplikation in eine Stromquelle umgewandelt wurde. Der Bariumeffekt auf Kaliumsignale blieb im Gewebe von chronisch epileptischen Tieren mit einer durch einen Status epilepticus ausgelösten Hippocampussklerose aus. Auch die Feldpotenziale waren deutlich kleiner, die Stromsenke kehrte aber nach Bariumapplikation wie an Normaltieren auch in eine Quelle um. In einem zweiten Modell der Temporallappenepilepsie, dem Kindlingmodell, bei dem keine Astrozytose und Astrozytenaktivierung beschrieben war, hatte Barium die gleichen Effekte wie an Normaltieren. Die Daten weisen darauf hin, dass Astrozytenaktivierung die Kaliumakkumulation begünstigen und damit zu einer erleichterten Anfallsentstehung beitragen kann.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ammann D. Ion-Selective Microelectrodes: Principles, Design and Application. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer-Verlag, 1986.
- 2 Astman N, Gutnick MJ, Fleidervish IA. Persistent sodium current in layer 5 neocortical neurons is primarily generated in the proximal axon. *J Neurosci.* 2006;26(13):3465-73.
- 3 Avoli M. Epileptiform discharges and a synchronous GABAergic potential induced by 4-aminopyridine in the rat immature hippocampus. *Neuroscience Letters.* 1990;117:93-98.
- 4 Avoli M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. *Epilepsia.* 1996;37:1035-1042.
- 5 Avoli M, Barbarosie M, Lücke A, Nagao T, Lopantsev V, Köhling R. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *Journal of Neuroscience.* 1996;16:3912-3924.
- 6 Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel J Jr, ed. *Surgical Treatment of the Epilepsies.* New York: Raven Press, 1987:511-540.
- 7 Ballanyi K, Grafe P, ten Bruggencate G. Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *J Physiol (London).* 1987;382:159-174.
- 8 Bang H, Kim Y, Kim D. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem.* 2000;275:17412-17419.
- 9 Behrens CJ, Ul-Haq R, Liotta A, Anderson ML, Heinemann U. Nonspecific effects of the gap junction blocker mefloquine on fast hippocampal network oscillations in the adult rat in vitro. *Neuroscience.* 2011 Sep 29;192:11-9.
- 10 Bekar LK, Loewen ME, Forsyth GW, Walz W. Chloride concentration affects Kv channel voltage-gating kinetics: Importance of experimental anion concentrations. *Brain Res Bull.* 2005 Sep 30;67(1-2):142-6.
- 11 Bergles DE, Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD. NG2⁺ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron.* 2010 Nov 18;68(4):668-81.
- 12 Bergles DE, Jabs R, Steinhäuser C. Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):130-7.
- 13 Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D. Acquired Dendritic Channelopathy in Temporal Lobe Epilepsy. *Science.* 2004 Jul 23;305(5683):532-5.
- 14 Blaha CD, Yang CR, Floresco SB, Barr AM, Phillips AG. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience.* 1997;9:902-911.
- 15 Blümcke I, Züschratter W, Schewe, JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, Meyer B, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol.* 1999;414:437-453.
- 16 Bordey A, Sontheimer H. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *Journal of Neurophysiology.* 1997;78:461-477.
- 17 Bordey A, Sontheimer H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res.* 1998 Sep;32(1-2):286-303.
- 18 Bouchet C, Cazauvieilh JB. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. *Archives générales de Médecine.* 1825:510-542.
- 19 Cacheaux LP, Ivens S, David Y, Lakhter AJ, Bar-Klein G, Shapira M, Heinemann U, Friedman A, Kaufer D. Transcriptome profiling reveals TGF- β signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci.* 2009 Jul 15;29(28):8927-8935.
- 20 Carbone E, Lux HD. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurons. *J Physiol.* 1987 May;386:571-601.
- 21 Cascino GD, Jack CR Jr, Parisi JE, Sharbrough FW, Schreiber CP, Kelly PJ, Trenerry MR. Operative strategy in patients with MRI-identified dual pathology and temporal lobe epilepsy.

- Epilepsy Research. 1993; *14*:175-182.
- 22 Castellucci VF, Goldring S. Contribution to steady potential shifts of slow depolarization in cells presumed to be glia. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*.1970;*28*:109-118.
 - 23 Casullo J, Krnjevic K. Glial potentials in hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol*.1987;*65*:847-855.
 - 24 Cendes F, Andermann F, Gloor P, Lopes-Cendes I, Andermann E, Melanson D, Jones-Gotman M, Robitaille Y, Evans A, Peters T. Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? *Ann Neurol*. 1993;*34*:795-801.
 - 25 Cepeda C, André VM, Levine MS, Salamon N, Miyata H, Vinters HV, Mathern GW. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. *Epilepsy Behav*. 2006 Sep;*9*(2): 219-35.
 - 26 Chen KC, Nicholson C. Spatial buffering of potassium ions in brain extracellular space. *Biophys J*. 2000 Jun;*78*(6):2776-97.
 - 27 David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J Neurosci*. 2009 Aug 26;*29*(34):10588-10599.
 - 28 Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res*. 1980;*40*(4):432-9.
 - 29 Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp Brain Res*. 1982a;*46*(1):73-84.
 - 30 Dietzel I, Heinemann U. Extracellular potassium concentration in chronic alumina cream foci of cats. *J Neurophysiol*. 1982b;*52*(3):421-434.
 - 31 Dietzel I, Heinemann U. Dynamic variations of the brain cell microenvironment in relation to neuronal hyperactivity. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;*481*:72-86.
 - 32 Dietzel I, Heinemann U, Lux HD. Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia*. 1989;*2*:25-44.
 - 33 Dreier JP, Heinemann U. Regional and time dependent variations of low magnesium induced epileptiform activity in rat temporal cortex. *Experimental Brain Research*. 1991;*87*:581-596.
 - 34 Dudek FE, Snow RW, Taylor CP. Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. In: Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, eds. *Advances in Neurology 44, Basic mechanisms of the epilepsies*. New York: Raven Press, 1986:593-617.
 - 35 Duvernoy H. *The human hippocampus. Functional anatomy, vascularisation and serial sections with MRI*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1998.
 - 36 Eilers A, Kivi A, Gabriel S, Heinemann U. Efficacy of glial spatial potassium buffering in area CA1 of rat hippocampus in vitro. *European Journal of Neuroscience*. 1998; *10 Suppl. 10*:338-338. Ref Type: Abstract.
 - 37 Eilers A, Schulze K, Kivi A, Lehmann TN, Gabriel S, Heinemann U. Spatial K⁺ buffering in area CA1 of kindled and chronic epileptic rats in vitro. *Göttinger Neurobiol Report*.1999;*529*-529. Ref Type: Abstract.
 - 38 Enkvist MOK, McCarthy KD. Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem*. 1994;*62*:489-495.
 - 39 Epsztein J, Ben-Ari Y, Represa A, Crépel V. Late-onset epileptogenesis and seizure genesis: lessons from models of cerebral ischemia. *Neuroscientist*. 2008 Feb;*14*(1):78-90.
 - 40 Falconer MA. The pathological substrate of temporal lobe epilepsy. *Guys Hosp Rep*. 1970;*119*:47-60.
 - 41 Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JAN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964;*10*:233-248.
 - 42 Fernandes MJS, Naffah-Mazzacoratti MG, Cavalheiro EA. Na⁺K⁺ ATPase activity in the rat

- hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int.* 1996;28:497-500.
- 43 Fernandez G, Effenberger O, Vinz B, Steinlein O, Elger CE, Dohring W, Heinze HJ. Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology.* 1998;50:909-917.
- 44 Fertziger AP, Ranck JB Jr. Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. *Exp Neurol.* 1970;26:571-585.
- 45 Ficker E, Heinemann U. Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampal cells. *J Physiol (London).* 1992;445:431-455.
- 46 Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO Journal.* 1998;17:3297-3308.
- 47 Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Faude F, Wiedemann P, Reichenbach A, Reichelt W. Loss of inwardly rectifying potassium currents by human retinal glial cells in diseases of the eye. *Glia.* 1997;20:210-218.
- 48 Friedman A, Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain.* 2007;130(Pt 2):535-547.
- 49 Friedman A, Kaufer D, Heinemann U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res.* 2009 Aug;85(2-3):142-9.
- 50 Friedman D, Honig LS, Scarneas N. Seizures and Epilepsy in Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci Ther.* 2011: Epub ahead of print.
- 51 Futamachi KJ, Pedley TA. Glial cells and extracellular potassium: Their relationship in mammalian cortex. *Brain Res.* 1976;109:311-322.
- 52 Gabriel S, Kivi A, Eilers A, Kovács R, Heinemann U. Effects of barium on stimulus-induced rises in [K⁺]_o in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroreport.* 1998;9(11):2583-7.
- 53 Gabriel S, Eilers A, Kivi A, Kovács R, Schulze K, Lehmann TN, Heinemann U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci Lett.* 1998;242(1):9-12.
- 54 Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Lehmann TN. 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.
- 55 Gates JR, Cruz-Rodriguez R. Mesial temporal sclerosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Epilepsia.* 1990;31 Suppl 3:55-66.
- 56 Glötzner FL, Grüsser OJ. Membranpotential und Entladungsformen kortikaler Zellen, EEG und corticales DC-Potential bei generalisierten Krampfanfällen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 1968;210:313-339.
- 57 Gutnick MJ, Connors BW, Ransom BR. Dye-coupling between glial cells in the guinea pig neocortical slice. *Brain Res.* 1981;213:486-492.
- 58 Gutschmidt KU, Stenkamp K, Buchheim K, Heinemann U, Meierkord H. Anticonvulsant actions of furosemide in vitro. *Neuroscience.* 1999;91:1471-1481.
- 59 Hablitz JJ, Heinemann U. Extracellular K⁺ and Ca²⁺ changes during epileptiform discharges in the immature rat neocortex. *Developmental Brain Research.* 1987;36:299-303.
- 60 Haglund MM, Schwartzkroin PA. Seizure-like spreading depression in immature rabbit hippocampus in vitro. *Developmental Brain Research.* 1984;14:51-9.
- 61 Haglund MM, Schwartzkroin PA. Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology.* 1990;63:225-239.
- 62 Haglund MM, Stahl WL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Developmental and regional differences in the localization of Na-K-ATPase activity in the rabbit hippocampus. *Brain Res.* 1985;343:198-

- 203.
- 63 Heinemann U. Alphanhythmus und negative Grundlinienvariationen. Universität zu München. 1971. Ref Type: Thesis/Dissertation.
- 64 Heinemann U, Albrecht D, Köhr G, Rausche G, Stabel J, Wisskirchen T. Low-Ca²⁺-induced epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Epilepsy Research*. 1992a; *Suppl. 8*:147-155.
- 65 Heinemann U, Albrecht D, Beck H, Ficker E, von Haebler D, Stabel J. Delayed K⁺ regulation and K⁺ current maturation as factors of enhanced epileptogenicity during ontogenesis of the rat hippocampus. In: Engel J, Wasterlain C, Cavalheiro EA, Heinemann U, Avanzini G, eds. *Molecular Neurobiology of Epilepsy*. Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier, 1992b:107-114.
- 66 Heinemann U, Dietzel I. Extracellular potassium concentration in chronic alumina cream foci of cats. *Journal of Neurophysiology*. 1984; *52*:421-434.
- 67 Heinemann U, Lux HD. Ceiling level of rises in extracellular potassium concentration in the cortex of cats. *Pflug Arch Eur J Phy*. 1975a; *355 Suppl.*:R 199-R 199. Ref Type: Abstract.
- 68 Heinemann U, Lux HD. Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res*. 1975b; *93*:63-76.
- 69 Heinemann U, Lux HD. Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res*. 1977; *120*:231-249.
- 70 Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Experimental Brain Research*. 1977; *27*:237-243.
- 71 Heinemann U, Gabriel S, Jauch R, Schulze K, Kivi A, Eilers A, Kovács R, Lehmann TN. Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2000; *41 Suppl 6*:185-9.
- 72 Heinemann U, Behr J, Fidzinski P, Wawra M, Dugladze T, Gloveli T. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus*. 2011 Jul; *21(7)*:733-43.
- 73 Hinterkeuser S, Schröder W, Hager G, Seifert G, Blümcke I, Elger CE, Schramm J, Steinhäuser C. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *Eur J Neurosci*. 2000 Jun; *12(6)*:2087-2096.
- 74 Holsheimer J. Electrical conductivity of the hippocampal CA1 layers and application to current-source-density analysis. *Experimental Brain Research*. 1987; *67*:402-10.
- 75 Holthausen H. Epileptische Anfälle im Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd*. 2001; *149*:1154-1161.
- 76 Hrabitová S, Nicholson C. Biophysical Properties of Brain Extracellular Space Explored with Ion-Selective Microelectrodes, Integrative Optical Imaging and Related Techniques. In: Michael AC, Borland LM, eds. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007: Chapter 10.
- 77 Hwa GGC, Avoli M. NMDA receptor antagonists CPP and MK-801 partially suppress the epileptiform discharges induced by the convulsant drug bicuculline in the rat neocortex. *Neuroscience Letters*. 1989; *98*:189-193.
- 78 Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*. 2007 Feb; *130(Pt 2)*:535-47.
- 79 Jauch R, Windmüller O, Lehmann TN, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res*. 2002; *925*:18-27.
- 80 Jefferys JGR. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol Rev*. 1995; *75*:689-723.
- 81 Jensen MS, Azouz R, Yaari Y. Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *Journal of Neurophysiology*. 1994; *71*:831-839.
- 82 Jensen MS, Yaari Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *Journal of Neurophysiology*.

- 1997;77:1224-1233.
- 83 Jung R, Tönnies JF. Hirnelektrische Untersuchungen über Entstehung und Erhaltung von Krampfantladungen: Die Vorgänge am Reizort und die Bremsfähigkeit des Gehirnes. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1950;185:701-735.
- 84 Kelsch W, Hormuzdi S, Straube E, Lewen A, Monyer H, Misgeld U. Insulin-like growth factor 1 and a cytosolic tyrosine kinase activate chloride outward transport during maturation of hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:8339-8347.
- 85 Kettenmann H, Ransom B. Electrical coupling between astrocytes and between oligodendrocytes studied in mammalian cell cultures. *Glia*. 1988;1:64-73.
- 86 Kettenmann H, Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*. 2001 Jan;33(1):72-86.
- 87 Kivi A, Lehmann TN, Kovács R, Eilers A, Jauch R, Meencke HJ, von Deimling A, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur J Neurosci*. 2000; 12(6):2039-48.
- 88 Kivi A. Untersuchungen zur extrazellulären Kaliumregulation im Hippokampus juveniler Ratten und in hippocampalen Op Resektaten von Patienten mit Temporallappenepilepsie, Effekte von Barium und Cäsium. Humoldtuniversität zu Berlin. 2002. Ref Type: Dissertation.
- 89 Konnerth A, Obaid AL, Salzberg BM, Optical recording of electrical activity from parallel fibres and other cell types in skate cerebellar slices in vitro. *J Physiol*. 1987 Dec;393:681-702.
- 90 Korn SJ, Giacchino JL, Chamberlin NL, Dingledine R. Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *Journal of Neurophysiology*. 1987;57:325-340.
- 91 Kressin K, Kuprijanova E, Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C. Developmental regulation of Na⁺ and K⁺ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia*. 1995;15:173-187.
- 92 Krnjevic K, Morris ME. Correlation between extracellular focal potentials and K⁺ potentials evoked by primary afferent activity. *Can J Physiol Pharmacol*. 1975a;53:912-922.
- 93 Krnjevic K, Morris ME. Factors determining the decay of K⁺ potentials and focal potentials in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol*. 1975b;53:923-934.
- 95 Lehmann TN, Gabriel S, Kovács R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, Heinemann U. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:190-4.
- 96 Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovács R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci*. 2001;14(1):83-95.
- 97 Liotta A, Caliskan G, ul Haq R, Hollnagel JO, Rösler A, Heinemann U, Behrens CJ. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *J Neurophysiol*. 2011 Jan;105(1):172-87.
- 98 Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratos JM, Alonso ME, Medina MT, Gee MN, Cordova S, Zhao HZ, Spellman JM, Ramos Peek JR, Rubio Donnadieu F, Sparkes RS. Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21,2-p11: Linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am J Hum Genet*.1995;57:368-381.
- 99 Liu P, Bilkey DK. Direct connection between perirhinal cortex and hippocampus is a major constituent of the lateral perforant path. *Hippocampus*. 1996;6:125-135.
- 100 Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal fuer Psychologie und Neurologie*. 1934;46:113-177.
- 101 Lothman EW, Somjen GG. Extracellular potassium activity, intracellular and extracellular potential responses in the spinal cord. *J Physiol (London)*. 1975;252:115-136.
- 102 Lothman EW, Bertram EH, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol*. 1991;37:1-82.
- 103 Lux HD, Neher E. The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Experimental Brain*

- Research. 1973;17:190-205.
- 104 Lux HD, Heinemann U, Dietzel I. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. In: Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, eds. *Advances in Neurology Vol. 44. Basic Mechanisms of the Epilepsies: Molecular and Cellular Approaches*. New York: Raven Press, 1986:619-639.
- 105 MacFarlane SN, Sontheimer H. Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *Journal of Neuroscience*. 1997;17:7316-7329.
- 106 Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*. 1966;89:499-530.
- 107 Marrero H, Orkand RK. Nerve impulses increase glial intercellular permeability. *Glia*. 1996;16:285-289.
- 108 Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Developmental Brain Research*. 1994;78:70-80.
- 109 Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 1995a;118:105-118.
- 110 Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Lévesque MF. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*. 1995b;21:133-147.
- 111 Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending in the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:199-212.
- 112 Mathern GW. Epilepsy surgery patients with cortical dysplasia: present and future therapeutic challenges. *Neurology*. 2009 Jan 20;72(3):206-7.
- 113 Matsumoto H, Marsan CA. Cellular mechanisms in experimental epileptic seizures. *Science*. 1964;144:193-4.
- 114 Matthes A, Schnebele A. *Epilepsien*. Thieme: Stuttgart, New York, 1992.
- 115 McBain CJ, Traynelis SF, Dingledine R. Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science*. 1990;249:674-677.
- 116 McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *Journal of Neuroscience*. 1994;14:3413-3425.
- 117 Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kellsell RE, Gloger II, Pangalos MN. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;86:101-114.
- 118 Mello LEAM, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: Cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993;34:985-995.
- 119 Mendez MF, Catanzaro P, Doss RC, ARguello R, Frey WH. Seizures in Alzheimer's disease: clinicopathologic study. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1994;7(4):230-3.
- 120 Miles R, Traub RD, Wong RK. Spread of synchronous firing in longitudinal slices from the CA3 region of the hippocampus. *J Neurophysiol*. 1988 Oct;60(4):1481-96.
- 121 Misgeld U, Titz S, Hormuzdi S, Lewen A, Monyer H. Intracellular acidification in neurons induced by ammonium depends on KCC2 function. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan;23(2):454-64.
- 122 Mitzdorf U. Current source density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev*. 1985;65:37-100.
- 123 Mutani R. Neurophysiological mechanisms underlying epileptogenesis. *Functional Neurology*. 1986;1:385-389.
- 124 Nicholson C, Freeman JA. Theory of current source-density analysis and determination of

- conductivity tensor for anuran cerebellum. *Journal of Neurophysiology*. 1975;38:356-368.
- 125 Nicholson C, Phillips JM. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol*. 1981 Dec;321:225-257.
- 126 Nicholson C, Chen KC, Hrabětová S, Tao L. Diffusion of molecules in brain extracellular space: theory and experiment. *Prog Brain Res*. 2000;125:129-154.
- 127 Nixdorf-Bergweiler BE, Albrecht D, Heinemann U. Developmental changes in the number, size and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*. 1994;12:180-195.
- 128 Olpe H, Kolb CN, Hausdorf A, Haas HL. 4-aminopyridine and barium chloride attenuate the anti-epileptic effect of carbamazepine in hippocampal slices. *Experientia*. 1991 Mar 15;47(3):254-7.
- 129 Olsen TS, Kammersgaard LP. Poststroke epilepsy in the Copenhagen stroke study: incidence and predictors. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2005;14(5):210-4.
- 130 Orkand RK, Kuffler SW, Nicholls JG. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*. 1966 Jul;29(4):768-787.
- 131 Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*. 1966 Jul;29(4):788-806.
- 132 Päsler D, Gabriel S, Heinemann U. Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res*. 2007 Oct 10;1173:14-26.
- 133 Pinault D, Pumain R. Ectopic action potential generation: its occurrence in a chronic epileptogenic focus. *Experimental Brain Research*. 1985;60:599-602.
- 134 Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, $K_{i,4,1}$, in adult rat CNS. *Glia*. 2000;30:362-372.
- 135 Prince DA. Neurophysiology of epilepsy. *Annu Rev Neurosci*. 1978;1:395-415.
- 136 Prince DA, Wong RK. Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Res*. 1981 Apr 6;210(1-2):323-33.
- 137 Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:281-94.
- 138 Ramón y Cajal S. Über die feinere Struktur des Ammonshornes. *Z Wiss Zoologie*. 1893;56:613-663.
- 139 Ramón y Cajal S. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Vol. II. Maloine, Paris. – 1960 *Studies on Vertebrate Neurogenesis*. Translated by Guth L, Thomas CC. Springfield, Illinois Maloine, Paris, 1911.
- 140 Ransom BR, Goldring S. Ionic determinants of membrane potential of cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *Journal of Neurophysiology*. 1973;36:855-868.
- 141 Ransom CB, Sontheimer H. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *Journal of Neurophysiology*. 1995;73:333-346.
- 142 Ransom CB, Ransom BR, Sontheimer H. Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. *J Physiol*. 2000;522 Pt 3:427-442.
- 143 Represa A, Niquet J, Pollard H, Ben-Ari Y. Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats. *J Neurobiol*. 1995;26:413-425.
- 144 Rohkamm R. *Taschenatlas Neurologie*. Stuttgart, New York: Thieme, 2000.
- 145 Scheffler B, Faissner A, Beck H, Behle K, Wolf HK, Wiestler OD, Blumcke I. Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horn sclerosis. *Glia*. 1997;19:35-46.
- 146 Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*. 2005 Jun;46(6):858-77.
- 147 Schuchmann S, Hauck S, Henning S, Grüters-Kieslich A, Vanhalalo S, Schmitz D, Kalia K. Respiratory alkalose in children with fibrile seizures. *Epilepsia* 2011;52:1246-55

- 148 Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2004 Sep 8;24(36):7829-36.
- 149 Seifert G, Hüttmann K, Binder DK, Hartmann C, Wyczynski A, Neusch C, Steinhäuser C. Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the K_i4.1 subunit. *J Neurosci.* 2009 Jun 10;29(23):7474-88.
- 150 Shorvon SD. The epidemiology and treatment of chronic and refractory epilepsy. *Epilepsia.* 1996;37 Suppl 2:1-3.
- 151 Somjen GG. Evoked sustained focal potentials and membrane potential of neurons and of unresponsive cells of the spinal cord. *Journal of Neurophysiology.* 1970;33:562-582.
- 152 Spencer DD, Spencer SS. Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus.* 1994;4:243-249.
- 153 Spielmeyer W. Die Pathogenese des epileptischen Krampfes. *Zeitung für Neurologie und Psychiatrie.* 1927;109:501-520
- 154 Steinhäuser C, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H. Heterogeneity in the membrane current pattern of identified glial cells in the hippocampal slice. *European Journal of Neuroscience.* 1992;4:472-484.
- 155 Steinhäuser C, Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci.* 2006;26(20):5438-5447.
- 156 Steinhäuser C, Jabs R, Haberlandt C, Derouiche A, Wyczynski A, Haseleu J, Pohle J, Karram K, Trotter J, Seifert G, Frotscher M. Gray matter NG2 cells display multiple Ca²⁺-signaling pathways and highly motile processes. *PLoS One.* 2011a;6(3):e17575.
- 157 Steinhäuser C, Strohschein S, Hüttmann K, Gabriel S, Binder DK, Heinemann U. Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *Glia.* 2011b;59(6):973-80.
- 158 Sutula TP. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res.* 2004 Jul-Aug;60(2-3):161-71.
- 159 Tse FWY, Fraser DD, Duffy S, MacVicar BA. Voltage-activated K⁺ currents in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience.* 1992;12:1781-1788.
- 160 Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9:315-335.
- 161 Turski L, Jacobsen P, Honoré T, Stephens DN. Relief of experimental spasticity and anxiolytic/anticonvulsant actions of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate antagonist 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Feb;260(2):742-7.
- 162 Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci.* 2006 May 17;26(20):5438-47.
- 163 Walz W, Hinks EC. Carrier-mediated KCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K⁺-levels by astrocytes. *Brain Res.* 1985;343:44-51.
- 164 Walz W, Kimelberg HK. Differences in cation transport properties of primary astrocyte cultures from mouse and rat brain. *Brain Res.* 1985 Aug 12;340(2):333-40.
- 165 Walz W, Magoski NS. Short-circuiting effects of K⁺ currents on electrical responses of type-1-like astrocytes from mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 1991;567:120-126.
- 166 Walz W, Wuttke WA. Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *J Neurosci Res.* 1999;56:595-603.
- 167 Walz W, Bekar LK, Loewen ME, Forsyth GW. Chloride concentration affects Kv channel voltage-gating kinetics: Importance of experimental anion concentrations. *Brain Res Bull.* 2005 Sep 30;67(1-2):142-6.
- 168 Watkins JC, Davies J, Evans RH, Jones AW, Smith DA. Differential activation and blockade of

- excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous systems. *Comp Biochem Physiol C*. 1982;72(2):211-24.
- 169 Wieser HG, Engel J Jr, Williamson PD, Babb TL, Gloor P. Surgically remediable temporal lobe syndrome. *Surgical Treatment of the Epilepsies, Second Edition*, ed. Engel J Jr. New York: Raven Press, 1993:49-63.
- 170 Wilder BJ. The treatment of epilepsy: an overview of clinical practices. *Neurology*. 1995;45:S7-11.
- 171 Wong BY, Prince DA. The lateral spread of ictal discharges in neocortical brain slices. *Epilepsy Res*. 1990 Sep-Oct;7(1):29-39.
- 172 Xiong ZQ, Stringer JL. Cesium induces spontaneous epileptiform activity without changing extracellular potassium regulation in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*. 1999;82:3339-3346.
- 173 Xiong ZQ, Saggau P, Stringer JL. Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *Journal of Neuroscience*. 2000;20:1290-6.
- 174 Xiong ZQ, Stringer JL. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 2000 Mar;83(3):1443-51.
- 175 Yaari Y, Konnerth A, Heinemann U. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. II. Role of extracellular potassium. *Journal of Neurophysiology*. 1986;56:424-438.
- 176 Yaari Y, Beck H, Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y. Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3645-55.
- 177 Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B. Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol*. 1999;514(Pt 2):327-341.
- 178 Zentner J, Hufnagel A, Wolf HK, Ostertun B, Behrens E, Campos MG, Solymosi L, Elger CE, Wiestler OD, Schramm J. Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: Clinical, radiological, and histopathological findings in 178 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58:666-673.
- 179 Zheng JQ, Ma XY, Yu JM, Zhang SZ, Liu XY, Wu BH, Wei XL, Yan JQ, Sun HL, Yan HAT. External Ba²⁺ block of the two-pore domain potassium channel TREK-1 defines conformational transition in its selectivity filter. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39813-39822.
- 180 Zuckermann EC, Glaser GH. Hippocampal epileptic activity induced by localized ventricular perfusion with high-potassium cerebrospinal fluid. *Exp Neurol*. 1968;20:87-110.

8 Abkürzungen

[K ⁺] _o	Extrazelluläre Kaliumkonzentration
μM	Mikromol/Liter
2-APV	L-2-Amino-5-phosphonopentanoat
4-AP	4-Aminopyridin
ACSF	Engl.: artificial cerebrospinal fluid = artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
AD	Area dentata
AHS	Ammonshornsklerose
ALV	Alveus
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium
BM	(-)-Bicucullinmethiodid
CA1–4	Felder 1 bis 4 des Cornu ammonis
Ca ²⁺	Kalzium
Cl ⁻	Chlorid
CNQX	6-cyano-7-nitro-quinoxaline
Cs ⁺	Cäsium
CSD	Engl.: current source density = Stromsenkendichte
EC	Entorhinaler Kortex
EEG	Elektroenzephalogramm
E _K	Kaliumgleichgewichtspotenzial
EZR	Extrazellulärraum
ffp	Engl.: fast field potential = schnelles Feldpotenzial
sfp	langsames Feldpotenzial
GABA	γ-Aminobuttersäure
i. p.	intraperitoneal
i. m.	intramuskulär
K ⁺	Kalium

KG	Körpergewicht
K_{IR}	Einwärtsgleichrichtende Kaliumleitfähigkeit
K_{LEAK}	Kaliumleckleitfähigkeit
Mg^{2+}	Magnesium
mM	Millimol/Liter
Na^+	Natrium
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzol[f]quinoxalin-7-sulfonamid
Ncl	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NR2D	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2D
OP	Operations-(Resektate)
PDS	Paroxysmale Depolarisationen
PS	Engl.: population spike = Summenaktionspotenziale
RMP	Ruhemembranpotenzial
s.c.	subcutan = Unterhautfettgewebe
SD	Engl.: spreading depolarisation
sfp	Engl.: slow field potential = langsames Feldpotenzial
SLM	Stratum lacunosum moleculare
SLSD	Engl.: seizure-like spreading depression = anfallsartige spreading depression
SO	Stratum oriens
SP	Stratum pyramidale
SR	Stratum radiatum
STIM	Position der Stimulationselektrode
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TLE	Temporallappenepilepsie
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentralnervensystem

9 Publikationsliste

- 1 Gabriel S, Eilers A, Kivi A, Kovács R, Schulze K, Lehmann TN, Heinemann U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci Lett*. 1998 Feb 6;242(1):9-12.
- 2 Gabriel S, Kivi A, Eilers A, Kovács R, Heinemann U. Effects of barium on stimulus-induced rises in $[K^+]_o$ in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroreport*. 1998 Aug 3;9(11):2583-7.
- 3 Heinemann U, Gabriel S, Jauch R, Schulze K, Kivi A, Eilers A, Kovács R, Lehmann TN. Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:185-9.
- 5 Lehmann TN, Gabriel S, Kovács R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, Heinemann U. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:190-4.
- 5 Kivi A, Lehmann TN, Kovács R, Eilers A, Jauch R, Meencke HJ, von Deimling A, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur J Neurosci*. 2000 Jun;12(6):2039-2048.
- 6 Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovács R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci*. 2001 Jul;14(1):83-95.
- 7 Heinemann U, Eilers A, Gabriel S, Jandova K, Jauch R, Meencke HJ, Njunting M, Päsler D, Schulze K, Lehmann TN. Gliafunktionsstörungen in epileptischem Hirngewebe: Störung der glialen Kaliumpufferung. *Klin Neurophysiol* 2002;33:128-136
- 8 Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Lehmann TN. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci*. 2004 Nov 17;24(46):10416-10430.

10 Lebenslauf

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

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

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