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

DISSERTATION

Interaktion zwischen Sauerstoffspannung und epileptiformer Aktivität und deren Einfluss auf Zellschäden in juvenilen organotypischen hippokampalen Schnittkulturen der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Jörn K. Pomper
aus Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Heinemann
2. Prof. Dr. H. Luhmann
3. Prof. Wytse J. Wadman

eingereicht: 06.06.2005
Datum der Promotion: 16.01.2006

Abstract

In der Pathogenese der Temporallappenepilepsie wird kindlichen hippokampalen Schädigungen eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Epileptische Krämpfe und perinatale Asphyxie sind zwei häufige Ursachen dieser Schädigungen. Anhaltende epileptiforme Aktivität im Niedrig-Mg^{2+}-Modell als einer experimentellen Form epileptischer Krämpfe führt in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSK) der Ratte, die als Ersatzsystem des kindlichen Hippokampus verwendet werden, zu Zellschäden. Während dieser Untersuchungen ergab sich der Verdacht auf eine zusätzlich schädigende Wirkung erhöhter Sauerstoffspannungen. In meiner ersten Versuchsreihe konnte ich nachweisen, dass erhöhte Sauerstoffspannungen (60 %, 95 %) verglichen mit 20%-Sauerstoffspannung zu reversiblen und irreversiblen Zellschäden in OHSK führen. Die Zellschäden wurden über Veränderungen reizinduzierter Feldpotentiale, d.h. Abnahme der Amplitude, Zunahme der Latenz und Zunahme des Doppelpulsindex, sowie über die Propidium Jodid (PJ)-Fluoreszenzintensität bestimmt. In der zweiten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass erhöhte Sauerstoffspannungen auch nach einer Hypoxie im Sinne einer hyperoxischen Reoxygenierung verglichen mit normoxischer Reoxygenierung vermehrt Zellschäden in OHSK zur Folge haben. In der dritten Versuchsreihe konnte ich ausschließen, dass erhöhte Sauerstoffspannungen eine notwendige Bedingung für Zellschäden infolge anhaltender epileptiformer Aktivität sind. Um die zellschädigende Rolle von Spreading Depressions (SDs), die während epileptiformer Aktivität auftreten, zu bestimmen, wurde in der vierten Versuchsreihe eine Methode etabliert, SD-ähnliche Ereignisse isoliert und zuverlässig in normoxischen OHSK auszulösen. Auf diese Weise wiederholt ausgelöste SD-ähnliche Ereignisse führten zu Zellschäden, bestimmt über die Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften von SD-ähnlichen Ereignissen, Abnahme der Feldpotentialamplitude und PJ-Fluoreszenzintensität.

Reoxygenierung, Hyperoxie, Temporallappenepilepsie, Niedrig-Magnesium-Modell epileptiformer Aktivität, Spreading Depression, hippokampale Hirnschnittkultur, Propidium Jodid

Inhaltsverzeichnis

Abstract 2
Einleitung 4
Methodik 6
Präparation und Kultivierung von OHSK 6
Elektrophysiologische Messungen 6
Messung des Sauerstoffpartialdruckes 6
Messung intrinsisch optischer Signale 7
Bestimmung der Zellschäden mit Propidium Jodid 7
Lösungen und Pharmaka 7
Statistik 7
Ergebnisse 8
Erhöhte Sauerstoffspannungen führen zu einer Abnahme der Amplitude und einer Zunahme der Latenz sowie des Doppelpuls-Index reizinduzierter Feldpotentiale 8
Epileptiforme Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sauerstoffspannungen 10
Erhöhte Sauerstoffspannungen führen zu Zelltod 10
Die Abnahme der Amplitude reizinduzierter Feldpotentiale unter erhöhter Sauerstoffspannung ist zum Teil reversibel 10
Reoxygenierung mit erhöhten Sauerstoffspannungen nach Hypoxie reduziert die Zellschäden in OHSK nicht, sondern verstärkt sie 11
Anhaltende epileptiforme Aktivität führt auch unter 20%-Sauerstoffspannung zu Zellschäden in OHSK 12
SD-ähnliche Ereignisse sind unter 20%-Sauerstoffspannung reliabel in OHSK auslösbar 12
Repetitive SD-ähnliche Ereignisse führen zu Zellschäden in OHSK 13
Diskussion 14
Danksagung 18
Erklärung über den Anteil an den Publikationen 19
Publikationsliste 20
Ausgewählte Publikationen 20
Weitere Publikationen 20
Literaturverzeichnis 22

Einleitung

Hirnschädigungen im Säuglings- und Kleinkindalter haben häufig schwerwiegende Folgen. Diese reichen von neurologischen Entwicklungsstörungen bis zu Defektzuständen mit geistigen und körperlichen Funktionsdefiziten, wie z.B. einer spastischen Tetraparese. Die Temporallappenepilepsie wird ebenfalls, basierend auf retrospektiven Studien, vielfältig als Folge einer kindlichen Hirnschädigung angesehen. Nach Mathern et al. beruht diese Hirnschädigung in ca. 50 % der Fälle auf einem einfachen Fieberkrampf, einem komplizierten Krampfanfall oder einem Status epilepticus. In ca. 10 % der Fälle liegt eine Hypoxie zugrunde [1].

Die klinisch motivierte Forschung hat letztlich zum Ziel, therapeutische Strategien zur Minimierung der akuten Hirnschädigung und der pathologischen Folgen zu entwickeln. Voraussetzung dafür ist ein Verständnis der Schädigungsmechanismen. Die vorliegende Arbeit leistet dazu einen Beitrag und konzentriert sich auf zwei kindliche Hirnschädigungen, die mit der Temporallappenepilepsie assoziiert werden, zum einen anhaltende epileptische Aktivität und zum anderen perinatale Asphyxie.

Im Hippokampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie sind histopathologisch häufig Nervenzellverluste im Hilus und der CA1-Region des Cornu Ammonis (CA), kombiniert mit einer Gliose, zu finden. Dieser Befund wird als Ammonshornsklerose bezeichnet [2]. Entsprechend ist zu erwarten, dass die initiale kindliche Hirnschädigung ebenfalls den Hippokampus betrifft. Diese Annahme wird durch tierexperimentelle Arbeiten bestätigt, die eine besondere Vulnerabilität des kindlichen Hippokampus gegenüber anhaltender epileptischer Aktivität und Hypoxie zeigten [3, 4] .

Zur Untersuchung von Schädigungsmechanismen im kindlichen Hippokampus eignen sich organotypische hippokampale Schnittkulturen (OHSK) postnataler Ratten. Das organotypische neuronale Netzwerk bleibt im Wesentlichen erhalten [5, 6]. OHSK haben gegenüber der in vivo Situation den Vorteil, dass Temperatur und Zusammensetzung des artifiziellen Liquors konstant gehalten bzw. manipuliert werden können. Weiterhin sind OHSK hochauflösenden elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Techniken zugänglich. Gegenüber akut präparierten Hirnschnitten besteht der Vorteil darin, dass Schädigungsmechanismen ohne Interferenz mit dem akuten Präparationstrauma sowie Langzeiteffekte untersucht werden können.

Zellschäden in OHSK infolge Hypoxie und anhaltender epileptiformer Aktivität wurden in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [7, 8, 9]. Während der Untersuchungen von

Kovács et al. im Niedrig-Mg^{2+}-Modell anhaltender epileptiformer Aktivität fiel zudem auf, dass bereits die Aufbewahrung der OHSK in der elektrophysiologischen Messkammer Zellschäden zur Folge hatte. Eine mögliche Ursache dafür bestand in einer gegenüber den Kulturbedingungen erhöhten Sauerstoffspannung in der Messkammer.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

a) Führen erhöhte Sauerstoffspannungen per se zu Zellschäden in OHSK?

b) Sind Zellschäden infolge neuronaler Hypoxie durch Reoxygenierung mit erhöhten Sauerstoffspannungen reduzierbar oder werden sie verstärkt? Erhöhte Sauerstoffspannungen in Form von 100%iger Sauerstoffventilation finden therapeutisch unter anderem bei der perinatalen Asphyxie Anwendung.

c) Sind erhöhte Sauerstoffspannungen eine notwendige Bedingung für die Zellschäden infolge anhaltender epileptiformer Aktivität?

Eine weitere unbeantwortete Frage ist die nach der spezifischen zellschädigenden Wirkung unterschiedlicher Typen epileptiformer Aktivität. Während der Schädigungsmechanismus von Krampf-ähnlichen Ereignissen im kindlichen Hippokampus zunehmend besser verstanden wird [10, 11], ist die potentiell schädigende Wirkung von Spreading Depressions (SD) im kindlichen Hippokampus nicht bekannt. Im Niedrig-Mg^{2+}-Modell treten die unterschiedlichen Typen epileptiformer Aktivität gemischt und zeitlich nicht vorhersagbar auf. Damit ist das typspezifische Schädigungspotential nicht differenzierbar. Ein weiteres Ziel bestand deshalb darin, eine Methode zu finden, SD in OHSK reliabel auszulösen und die zellschädigende Wirkung wiederholt auftretender SD zu untersuchen.

Methodik

Präparation und Kultivierung von OHSK

Präparation und Kultivierung wurden entsprechend der Methode von Stoppini et al. durchgeführt [5]. Es wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 6-9 Tagen (P 6-9) verwendet. Die Kultivierung erfolgte für 8-13 Tage, so dass der Entwicklungsstand der OHSK dem postnataler Ratten im Alter von 15-20 Tagen entsprach. Die Sauerstoffspannung betrug unter Kulturbedingungen im Inkubator ca. 20 %. Eine Kulturmembran enthielt je nach Experiment 2-3 OHSK. Die Dicke der OHSK betrug zunächst 400 µm und nahm während der Kultivierung auf 150-200 µm ab.

Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in einer modifizierten doppelten Zwei-Phasen-Kammer, die das Einsetzen der Kulturmembran als Ganzes erlaubte, durchgeführt. Eine Phase wurde von artifiziellem Liquor gebildet, der die OHSK perfundierte. Die andere Phase bestand aus einem Gasgemisch, das je nach Experiment 20 %, 60 % oder 95 % Sauerstoff, komplementäre Anteile Stickstoff und 5 % Kohlendioxid zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes enthielt. Die Zwei-Phasen-Kammer ermöglichte eine den Kulturbedingungen vergleichbare Aufbewahrung der OHSK.

Es wurden extra- und intrazelluläre Ableitungen in der CA1-Region des Hippokampus durchgeführt. Spontane und reizinduzierte Feldpotentiale sowie extrazelluläre Konzentrationsveränderungen von Kalium und Calcium wurden mit ionensensitiven Mikroelektroden registriert und analysiert [12, 13].

Messung des Sauerstoffpartialdruckes

Der Sauerstoffpartialdruck auf der Oberfläche und innerhalb der OHSK wurde während der Aufbewahrung in der elektrophysiologischen Messkammer mit einer sauerstoffselektiven Mikroelektrode gemessen. Zur Erstellung eines Tiefenprofils wurde die Mikroelektrode mit Hilfe eines Mikromanipulators in 25 µm Schritten in die OHSK eingeführt.

Messung intrinsisch optischer Signale

Die Änderung der Lichttransmission, gleichbedeutend einer Änderung des intrinsisch optischen Signals, wurde während SD-ähnlicher Ereignisse bestimmt. Dies diente der Untersuchung des Ausbreitungsmusters von SD-ähnlichen Ereignissen.

Bestimmung der Zellschäden mit Propidium Jodid

Zur Bestimmung von Zellschäden erfolgte im Anschluss an elektrophysiologische Messungen die Anfärbung mit Propidium Jodid (PJ). PJ ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der impermeabel gegenüber intakten Zellmembranen ist. Bei einer Verletzung der Zellmembran tritt PJ in das Zytosol und den Zellkern über und interkaliert in den DNA-Doppelstrang. Aus PJ und DNA resultiert ein stabiler Komplex, der kaum auswaschbar ist. Mehrere Untersuchungen konnten eine enge Korrelation zwischen der PJ-Fluoreszenzintensität einer Region und der mittels konventioneller Zelltodmarker bestimmter Anzahl durch Zelltod betroffener Zellen dieser Region nachweisen [14, 15].

Lösungen und Pharmaka

Während der Präparation und Kultivierung von OHSK kamen Pferdeserum und übliche industriell angebotene Kulturlösungen zum Einsatz. Während der elektrophysiologischen Messungen wurden OHSK mit artifiziellem Liquor, der physiologische Konzentrationen von Glukose und Ionen enthielt, perfundiert. Als Pharmaka wurden die Glutamat-Rezeptor-Antagonisten CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, non-NMDA-Rezeptor-Antagonist) und APV (2-amino-5-phosphonovaleric acid, NMDA-Rezeptor-Antagonist) verwendet.

Statistik

Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Zum Gruppenvergleich wurden Rangssummentests angewendet (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whithney-U-Test). Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Korrelation elektrophysiologischer Parameter mit der Anzahl stattgehabter SD-ähnlicher Ereignisse wurde mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) bestimmt.

Ergebnisse

Erhöhte Sauerstoffspannungen führen zu einer Abnahme der Amplitude und einer Zunahme der Latenz sowie des Doppelpuls-Index reizinduzierter Feldpotentiale

Zur Beantwortung der Frage, ob erhöhte Sauerstoffspannungen per se zu Zellschäden führen, wurden drei Gruppen von OHSK gebildet. Sie unterschieden sich in der Sauerstoffspannung des in der elektrophysiologischen Messkammer verwendeten Gasgemisches (20 %, 60 % und 95 %, siehe Abb. 1), während Vorbereitungsphase und elektrophysiologische Messungen identisch verliefen. Die Vorbereitungsphase umfasste den Transfer der OHSK aus dem Inkubator in die Messkammer, eine Äquilibrierungszeit von 15 min und das Positionieren von Reizelektroden (Grenze Hilus-CA3) und Kalium-sensitiven Ableitelektroden (CA1). Während des anschließenden 90 min dauernden elektrophysiologischen Beobachtungszeitraumes wurden reizinduzierte schnelle Feldpotentiale am Beginn und am Ende sowie die spontanen Feldpotentiale und Ionenkonzentrationsveränderungen kontinuierlich aufgezeichnet. Bezüglich der reizinduzierten Feldpotentiale zeigte sich zu Beginn des Beobachtungszeitraumes kein signifikanter Unterschied in der maximalen Feldpotentialamplitude zwischen den 3 Gruppen (4,15 mV ± 0,29; n = 64). Im Verlauf kam es im Gegensatz zur 20%-Gruppe zu einer Abnahme der Amplitude unter erhöhten Sauerstoffspannungen. Die Abnahme war in der 60%-Gruppe mäßig und in der 95%-Gruppe deutlich ausgeprägt. Die Abnahme der Feldpotentialamplitude war in der 60%-Gruppe und in der 95%-Gruppe gegenüber der 20%-Gruppe signifikant erhöht (siehe [16], Abb. 1 und 2A). Die Latenz des Feldpotentials zeigte zu Beginn ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen (6,30 ms ± 0,15; n = 64). Sie nahm im Verlauf zu. Die Zunahme der Latenz in der 95%-Gruppe war gegenüber der 20%-Gruppe signifikant erhöht (siehe [16], Abb. 2C).

Darüber hinaus wurden die reizinduzierten Feldpotentiale bezüglich des Doppelpuls-Index, d.h. des Quotienten aus der zweiten und ersten Feldpotentialamplitude bei Doppelpulsreizung mit 50 ms Intervall, als Maß GABAerger Inhibition analysiert. Zu Beginn zeigte dieser Index eine geringe Inhibition unabhängig von der Sauerstoffspannung (0,81 ± 0,07; n = 61). Im Verlauf kam es zu einer gegenüber der 20%-Gruppe signifikanten Zunahme in der 95%-Gruppe, was einen Verlust GABAerger Inhibition anzeigt (siehe [16], Abb. 2B).

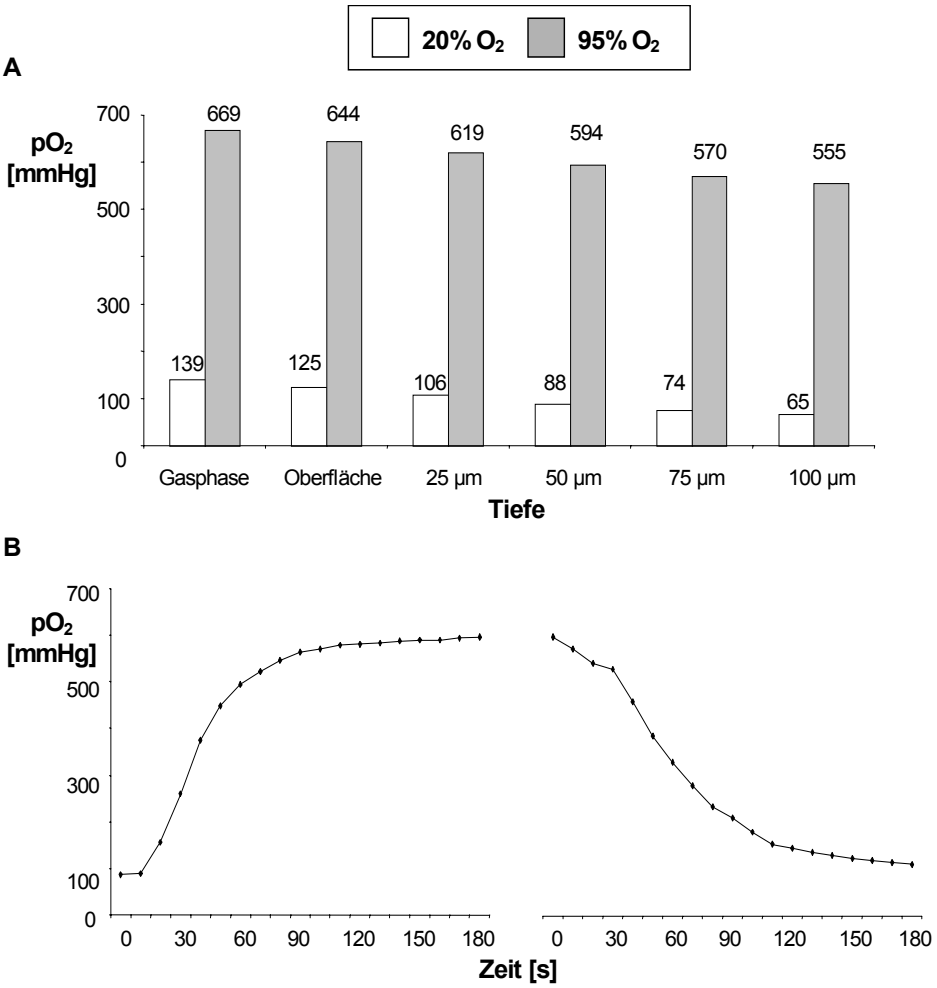

Abb. 1: Sauerstoffpartialdrücke im Vergleich zwischen 20%- und 95%-Sauerstoffspannung und in Abhängigkeit von der Eindringtiefe (A) sowie im Zeitverlauf nach Umschaltung der Sauerstoffspannung (B)

A: Im Tiefenprofil der Sauerstoffpartialdrücke zeigt sich eine lineare Abnahme mit zunehmender Tiefe. Die Messtiefe für elektrophysiologische Messungen betrug im Vergleich 50-100 µm. B: Im Zeitprofil (50 µm Tiefe) nach Umschaltung der Begasung von 20%- auf 95%-Sauerstoffspannung (links) ausgehend von 87 mmHg lag das Maximum bei 595 mmHg und wurde in 2 min nahezu erreicht. Nach Umschaltung der Begasung von 95 % auf 20 % Sauerstoff (rechts) wurde nach 3 min das Minimum nahezu wieder erreicht.

Epileptiforme Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sauerstoffspannungen

Während des Beobachtungszeitraumes trat in einigen OHSK spontane und reizinduzierte epileptiforme Aktivität auf. Diese wurde nach Kovács et al. [9] in SD-ähnliche Ereignisse, Krampf-ähnliche Ereignisse und rekurrente tonische Entladungen unterschieden (siehe [16], Abb. 3; siehe [17], Abb. 1). Krampf-ähnliche Ereignisse und rekurrente tonische Entladungen wurden ausschließlich in der 95%-Gruppe beobachtet, SD-ähnliche Ereignisse besonders in der 20%-Gruppe. In der 60%-Gruppe gab es keine epileptiforme Aktivität (siehe [16], Tab.1). OHSK, die während des Beobachtungszeitraumes epileptiforme Aktivität zeigten, wurden für die Auswertung der Feldpotentialeigenschaften nicht verwendet und bezüglich des Zelltodes gesondert ausgewertet, um eine Interferenz zwischen sauerstoffinduziertem und durch epileptiforme Aktivität bedingtem Zellschaden zu vermeiden.

Erhöhte Sauerstoffspannungen führen zu Zelltod

Die Abnahme der Feldpotentialamplitude und die Zunahme der Feldpotentiallatenz werden in Hypoxie-Experimenten häufig als Hinweise auf zugrunde liegende strukturelle Zellschäden angesehen. Um diese direkt nachzuweisen, erfolgte im Anschluss an das elektrophysiologische Experiment eine Anfärbung mit dem Zellschädigungsmarker PJ. Die Fluoreszenzintensität war in allen Regionen, d.h. CA1, CA3 und Gyrus dentatus, der 60%-Gruppe und 95%-Gruppe gegenüber der 20%-Gruppe signifikant erhöht. Die höchsten Werte fanden sich in der 95%-Gruppe (siehe [16], Abb. 4). Die Anfärbung war in der Pyramiden- und Körnerzellschicht, die beide hauptsächlich Nervenzellkörper enthalten, besonders ausgeprägt. Dies deutet auf einen im Wesentlichen neuronalen und nicht glialen Zelltod hin. OHSK, die zuvor epileptiforme Aktivität zeigten, unterschieden sich bezüglich der PJ-Fluoreszenzintensität nicht von denen, die keine epileptiforme Aktivität zeigten.

Die Abnahme der Amplitude reizinduzierter Feldpotentiale unter erhöhter Sauerstoffspannung ist zum Teil reversibel

Zur Beantwortung der Frage, ob die mit erhöhten Sauerstoffspannungen assoziierte Abnahme der Feldpotentialamplitude eine reversible Komponente beinhaltet, wurde in

einem zusätzlichen Experiment die Sauerstoffspannung in 30-Minuten-Intervallen zwischen 20 % und 95 % variiert. Während der Begasung mit 20 % kam es zu einer Zunahme der Amplitude. Nach dem Wechsel zur Begasung mit 95 % folgte eine darüber hinausgehende Abnahme, die bei erneutem Wechsel auf 20 % nur teilweise reversibel war (siehe [16], Abb. 5).

Während des Experimentes fiel auf, dass in 5 von 7 OHSK SD-ähnliche Ereignisse auftraten. Wie aus Tab.1 hervorgeht, wurden SD-ähnliche Ereignisse häufiger während der 20%-Sauerstoff-Phasen, besonders gegen Ende, oder unmittelbar im Anschluss an diese während der ersten Minuten unter 95%-Sauerstoffspannung beobachtet.

Tab. 1: Auftreten von SD-ähnlichen Ereignissen in Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung bei wiederholtem Umschalten der Begasung

	20 % O_2			**95 % O_2**			20 % O_2			**95 % O_2**			20 %
OHSK	10	20	30	**40**	**50**	**60**	70	80	90	**100**	**110**	**120**	130
1													
2									r				s
3													
4				**s**									
5									r				
6		r	r	**r**				r	r	**s**			r
7										**r**			

Eingeteilt nach der Sauerstoffspannung ist das Auftreten reizinduzierter (r) oder spontaner (s) SD-ähnlicher Ereignisse in den 7 untersuchten OHSK im Verlauf dargestellt. Die Doppelpulsreizung erfolgte alle 10 min. Nach jeweils 30 min, im Anschluss an die jeweils 3. Reizung, wurde die Begasung umgeschaltet.

Reoxygenierung mit erhöhten Sauerstoffspannungen nach Hypoxie reduziert die Zellschäden in OHSK nicht, sondern verstärkt sie

Nachdem ein zellschädigender Einfluss erhöhter Sauerstoffspannungen in OHSK gezeigt werden konnte, ergab sich die Frage, ob im Gegensatz dazu die Reoxygenierung mit erhöhten Sauerstoffspannungen im Anschluss an eine Hypoxie protektiv wirkt. Auf Basis dieser plausiblen Annahme erfolgt die therapeutische

Anwendung bei perinataler Asphyxie in Form 100%iger Sauerstoffventilation. In einem Kooperationsprojekt mit Graulich et al. (Abt. f. Neonatologie) konnte nachgewiesen werden, dass die Zellschäden unter Reoxygenierung mit 85%-Sauerstoffspannung gegenüber denen mit 19%-Sauerstoffspannung deutlich erhöht sind. Die Experimente wurden in einem sauerstoffeinstellbaren Inkubator durchgeführt und waren somit unabhängig von Störfaktoren, die durch die elektrophysiologische Messkammer bedingt sind. Die Zellschäden wurden mit zwei Methoden, der Laktatdehydrogenase-Aktivität und der PJ-Fluoreszenzintensität, unabhängig voneinander bestimmt. Beide Methoden lieferten übereinstimmende Ergebnisse (siehe [18]).

Anhaltende epileptiforme Aktivität führt auch unter 20%-Sauerstoffspannung zu Zellschäden in OHSK

Die zellschädigende Wirkung anhaltender epileptiformer Aktivität im Niedrig-Mg^{2+}-Modell in OHSK wurde unter 95%-Sauerstoffspannung nachgewiesen [9]. Es stellte sich daher die Frage, ob die erhöhte Sauerstoffspannung eine notwendige Bedingung für diese Zellschäden darstellt. Analog zur Untersuchung von Kovács et al. wurden deshalb OHSK, die bei Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen im Perfusionsmedium im Durchschnitt 51 min (± 6 min) epileptiforme Aktivität zeigten, mit nicht-epileptiformen OHSK verglichen, die mit Mg^{2+}-haltigem artifiziellem Liquor perfundiert wurden. Im Gegensatz zur Voruntersuchung von Kovács et al. wurde mit 20%-Sauerstoffspannung begast. Es fand sich, wie in der Voruntersuchung, eine signifikant erhöhte PJ-Fluoreszenzintensität in allen drei Regionen (CA1, CA3, Gyrus dentatus) der OHSK mit anhaltender epileptiformer Aktivität (siehe [17]). Eine Auffälligkeit bestand darin, dass in 12 von 14 OHSK das initiale epileptiforme Ereignis nach Auswaschen von Mg^{2+} ein SD-ähnliches Ereignis war.

SD-ähnliche Ereignisse sind unter 20%-Sauerstoffspannung reliabel in OHSK auslösbar

Bereits in den vorangegangenen Experimenten fiel eine Neigung zu reizinduzierten und auch spontanen SD-ähnlichen Ereignissen bei Begasung mit 20%-Sauerstoffspannung auf. Diese Beobachtung wurde um eine systematische Untersuchung ergänzt. Das Ziel bestand darin, SD- ähnliche Ereignisse vom Auftreten anderer Typen epileptiformer

Aktivität zu isolieren, um schließlich das spezifische zellschädigende Potential SD-ähnlicher Ereignisse festzustellen.

In 64 % der 61 getesteten OHSK konnten durch repetitive (2-200 Pulse, 20 Hz) antidrome Reizung im Alveus/Stratum oriens unter 20%-Sauerstoffspannung SD-ähnliche Ereignisse in den Strata pyramidale und radiatum der CA1-Region ausgelöst werden (siehe [19]). SD-ähnliche Ereignisse erfüllten wesentliche SD definierende Kriterien:

a) ausgeprägte transiente negative Verschiebung des Feldpotentials: Amplitude: 31,1 ± 1,0 mV, halbmaximale Dauer: 21,9 ± 1,6 s, assoziiert mit einer intrazellulären Depolarisation (siehe [19], Abb. 2)

b) ausgeprägte Ionenumverteilung: Maximum der extrazellulären Kaliumkonzentration: 49,3 ± 4,9 mM, Minimum der Calciumkonzentration: 0,3 ± 0,1 mM (siehe [19], Abb. 2)

c) Ausbreitung vom Stratum pyramidale der CA1-Region in die Strata radiatum und oriens sowie teilweise in die benachbarten Regionen CA3 und Subiculum mit einer mittleren Ausbreitungsgeschwindigkeit von 3,26 ± 0,14 mm/min (siehe [19], Abb. 3)

d) Sensitivität gegenüber Glutamat-Rezeptor-Antagonisten

Nicht komplett erfüllt war das Kriterium der Unterdrückung jeglicher spontaner und reizinduzierter neuronaler Aktivität während einer SD, weshalb die Bezeichnung „SD-ähnliches Ereignis“ gewählt wurde. Reizinduzierte und spontane Summenaktionspotentiale sowie analog dazu die intrazellulär gemessenen Aktionspotentiale wurden unterdrückt, während postsynaptische Feldpotentiale und intrazelluläre postsynaptische Potentiale spontan und reizinduziert auftraten (siehe [19], Abb. 2). Das Muster dieser schnellen Potentiale, die die Feldpotentialänderungen SD-ähnlicher Ereignisse überlagerten, erinnerte an Krampf-ähnliche Ereignisse mit initial tonischer und später klonischer Komponente.

Repetitive SD-ähnliche Ereignisse führen zu Zellschäden in OHSK

Unter Verwendung der beschriebenen Methode wurden SD-ähnliche Ereignisse mit einem Intervall von 10-15 min wiederholt ausgelöst. Im Verlauf wurden die elektrophysiologischen Charakteristika von SD-ähnlichen Ereignissen und die

Amplitude des reizinduzierten Feldpotentials sowie im Anschluss die PJ-Fluoreszenzintensität zur Bestimmung von Zellschäden analysiert.
Bezüglich elektrophysiologischer Charakteristika von SD-ähnlichen Ereignissen zeigten sich eine kontinuierliche signifikante Zunahme der Dauer sowie eine Abnahme der Amplitude des negativen Feldpotentials (siehe [19], Abb. 4). Als Zeichen einer leichteren Auslösbarkeit von SD-ähnlichen Ereignissen fanden sich eine Abnahme der Latenz und eine Abnahme der Pulsschwelle. Die zunehmende Dauer von SD-ähnlichen Ereignissen und die damit einhergehenden Ionenverschiebungen weisen auf eine kontinuierliche Einschränkung der Kompensationsmechanismen von Glia- und Nervenzellen hin. Als Zeichen einer neuronalen Funktionsstörung konnte eine Abnahme sowohl der orthodromen als auch der antidromen Feldpotentialamplitude gezeigt werden (siehe [19], Abb. 4). Schließlich gelang der Nachweis erhöhter Fluoreszenzintensität, die in den Regionen besonders ausgeprägt war, die zuvor SD-ähnlichen Ereignissen ausgesetzt waren (siehe [19], Abb. 5).

Diskussion

Bezüglich der in der Einleitung aufgeworfenen Fragen ergeben sich aus den Versuchsreihen die folgenden Antworten:

a) Erhöhte Sauerstoffspannungen führen per se zu Zellschäden in OHSK, die durch elektrophysiologische Parameter und die PJ-Fluoreszenzintensität bestimmt wurden. Die 20%-Sauerstoffspannung, die einem Sauerstoffpartialdruck im Gewebe von ca. 60-120 mmHg entspricht, erscheint optimal. Das Ausmaß der Zellschäden ist bei einer Sauerstoffspannung von 60 % mäßig und bei einer Sauerstoffspannung von 95 % deutlich erhöht. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Sauerstoffpartialdruck und Ausmaß der Zellschäden lässt sich vermuten.

b) Die Reoxygenierung mit erhöhten Sauerstoffspannungen nach neuronaler Hypoxie verstärkt die hypoxiebedingten Zellschäden in OHSK, die durch die LDH-Aktivität und die PJ-Fluoreszenzintensität bestimmt wurden.

c) Erhöhte Sauerstoffspannungen sind keine notwendige Bedingung für Zellschäden infolge anhaltender epileptiformer Aktivität in OHSK.

d) SD-ähnliche Ereignisse treten in OHSK unter 20%-Sauerstoffspannung verglichen mit höheren Sauerstoffspannungen gehäuft auf und lassen sich zuverlässig durch repetitive antidrome Reizung im Alveus/Stratum oriens auslösen und somit von anderen Typen epileptiformer Aktivität isolieren. Wiederholt ausgelöste SD-ähnliche Ereignisse haben Zellschäden in OHSK zur Folge, die durch elektrophysiologische Parameter und die PJ-Fluoreszenzintensität bestimmt wurden.

Grundsätzlich wird die Aussagekraft bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane in vivo Situation eingeschränkt durch Unterschiede zwischen den Spezies, präparations- und kultivierungsbedingte strukturelle Veränderungen (z.B. abnorme Konnektivität [6]) und möglicherweise kultivierungsabhängiger Vulnerabilität gegenüber Sauerstoffveränderungen.

Trotz dieser Unterschiede im Gewebe finden sich interessante Übereinstimmungen zu Ergebnissen aus vorangegangenen in vivo Untersuchungen, die sich mit erhöhten Sauerstoffspannungen im Gehirn beschäftigten. Erhöhte Sauerstoffspannungen entstehen im kindlichen Hippokampus, wenn im Rahmen einer Wiederbelebung bei perinataler Asphyxie mit 100 % Sauerstoff ventiliert wird. Der daraus resultierende Sauerstoffpartialdruck im Hippokampus ist nicht bekannt. Indirekte Hinweise ergeben sich aus Messungen des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks in Neugeborenen und in Tiermodellen sowie aus intraoperativen Messungen im Hirngewebe von Erwachsenen. Diese Messungen zeigten einen variablen Sauerstoffpartialdruck zwischen 100 und 350 mmHg unter 100%iger Sauerstoffventilation (siehe [18]). Demgegenüber liegt der Sauerstoffpartialdruck unter normoxischen Bedingungen, basierend auf Tiermodellen und intraoperativen Messungen bei Erwachsenen, unterhalb von 100 mmHg [20, 21]. Die in OHSK durchgeführten Sauerstoffmessungen zeigen, dass mit Werten zwischen 60 und 120 mmHg bei 20%-Sauerstoffspannung eine näherungsweise physiologische normoxische Situation erreicht wird, während mit Werten zwischen 550 und 670 mmHg bei 95%-Sauerstoffbegasung eine hyperoxische Situation vorliegt, die über diejenige unter 100%iger Sauerstoffventilation hinausgeht. Werte dieser Größenordnung wurden in Tiermodellen bei Überdruckbeatmung mit 100%iger Sauerstoffventilation gemessen [22], einer Therapie, die z.B. bei Dekompressiontraumata indiziert ist. Eine bekannte Nebenwirkung dieser Therapie sind Krampfanfälle [23]. In Übereinstimmung damit wurde in OHSK gehäuft epileptiforme Aktivität unter erhöhter Sauerstoffspannung beobachtet. Letztlich bietet sich die OHSK als ein System an, in dem die

Pathophysiologie hyperoxieinduzierter Krampfäquivalente und Schädigungsmechanismen weiter untersucht werden kann. Die zellschädigende und epileptogene Wirkung erhöhter Sauerstoffspannung wird auf eine Vermehrung von Sauerstoffradikalen, insbesondere NO [24], zurückgeführt. Daraus resultieren eine Glutamat- und Aspartat-vermittelte Exzitotoxizität [25] und eine Störung des Elektronentransports der Atmungskette mit darauf folgender ATP-Verarmung [26], Lipid- und Proteinoxidation [27] und Steigerung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration über Ryanodine-Rezeptoren [28], L- und P-Ca^{2+}-Kanäle [29].

Bereits in vorangegangenen tierexperimentellen Arbeiten wurden indirekt Zellschäden durch hyperoxische Reoxygenierung nach Asphyxie beschrieben (siehe [18]). Die Versuchsreihe in OHSK konnte nun die Zellschäden mittels Bestimmung der LDH-Aktivität und PJ-Fluoreszenzintensität direkt nachweisen.

Bezüglich der zellschädigenden Wirkung anhaltender epileptiformer Aktivität im Niedrig-Mg^{2+}-Modell konnten die Ergebnisse von Kovács et al., die unter 95%-Sauerstoffspannung gewonnen wurden, auch unter 20%-Sauerstoffspannung reproduziert werden. Somit ist die erhöhte Sauerstoffspannung keine notwendige Bedingung für Zellschäden infolge anhaltender epileptiformer Aktivität. Der Schädigungsmechanismus von Krampf-ähnlichen Ereignissen umfasst eine Störung der mitochondrialen Funktion durch intramitochondriale Ca^{2+}-Akkumulation mit einem Versagen der NADH-Produktion und schließlich dem vermehrten Auftreten von Sauerstoffradikalen mit Folgeschäden [10, 11].

Unter normoxischen Bedingungen gelang es erstmals in OHSK, SD-ähnliche Ereignisse ohne artifizielle Veränderung des Perfusionsmediums durch repetitive elektrische Stimulation ausreichend zuverlässig und wiederholt auszulösen. In Voruntersuchungen unter der üblichen 95%-Sauerstoffspannung wurde das Niedrig-Mg^{2+}-Modell benutzt oder NaCl durch NaAcetat ersetzt, um die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes zu steigern [9, 30]. Die normoxische Bedingung könnte über eine verminderte Na^{+}-K^{+}-ATPase Aktivität infolge verminderter ATP-Produktion stimulationsassoziiert zu höheren extrazellulären K^{+}-Konzentrationen führen und dadurch die Erregbarkeit steigern (siehe [19]). Zu betonen ist, dass die normoxische Bedingung der physiologischen in vivo Situation am ehesten entspricht und deshalb für Untersuchungen des Schädigungspotentials von SD-ähnlichen Ereignissen im kindlichen Hippokampus optimal geeignet erscheint.

Die zellschädigende Wirkung von wiederholt auftretenden SD-ähnlichen Ereignissen konnte in normoxischen OHSK unter Verwendung der beschriebenen Methode nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führten wiederholte SD im gesunden Hippokampus von adulten Tieren nicht zu Zellschäden [31]. Diese sind für adulte Tiere ausschließlich im vorgeschädigten, z.B. hypoxischen, Hippokampus beschrieben [32]. Folgende Interpretationen des Ergebnisses in OHSK sind denkbar: a) die Zellschäden sind auf die fehlende Unterdrückung spontaner postsynaptischer an Krampfäquivalente erinnernder Aktivität zurückzuführen, die in SD normalerweise nicht auftritt, b) OHSK entsprechen aufgrund der Präparation und Kultivierung einem vorgeschädigtem Hippokampus und c) der kindliche Hippokampus verfügt grundsätzlich über unreife Kompensationsmechanismen und ist deshalb anfälliger für das Auftreten von SD und resultierenden Zellschäden. Letztlich sind diese Hypothesen durch einen in vivo Ansatz prüfbar.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Uwe Heinemann für die Schaffung eines tollen wissenschaftlichen und persönlichen Arbeitsklimas mit stimulierenden Diskussionen und experimentellen Freiräumen. Besonders danke ich für die anhaltende Unterstützung.

Frau Dr. Siegrun Gabriel danke ich für die Lehre der elektrophysiologischen Methoden, andauernde Unterstützung, die spannende Zusammenarbeit und insbesondere das freundschaftliche Verhältnis. Herrn Dr. Richard Kovács danke ich für die Lehre der fluoreszenzmikroskopischen Methoden und interessante Gespräche.

Frau Prof. Tallie Z. Baram sei Dank für die Einladung zur Mitarbeit in ihrem Labor in Irvine (UCI), die dort ausgesprochen anregenden Diskussionen und die Einsichten in den kalifornischen Alltag. Vielen Dank an Dr. Roland Bender, Tom Storey und Lutz Vogeley für eine schöne und erkenntnisreiche Zeit.

Ulrike Hoffmann, Dr. Johannes Graulich, Stephan Haack, Dr. Gabor Petzold, Dr. Katharina Buchheim, Nikolai Axmacher, Christian Wozny, Dr. Tom Schilling, Dr. Sebastian Schuchmann und Olaf Windmüller danke ich für die überaus freundschaftliche, hilfsbereite und fruchtbare Zusammenarbeit .

Bei Herrn Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Herrn Dr. Herbert Siegmund, Frau Dr. Kathrin Schulz, Frau Sieglinde Latta und Frau Sonja Frosinski bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit in technischen und organisatorischen Belangen.

Meiner Frau danke ich für ihre Geduld und bedingungslose Unterstützung, insbesondere nach frustranen Experimenten, und meinem kleinen Dorian für all das süße Lächeln. Meinen Eltern danke ich für die immerwährende Unterstützung in jeder Hinsicht.

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Hiermit erkläre ich, dass sich mein Anteil an den Publikationen folgendermaßen ergibt:
Publikationen (1), (3) und (4): Die Versuchsplanung, die Durchführung der Experimente (Präparation der Hirnschnitte und Kultivierung; Vorbereitung und Durchführung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen sowie der Sauerstoffmessungen), die Auswertung der Experimente (Datenerhebung, deskriptive und beurteilende Statistik) und die Erstellung der Manuskripte sowie die Betreuung der Publikationsprozesse (Korrespondierender Autor) wurden hauptsächlich durch mich unter Betreuung von Herrn Prof. Heinemann durchgeführt. Für die Publikation (4) wurden zusätzlich Messungen der intrinsisch optischen Signale gemeinsam mit Herrn Stephan Haack und Herrn Dr. Gabor Petzold (Abt. für Experimentelle Neurologie) durchgeführt.
Publikationen (2) und (8): Federführend waren bei diesen Publikationen Frau Ulrike Hoffmann und Herr Dr. Johannes Graulich (Abt. für Neonatologie). Ich war bei der Präparation und Kultivierung der Hirnschnittkulturen, der Durchführung der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messungen und der Korrektur der Manuskripte beteiligt.
Publikation (7): Federführend war bei dieser Publikation Frau Dr. Siegrun Gabriel. Ich führte zahlreiche elektrophysiologische Messungen an resezierten Hippokampi von Patienten mit Temporallappenepilepsie durch und war an der Auswertung und Korrektur des Manuskriptes beteiligt.
Publikationen (5) und (6): Zu diesen Publikationen trug ich während eines halbjährigen Forschungsaufenthaltes bei Frau Prof. Baram an der UC Irvine, USA, bei. Für die Publikation (5) recherchierte ich in verschiedenen Bibliotheksverzeichnissen, die teilweise bis in das 19. Jh. zurückreichten. Mein Anteil an der Publikation (6) bestand aus der Etablierung der Methode der Hirnschnittkulturen im Labor von Frau Prof. Baram und der Durchführung unterschiedlicher immunhistochemischer Färbungen an Hirnschnittkulturen.

Berlin, den 16.01.06 Jörn K. Pomper

Publikationsliste

Ausgewählte Publikationen

1. Pomper, J.K., Graulich, J., Kovács, R., Hoffmann, U., Gabriel, S. and Heinemann, U., High oxygen tension leads to acute cell death in organotypic hippocampal slice cultures, Brain Res Dev Brain Res, 126 (2001) 109-16 [16].
2. Graulich, J., Hoffmann, U., Maier, R.F., Ruscher, K., Pomper, J.K., Ko, H.K., Gabriel, S., Obladen, M. and Heinemann, U., Acute neuronal injury after hypoxia is influenced by the reoxygenation mode in juvenile hippocampal slice cultures, Brain Res Dev Brain Res, 137 (2002) 35-42 [18].
3. Pomper, J.K., Hoffmann, U., Kovács, R., Gabriel, S. and Heinemann, U., Hyperoxia is not an essential condition for status epilepticus induced cell death in organotypic hippocampal slice cultures, Epilepsy Res, 59 (2004) 61-5 [17].
4. Pomper, J.K., Haack S., Petzold G.C., Buchheim K., Gabriel S., Hoffmann U. and Heinemann U., Repetitive normoxic spreading depression like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures, J Neurophysiol, 95 (2006) 355-68 [19].

Weitere Publikationen

5. Eling, P., Renier, W.O., Pomper, J. and Baram, T.Z., The mystery of the doctor's son, or the riddle of West syndrome, Neurology 58 (2002) 953-955 [33].
6. Chen, Y., Bender, R.A., Brunson K.L., Pomper, J.K., Grigoriadis, D.E., Wurst, W. and Baram T.Z., Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 15782-15787 [34].
7. Gabriel, S., Njunting, M., Pomper J.K., Merschhemke M., Sanabria, E.R.G., Eilers, A., Kivi, A., Zeller, M., Meencke, H-J., Cavalheiro, E.A., Heinemann, U. and Lehmann, T-N., Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis, J Neurosci, 24 (2004) 10416-10430 [35].
8. Hoffmann, U., Pomper J.K., Graulich, J., Zeller, M., Schuchmann, S., Gabriel, S., Maier, R.F. and Heinemann, U., Changes in neuronal activity in area CA1 and CA3

after hypoxic periods with normoxic and hyperoxic reoxygenation in juvenile rat organotypic hippocampal slice cultures, Brain Res Dev Brain Res. (2005) [36].

Literaturverzeichnis

[1] Mathern, G. W.; Babb, T. L.; Leite, J. P.; Pretorius, K.; Yeoman, K. M. und Kuhlman, P. A. (1996): The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, Epilepsy Res (Band 26), Nr. 1, Seite 151-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8985697

[2] Sommer, W. (1880): Erkrankung des Ammonshorn als aetiologisches Moment der Epilepsie, Arch Psychiatr Nervenkr (Band 10), Seite 631-675.

[3] Sankar, R.; Shin, D. H.; Liu, H.; Mazarati, A.; Pereira de Vasconcelos, A. und Wasterlain, C. G. (1998): Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences, J Neurosci (Band 18), Nr. 20, Seite 8382-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9763481

[4] Towfighi, J.; Mauger, D.; Vannucci, R. C. und Vannucci, S. J. (1997): Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study, Brain Res Dev Brain Res (Band 100), Nr. 2, Seite 149-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9205806

[5] Stoppini, L.; Buchs, P. A. und Muller, D. (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, J Neurosci Methods (Band 37), Nr. 2, Seite 173-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1715499

[6] Gutierrez, R. und Heinemann, U. (1999): Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus, Brain Res (Band 815), Nr. 2, Seite 304-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9878801

[7] Bernaudin, M.; Nouvelot, A.; MacKenzie, E. T. und Petit, E. (1998): Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia, Exp Neurol (Band 150), Nr. 1, Seite 30-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9514820

[8] Laake, J. H.; Haug, F. M.; Wieloch, T. und Ottersen, O. P. (1999): A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence, Brain Res Brain Res Protoc (Band 4), Nr. 2, Seite 173-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446412

[9] Kovacs, R.; Gutierrez, R.; Kivi, A.; Schuchmann, S.; Gabriel, S. und Heinemann, U. (1999): Acute cell damage after low Mg2+-induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures, Neuroreport (Band 10), Nr. 2, Seite 207-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10203310

[10] Kovacs, R.; Schuchmann, S.; Gabriel, S.; Kann, O.; Kardos, J. und Heinemann, U. (2002): Free radical-mediated cell damage after experimental status

epilepticus in hippocampal slice cultures, J Neurophysiol (Band 88), Nr. 6, Seite 2909-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12466417

[11] Kovacs, R.; Schuchmann, S.; Gabriel, S.; Kardos, J. und Heinemann, U. (2001): Ca2+ signalling and changes of mitochondrial function during low-Mg2+-induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures, Eur J Neurosci (Band 13), Nr. 7, Seite 1311-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11298791

[12] Heinemann, U.; Beck, H.; Dreier, J. P.; Ficker, E.; Stabel, J. und Zhang, C. L. (1992): The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity, Epilepsy Res Suppl (Band 7), Seite 273-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1334666

[13] Nicholson, C. (1993): Ion-selective microelectrodes and diffusion measurements as tools to explore the brain cell microenvironment, J Neurosci Methods (Band 48), Nr. 3, Seite 199-213. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8412303

[14] Vornov, J. J.; Tasker, R. C. und Coyle, J. T. (1991): Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures, Exp Neurol (Band 114), Nr. 1, Seite 11-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1717307

[15] Newell, D. W.; Barth, A.; Papermaster, V. und Malouf, A. T. (1995): Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, J Neurosci (Band 15), Nr. 11, Seite 7702-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7472521

[16] Pomper, J. K.; Graulich, J.; Kovacs, R.; Hoffmann, U.; Gabriel, S. und Heinemann, U. (2001): High oxygen tension leads to acute cell death in organotypic hippocampal slice cultures, Brain Res Dev Brain Res (Band 126), Nr. 1, Seite 109-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11172892

[17] Pomper, J. K.; Hoffmann, U.; Kovacs, R.; Gabriel, S. und Heinemann, U. (2004): Hyperoxia is not an essential condition for status epilepticus induced cell death in organotypic hippocampal slice cultures, Epilepsy Res (Band 59), Nr. 1, Seite 61-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15135168

[18] Graulich, J.; Hoffmann, U.; Maier, R. F.; Ruscher, K.; Pomper, J. K.; Ko, H. K.; Gabriel, S.; Obladen, M. und Heinemann, U. (2002): Acute neuronal injury after hypoxia is influenced by the reoxygenation mode in juvenile hippocampal slice cultures, Brain Res Dev Brain Res (Band 137), Nr. 1, Seite 35-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12128252

[19] Pomper, J. K.; Haack, S.; Petzold, G. C.; Buchheim, K.; Gabriel, S.; Hoffmann, U. und Heinemann, U. (2006): Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia, J Neurophysiol (Band 95), Nr. 1, Seite 355-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16177179

[20] Vovenko, E. (1999): Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats, Pflugers Arch (Band 437), Nr. 4, Seite 617-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10089576

[21] van den Brink, W. A.; van Santbrink, H.; Steyerberg, E. W.; Avezaat, C. J.; Suazo, J. A.; Hogesteeger, C.; Jansen, W. J.; Kloos, L. M.; Vermeulen, J. und Maas, A. I. (2000): Brain oxygen tension in severe head injury, Neurosurgery (Band 46), Nr. 4, Seite 868-76; discussion 876-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10764260

[22] Jamieson, D. und Vandenbrenk, H. A. (1963): Measurement of Oxygen Tensions in Cerebral Tissues of Rats Exposed to High Pressures of Oxygen, J Appl Physiol (Band 18), Seite 869-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14063253

[23] Gabb, G. und Robin, E. D. (1987): Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases, Chest (Band 92), Nr. 6, Seite 1074-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3315479

[24] Elayan, I. M.; Axley, M. J.; Prasad, P. V.; Ahlers, S. T. und Auker, C. R. (2000): Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain, J Neurophysiol (Band 83), Nr. 4, Seite 2022-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10758112

[25] Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; London, E. D.; Bredt, D. S. und Snyder, S. H. (1991): Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 88), Nr. 14, Seite 6368-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1648740

[26] Stadler, J.; Billiar, T. R.; Curran, R. D.; Stuehr, D. J.; Ochoa, J. B. und Simmons, R. L. (1991): Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes, Am J Physiol (Band 260), Nr. 5 Pt 1, Seite C910-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1903597

[27] Chavko, M. und Harabin, A. L. (1996): Regional lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain after hyperbaric oxygen exposure, Free Radic Biol Med (Band 20), Nr. 7, Seite 973-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8743983

[28] Clementi, E.; Riccio, M.; Sciorati, C.; Nistico, G. und Meldolesi, J. (1996): The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway, J Biol Chem (Band 271), Nr.

30, Seite 17739-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8663443

[29] Ohkuma, S.; Katsura, M.; Hibino, Y.; Xu, J.; Shirotani, K. und Kuriyama, K. (1998): Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca2+ channels in mouse cerebral cortical neurons, Brain Res Mol Brain Res (Band 54), Nr. 1, Seite 133-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9526065

[30] Kunkler, P. E. und Kraig, R. P. (1998): Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures, J Neurosci (Band 18), Nr. 9, Seite 3416-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9547248

[31] Nedergaard, M. und Hansen, A. J. (1988): Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain, Brain Res (Band 449), Nr. 1-2, Seite 395-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3395856

[32] Busch, E.; Gyngell, M. L.; Eis, M.; Hoehn-Berlage, M. und Hossmann, K. A. (1996): Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging, J Cereb Blood Flow Metab (Band 16), Nr. 6, Seite 1090-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8898680

[33] Eling, P.; Renier, W. O.; Pomper, J. und Baram, T. Z. (2002): The mystery of the Doctor's son, or the riddle of West syndrome, Neurology (Band 58), Nr. 6, Seite 953-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11914414

[34] Chen, Y.; Bender, R. A.; Brunson, K. L.; Pomper, J. K.; Grigoriadis, D. E.; Wurst, W. und Baram, T. Z. (2004): Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 101), Nr. 44, Seite 15782-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15496472

[35] Gabriel, S.; Njunting, M.; Pomper, J. K.; Merschhemke, M.; Sanabria, E. R.; Eilers, A.; Kivi, A.; Zeller, M.; Meencke, H. J.; Cavalheiro, E. A.; Heinemann, U. und Lehmann, T. N. (2004): Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis, J Neurosci (Band 24), Nr. 46, Seite 10416-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15548657

[36] Hoffmann, U.; Pomper, J.; Graulich, J.; Zeller, M.; Schuchmann, S.; Gabriel, S.; Maier, R. F. und Heinemann, U. (2005): Changes of neuronal activity in areas CA1 and CA3 during anoxia and normoxic or hyperoxic reoxygenation in juvenile rat organotypic hippocampal slice cultures, Brain Res. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16380097