

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse epileptischer Aktivität
anhand intrinsischer optischer Signale
und elektrophysiologischer Methoden *in vitro*
nach Status epilepticus *in vivo*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Mark M. Elsner
aus Berlin-Charlottenburg

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. M. W. Riepe
 2. Prof. Dr. med. R. Köhling
 3. PD Dr. med. H. Meierkord

Datum der Promotion: 18.10.2004

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status epilepticus	7
1.1.1	Epileptische Anfälle	7
1.1.2	Epilepsien	7
1.1.3	Status epilepticus	8
1.1.3.1	Definition und Epidemiologie	8
1.1.3.2	Folgen des Status epilepticus	9
1.2	Experimentelle Epileptologie	11
1.2.1	Verwendete Modelle	11
1.2.1.1	Elektrisch induzierter Status epilepticus	11
1.2.1.2	Niedrig-Magnesium-Modell	12
1.2.1.3	Kombination der Modelle	13
1.3	Die Hippocampusformation	14
1.3.1	Anatomie und Physiologie	14
1.3.2	Pathologie und Pathophysiologie	17
2	FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	19
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Versuchsprotokoll	21
3.2	Versuchstiere und Implantation der Elektroden	21
3.3	Gruppeneinteilung und Induktion des Status epilepticus	22
3.4	Präparation und Anfertigung der Hirnschnitte	23
3.5	Perfusionskammern	24
3.6	Perfusionslösungen	25
3.7	Elektroden	25
3.7.1	Ionenselektive Mikroelektroden	25
3.7.2	Bipolare Reizelektroden	27
3.8	Elektrophysiologische Messungen	27
3.8.1	Viabilitätsprüfung der Präparate	27

3.8.2	Kontinuierliche Ableitungen.....	28
3.9	Messung intrinsischer optischer Signale	29
3.10	Datenerfassung und –analyse.....	30
3.10.1	Elektrophysiologische Daten	30
3.10.2	Optische Daten.....	32
3.10.2.1	Transmissionsänderung.....	32
3.10.2.2	Lokalisation und Größe der Ursprungsorte.....	32
3.10.2.3	Ausbreitungsmuster und -grad.....	33
3.10.3	Statistik und Datenpräsentation	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Elektrophysiologische Messgrößen	34
4.1.1	Latenz und Frequenz epileptischer Aktivität	34
4.1.2	Dauer der anfallsartigen Ereignisse	35
4.1.3	Feldpotenzial und extrazelluläre K ⁺ -Konzentration	38
4.2	Optische Messgrößen	41
4.2.1	Änderungen der Transmission	41
4.2.2	Ursprungsregionen.....	41
4.2.3	Größe des Ursprungs.....	43
4.2.4	Ausbreitungsmuster	47
4.2.5	Ausbreitungsgrad	49
4.2.6	Epileptische Aktivität im Gyrus dentatus	51
4.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
5	DISKUSSION	56
5.1	Methodenkritik	57
5.1.1	<i>In vivo</i> -Modell des Status epilepticus	57
5.1.2	Kombiniertes Hirnschnittpräparat	58
5.1.3	Kombination verschiedener Modelle	59
5.1.4	<i>In vitro</i> -Modell fokaler Anfälle	60
5.1.5	Interface- und Submerged-Bedingungen	61
5.1.6	Elektrophysiologische und optische Messung	62
5.2	Gesteigerte Exzitabilität nach Status epilepticus	64
5.2.1	Latenz bis zum Aktivitätsbeginn	64
5.2.2	Mögliche Grundlagen der gesteigerten Exzitabilität.....	65
5.2.2.1	Zunahme der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitation.....	66

5.2.2.2	Abnahme inhibitorischer Einflüsse.....	66
5.3	Folgen der elektrischen Stimulation.....	67
5.4	Gesteigerte Synchronizität nach Status epilepticus.....	68
5.4.1	Ursprung.....	68
5.4.1.1	Lokalisation des Ursprungs.....	68
5.4.1.2	Größe des Ursprungs	70
5.4.2	Ausbreitung	72
5.4.2.1	Diskontinuierliche Ausbreitung.....	73
5.4.3	Mögliche Grundlagen der gesteigerten Synchronizität	75
5.4.3.1	Disinhibition.....	75
5.4.3.2	Gesteigerte Inhibition	76
5.4.3.3	Gap junctions	77
5.4.3.4	Sprossung von Axonkollateralen der Prinzipalzellen.....	77
5.4.4	Perspektiven.....	78
5.5	Epileptische Aktivität im Gyrus dentatus.....	79
5.5.1	Invasion des Hippocampus	79
5.5.2	Autonomer Schrittmacher im Gyrus dentatus	80
5.5.3	Mögliche Grundlagen der autonomen Aktivität im Gyrus dentatus.....	81
5.5.3.1	Disinhibition der Körnerzellen	81
5.5.3.2	Gesteigerte Inhibition der Körnerzellen	84
5.5.3.3	Rekurrente Erregungskreisläufe durch Moosfasersprossung	84
5.5.3.4	Veränderte Dendriten der Körnerzellen	86
5.5.3.5	Veränderungen der Körnerzellschicht	86
5.5.4	Perspektiven.....	87
5.6	Zeitlicher Verlauf der funktionellen Änderungen	88
5.6.1	Funktionelle Defizite im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus	88
5.6.2	Vergleich mit vorangegangenen Studien	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	ANHANG.....	94
	Literaturverzeichnis.....	94
	Abkürzungsverzeichnis	113
	Danksagung.....	114
	Lebenslauf	115
	Wissenschaftliche Beiträge.....	116
	Erklärung an Eides statt.....	117

1 EINLEITUNG

1.1 Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status epilepticus

1.1.1 Epileptische Anfälle

Ein epileptischer Anfall stellt die klinische Manifestation einer abnormen und exzessiven Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn dar. Epileptische Anfälle können sich sehr vielfältig präsentieren, ihre gemeinsamen Merkmale sind das plötzliche Auftreten und die zeitliche Begrenzung auf Sekunden bis Minuten (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981). Das Entstehen solcher abnormen Entladungsmuster kann durch erworbene pathologische Veränderungen oder genetische Faktoren bedingt sein, die unter anderem zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen auf die Neurone geführt haben. Im epileptischen Anfall können neben Bewusstseinsänderungen motorische, sensorische, autonome oder psychische Symptome auftreten.

Nach der aktuellen Klassifikation der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) werden epileptische Anfälle wie folgt eingeteilt: Fokale (partielle) Anfälle sind dadurch gekennzeichnet, dass die epileptische Aktivität von einer umschriebenen Region ausgeht. Einfach-fokale Anfälle verlaufen ohne Beeinträchtigung des Bewusstseins, komplex-fokale Anfälle gehen hingegen mit einer Bewusstseinsstörung einher. Fokale Anfälle können in generalisierte Anfälle übergehen, dann werden sie als einfach- oder komplex-fokaler Anfall mit sekundärer Generalisierung bezeichnet. Primär generalisierte Anfälle zeichnen sich durch die initiale Beteiligung beider Hemisphären aus. Hier werden drei Subtypen unterschieden: 1) generalisiert-convulsive Anfälle mit vorwiegend atonischer, tonischer, klonischer oder tonisch-klonischer Manifestation, 2) generalisierte nicht-convulsive Anfälle, repräsentiert von den Absencen, und 3) myoklonische Anfälle (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981).

1.1.2 Epilepsien

Beim wiederholten Auftreten von epileptischen Anfällen (mindestens zwei), die nicht in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang zu einer erkennbaren Ätiologie

stehen, liegt eine Epilepsie vor. Für eine Charakterisierung der Epilepsien und Epilepsiesyndrome hat die ILAE eine Klassifikation der Epilepsien vorgestellt (Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989). In dieser Klassifikation werden Epilepsien in lokalisationsbezogene und generalisierte Formen unterteilt. In jeder Gruppe wird weiterhin zwischen symptomatischen, idiopathischen und kryptogenen Epilepsien differenziert. Epilepsien, die mit einer Erkrankung oder Läsion des Gehirns assoziiert sind, bezeichnet man als symptomatisch. Idiopathische Epilepsien haben hingegen keine erkennbare Ursache. Sie treten meist in Abhängigkeit vom Lebensalter auf und sind in der Regel genetisch bedingt (Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989). Als kryptogen bezeichnet man eine Epilepsie, wenn eine symptomatische Ursache vermutet wird, diese jedoch verborgen bleibt.

Die mit 60 bis 75 % häufigste lokalisationsbezogene Epilepsieform des Menschen ist die Temporallappenepilepsie (Sirven, 2002). Mit 87 % wird der Großteil der Anfälle bei diesem Krankheitsbild im Hippocampus generiert (Spencer et al., 1990), einer wichtigen Struktur des limbischen Systems (siehe 1.3). Es treten hierbei vorwiegend komplex-fokale Anfälle auf, die sich oftmals als pharmakoresistent erweisen: 70 bis 80 % der Patienten mit Temporallappenepilepsie sprechen auf eine antikonvulsive Therapie nicht oder nur unzureichend an (Leppik, 1992), so dass die operative Versorgung (anteriore Temporallappenresektion) eine wichtige Behandlungsoption darstellt. In Bezug auf die Ätiologie wurde gezeigt, dass ein enger Zusammenhang zwischen einer schweren neurologischen Erkrankung im Kindesalter und der Entwicklung einer mesialen Temporallappenepilepsie besteht. Es fand sich bei 70 % (Falconer und Taylor, 1968) bzw. 77 % (Mathern et al., 1995b) der Patienten ein komplizierter Fieberkrampf, eine schwere ZNS-Infektion, ein Schädel-Hirn-Trauma oder ein Status epilepticus in der Kindheit.

1.1.3 Status epilepticus

1.1.3.1 Definition und Epidemiologie

Der Status epilepticus repräsentiert die extremste Manifestation eines epileptischen Anfalls. Seit 1981 definiert die Internationale Liga gegen Epilepsie den Status epilepticus als „Anfall von ausreichender Länge oder mehrere Anfälle, die mit

hoher Frequenz ohne interiktale Erholung auftreten“ (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981). Untersuchungen zur Ätiologie des Krankheitsbildes haben ergeben, dass die Gesamtheit der Fälle zu gleichen Anteilen von akut symptomatischem, verzögert symptomatischem („remote symptomatic“) und idiopathischem Status epilepticus gebildet wird (Hauser, 1990). Als häufigste Ursache des symptomatischen Status epilepticus des Erwachsenen wurde in einer prospektiven, bevölkerungsbezogenen Studie ein zu niedriger Serumspiegel antikonvulsiver Substanzen bei vorbestehender Epilepsie identifiziert, gefolgt von länger zurückliegenden ZNS-Schäden und einem akuten zerebrovaskulären Insult (DeLorenzo et al., 1996). Die Inzidenz des Krankheitsbildes wird in der Literatur mit Werten zwischen 10 pro 100.000 Einwohner in den französischsprachigen Kantonen der Schweiz (Coeytaux et al., 2000) und 41 pro 100.000 Einwohner in Richmond/USA (DeLorenzo et al., 1995) angegeben. Für eine anhand der Postleitzahlen definierte Population im Bundesland Hessen ergab sich eine Inzidenz von 17,1 pro 100.000 Einwohner (Knake et al., 2001).

Die exakte Bestimmung der Morbidität gestaltet sich oftmals problematisch, da in den seltensten Fällen prämorbid Vergleichsdaten existieren. Die Literaturangaben liegen je nach Studie bei 12,5 % (Aminoff und Simon, 1980), 25 % (Rowan und Scott, 1970) oder 39 % (Shneker und Fountain, 2003). Der Status epilepticus stellt einen akut lebensbedrohlichen Zustand dar, dessen Mortalität bezogen auf die Anzahl der Episoden je nach Studie mit Werten zwischen 7,6 % (Coeytaux et al., 2000) und 22 % angegeben wird (DeLorenzo et al., 1995). In einer aktuellen prospektiven Studie ergab sich für die Mortalität ein Wert von 19,8 % (Garzon et al., 2003).

1.1.3.2 Folgen des Status epilepticus

Zahlreiche Studien haben Hinweise dafür geliefert, dass der Status epilepticus chronische funktionelle Defizite nach sich ziehen kann. Neben Gedächtnisstörungen und Beeinträchtigungen der kognitiven Leistungsfähigkeit ist hier in erster Linie die chronische Epilepsie zu nennen (Krumholz, 1999; Wasterlain et al., 1993) (siehe 1.1.2). In einer prospektiven Studie entwickelten 37 von 125 Kindern mit erstmalig aufgetretenem Status epilepticus in der Folge spontane epileptische An-

fälle (Maytal et al., 1989). Allerdings verweisen die Autoren darauf, dass 38 % der betroffenen Kinder bereits vor dem Status epilepticus einen auffälligen neurologischen Status hatten. In einer weiteren prospektiven Studie wird berichtet, dass bei 82 % der Kinder, die einen Status epilepticus erlitten hatten, in der Folge epileptische Anfälle auftraten (Verity et al., 1993). Eine andere Studie ergab, dass im Verlauf nach akut symptomatischem Status epilepticus das Risiko für das Auftreten spontaner Anfälle bei 43 % liegt, im Gegensatz zu einem Risiko von 10 % nach einem erstmaligen akut symptomatischen Anfall (Hesdorffer et al., 1998).

Ob bzw. in welchem Ausmaß ein stattgehabter Status epilepticus ursächlich zur Entwicklung einer chronischen Epilepsie beiträgt, ist schwierig zu beantworten, da viele Patienten schon vor dem Auftreten eines Status epilepticus unter spontanen Anfällen leiden oder eine Schädigung des Gehirns durch einen ischämischen Insult, eine toxisch-metabolische Störung, eine zerebrale Hypoxie, eine ZNS-Infektion oder eine Neoplasie aufweisen (Claassen et al., 2002). Janz kam bei der Zusammenfassung verschiedener Studien zu dem Ergebnis, dass bei 12 % der Patienten mit chronischer Epilepsie ein Status epilepticus die Erstmanifestation des Krankheitsbildes war. Bei den meisten dieser Patienten mit initialem Status epilepticus wurde zusätzlich ein neoplastischer oder vaskulärer Prozess identifiziert (Janz, 1983). In solchen Fällen besteht keine Möglichkeit zu differenzieren, ob sich die chronische Epilepsie als direkte Folge des Status epilepticus entwickelt hat oder ob beide Krankheitsbilder Ausdruck derselben Grunderkrankung sind. Andererseits lässt sich auch die Abwesenheit neuropathologischer Veränderungen vor dem Status epilepticus aufgrund fehlender präorbiter Befunde nur in den seltensten Fällen nachweisen, vor allem, wenn es sich um ein initiales Ereignis handelt. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Epileptogenese gestaltet sich am Patienten ebenfalls schwierig, da noch immer kontrovers diskutiert wird, welche Änderungen in EEG und Bildgebung dem Prozess zuzuordnen sind bzw. wie die Untersuchungszeitpunkte gewählt werden sollten (Duncan, 1997). Die systematische Untersuchung der Frage, inwiefern bzw. in welchem zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus eine Epileptogenese auftritt, ist also nur im Rahmen tierexperimenteller Studien möglich.

1.2 Experimentelle Epileptologie

In den vergangenen Jahrzehnten wurde in der Epilepsieforschung eine Vielzahl tierexperimenteller Modelle etabliert, um Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge zu gewinnen, die einem Status epilepticus bzw. den hieraus resultierenden rekurrenten epileptischen Anfällen zugrunde liegen. Der entscheidende Vorteil dieser Modelle liegt darin, dass sie dem Untersucher ermöglichen, strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hirngewebes zu allen Zeitpunkten und in allen Hirnregionen im Verlauf der Epileptogenese zu analysieren. Das Gehirn kann dabei unter Verwendung physiologischer, pharmakologischer und histologischer Techniken detailliert untersucht werden (Coulter et al., 2002).

1.2.1 Verwendete Modelle

Von den zahlreichen experimentellen Modellen, die für die Analyse epileptischer Aktivität und ihrer Folgen zur Verfügung stehen (Dichter, 1998), werden im Folgenden nur die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modelle vorgestellt. Auf einige Modelle, die mit den hier verwendeten vergleichbar sind, wird in der Diskussion näher eingegangen (siehe 5.1.3).

1.2.1.1 Elektrisch induzierter Status epilepticus

Das Modell des elektrisch induzierten Status epilepticus beruht auf der kontinuierlichen Applikation von elektrischen Impulsen über eine Elektrode, die zuvor in den Bereich der hippocampalen Afferenzen implantiert wurde (Mazarati et al., 2002; Lothman et al., 1990; Vicedomini und Nadler, 1987). Der entscheidende Vorteil des elektrischen Modells gegenüber chemokonvulsiven Modellen liegt darin, dass der auslösende Stimulus wegfällt, sobald der Stromkreis unterbrochen wird. Außerdem ist der induzierte Status epilepticus selbsterhaltend, d. h. die epileptische Aktivität dauert in Annäherung an die klinische Situation ohne äußere Einflüsse an. Desweiteren besteht im Gegensatz zu chemokonvulsiven Modellen nicht die Gefahr systemischer oder neurotoxischer Effekte. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die elektrische Induktion des Status epilepticus nach einem bestimmten Zeitraum (Latenzperiode) zur Entwicklung einer chronischen Epilepsie mit rekurrenten spontanen Anfällen führt. Parallel hierzu wurden in die-

sem Modell neuropathologische Veränderungen nachgewiesen, die der bei Patienten mit chronischer Epilepsie oftmals beschriebenen Hippocampusklerose (siehe 1.3.2) ähneln (Sloviter und Damiano, 1981). Hierbei führt auch die unilaterale Stimulation zu beidseitigen neuronalen Schäden (persönliche Mitteilung: Dr. Matthew Walker, UCL, London). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Ausmaß der neuronalen Schädigung nicht von den auftretenden rekurrenten Anfällen, sondern vom initialen Status epilepticus abhängt (Gorter et al., 2003).

1.2.1.2 Niedrig-Magnesium-Modell

Ein etabliertes Epilepsie-Modell *in vitro* ist das Niedrig-Magnesium (Mg^{2+})-Modell. Es wurde gezeigt, dass die Reduktion von Magnesium in der Nährlösung zum Auftreten epileptischer Aktivität im Schnittpräparat führt (Walther et al., 1986). Die von den Autoren beschriebene komplette Blockierbarkeit dieser Spontanaktivität durch 2-Aminophosphomonovalerat (2-APV) deutet auf die Beteiligung des exzitatorischen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors hin. Dieser Glutamatrezeptor besitzt einen transmembranären Ionenkanal, welcher bei hyperpolarisiertem Membranpotenzial durch Mg^{2+} -Ionen blockiert ist. Demzufolge führt der Entzug von Magnesium zur Aufhebung dieser Blockade und damit zur Öffnung des Kanals für mono- und bivalente Ionen, von denen Calcium (Ca^{2+}) die wichtigste Rolle spielt. Mit der Dauer der Auswaschphase steigt somit die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Depolarisation der Neurone.

Die auftretende epileptische Spontanaktivität hat verschiedene Erscheinungsformen (Jones und Heinemann, 1988; Mody et al., 1987). So lassen sich in der CA1- und CA3-Region unter diesen Bedingungen kurze rekurrente Entladungen mit einer Länge von 3–120 ms beobachten. In anderen Regionen des kombinierten Hirnschnittpräparates treten hingegen anfallsartige Ereignisse (AE) auf, die bis zu Minuten andauern können. Diese AEs sind durch einen plötzlichen negativen Abfall des Feldpotenzials gekennzeichnet, der von schnellen Aktionspotenzialen überlagert wird. Hierbei treten initial hochfrequente Aktionspotenziale auf, die später in niederfrequente gruppierte Entladungen übergehen. Im Verlauf der Auswaschphase entwickeln sich aus diesen AEs schnelle rekurrente Entladungen, die im Gegensatz zu den vorangegangenen Formen epileptischer Aktivität nicht mehr durch die gängigen Antikonvulsiva blockiert werden können. Aufgrund dieser Ei-

genschaft wird die sogenannte Spätaktivität als Modell des therapierefraktären Status epilepticus genutzt. Entscheidende Argumente dafür, dass die anfallsartigen Ereignisse als Modell für fokale Anfälle herangezogen werden können, bietet die Vergleichbarkeit mit elektrophysiologischen Veränderungen, die *in vivo* beobachtet wurden. So konnte im Ganztiermodell gezeigt werden, dass während eines fokalen epileptischen Anfalls auf zellulärer Ebene ein paroxysmaler Depolarisationsshift (PDS), im Extrazellulärraum ein plötzlicher Abfall des Feldpotenzials und im Oberflächen-EEG Poly-Spike-Wave-Aktivität auftritt (Ayala, 1983). Auch die Ionenverschiebungen im Hirnschnittpräparat sind mit der *in vivo* Situation vergleichbar (Heinemann et al., 1977). Die Synchronizität epileptischer Entladungen *in vivo* spiegelt sich in diesem Modell ebenfalls wider (Jones und Heinemann, 1988).

1.2.1.3 Kombination der Modelle

Das zeitliche und räumliche Verhalten der anfallsartigen Ereignisse, die im Niedrig-Mg²⁺-Modell induziert werden, hängt im Wesentlichen von den funktionellen und morphologischen Gegebenheiten im verwendeten Hirngewebe ab. Das Modell eignet sich daher nicht nur zur Analyse der epileptischen Aktivität an sich bzw. deren Beeinflussbarkeit durch pharmakologische Substanzen (Walther et al., 1986), sondern kann zusätzlich als Werkzeug eingesetzt werden, um Hinweise für funktionelle und strukturelle Unterschiede des Hirngewebes verschiedener Gruppen zu liefern. In vorangegangenen Arbeiten wurden so zum Beispiel funktionelle Veränderungen in Abhängigkeit vom Lebensalter analysiert (Holtkamp et al., 2003; Weissinger et al., 2000).

In der vorliegenden Studie diente das Niedrig-Mg²⁺-Modell ebenfalls als Werkzeug, allerdings wurde kein natives Hirngewebe analysiert, sondern Hirnschnitte von Tieren nach elektrisch induziertem SSSE *in vivo*. Es wurden also zwei experimentelle Ansätze zur Induktion epileptischer Aktivität miteinander kombiniert. Abweichungen des zeitlichen (Latenz bis zum Aktivitätsbeginn, Dauer der AEs) und räumlichen (Ursprung und Ausbreitung) Verhaltens der epileptischen Aktivität im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen sowie im zeitlichen Verlauf nach SSSE wurden mit elektrophysiologischen und optischen Methoden registriert. Es sollen so Prozesse aufgedeckt werden, die durch den SSSE initiiert worden sind.

1.3 Die Hippocampusformation

1.3.1 Anatomie und Physiologie

Als Hippocampusformation werden entorhinaler Cortex (EC), Subikulum (SUB), Ammonshorn (Cornu ammonis = CA) und Gyrus dentatus (*dentate gyrus* = DG) zusammengefasst (Johnston und Amaral, 1998). Sie liegt zum größten Teil im Temporallappen und wölbt sich von medial in das Unterhorn des Seitenventrikels vor, wo das Endstück eine tatzenähnliche Struktur bildet (temporaler Pol). Die Hippocampusformation erstreckt sich beim Menschen, der Rotationsbewegung der Hemisphären in der Fetalzeit folgend, bis zum kaudalen Ende des Balkens. Hier wird sie zu einer dünnen Schicht grauer Substanz reduziert (Indusium griseum), die an der Oberfläche des Balkens bis zu seinem rostralen Ende im Bereich der Septumregion zieht (septaler Pol). Dementsprechend wird die Längsachse der Hippocampusformation als septotemporale Achse und die Querachse als transversale Achse bezeichnet. Auf seiner ventrikulären Seite wird der Hippocampus von einer Faserschicht bedeckt, dem Alveus hippocampi. Der Alveus besteht aus efferenten Fasern der Pyramidenzellen des Ammonshorns und setzt sich in die Fimbria hippocampi und in den Fornix fort. Dieses Faserbündel verläuft in einem Bogen über den dritten Ventrikel - wobei die Fornices beider Hemisphären gemeinsam dessen Dach überspannen - nach rostral und endet im Corpus mamillare (Lopes da Silva et al., 1990).

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Hirnschnittpräparate der Ratte sind als Horizontalschnitte durch die Hippocampusformation durch das Bild zweier c-förmiger Zellschichten gekennzeichnet, die ineinander greifen: die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und die Pyramidenzellschicht des Ammonshorns (siehe Abbildung 1). Der Gyrus dentatus sitzt dem medialen Rand des Ammonshorns dabei wie eine Kappe auf. Der Anteil des Gyrus dentatus, den das Ammonshorn umschließt, wird als suprapyramidales Blatt, der darunter liegende Anteil als infrapyramidales Blatt bezeichnet. Während temporaler Cortex (TE), perirhinaler Cortex (PER) und entorhinaler Cortex den für den Neocortex typischen sechsschichtigen Aufbau aufweisen, lassen sich in den allocorticalen Strukturen Ammonshorn und Gyrus dentatus nur drei Schichten abgrenzen. Das Subiculum bildet die Übergangszone zwischen den beiden Rindenstrukturen.

Im Ammonshorn werden folgende Schichten unterschieden: Der durch eine Epithelschicht von der Ventrikeloberfläche abgegrenzte Alveus mit den efferenten Fasern der Pyramidenzellen des Ammonshorns bildet die innerste Schicht. An den Alveus schließt das Stratum oriens an, eine zellarme Schicht mit inhibitorischen Interneuronen (Korbzellen), deren Axone an den Pyramidenzellen enden.

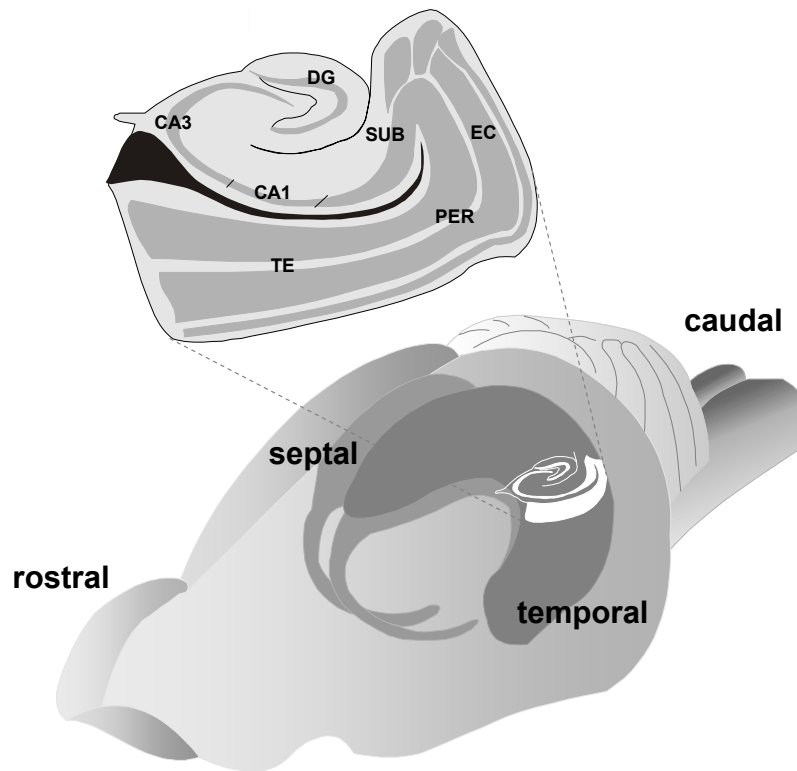


Abb. 1

Schematische Darstellung der Lage der Hippocampusformation im Gehirn der Ratte. Der vergrößerte Horizontalschnitt entspricht dem kombinierten Hirnschnittpräparat, wie es in der vorliegenden Arbeit zur Analyse epileptischer Aktivität verwendet wurde. Folgende Regionen lassen sich abgrenzen: temporaler Cortex (TE), perirhinaler Cortex (PER), entorhinaler Cortex (EC), Subiculum (SUB), Ammonshorn (CA) und Gyrus dentatus (DG). (modifiziert nach Witter et al., 2000)

Die Pyramidenzellen bilden als Prinzipalzellen des Ammonshorns das angrenzende Stratum pyramidale. Nach Größe und Dichte der Pyramidenzellen wird das Ammonshorn in drei Abschnitte unterteilt: In der CA1-Region finden sich kleine Pyramidenzellen, die CA2-Region ist durch ein schmales dichtes Band großer Pyramidenzellen, die CA3-Region durch ein breites lockeres Band großer Pyramidenzellen gekennzeichnet (Lorente de Nó, 1934). Die Spitzendendriten der Pyramidenzellen, die auf den Gyrus dentatus gerichtet verlaufen, bilden die äußerste Schicht, das Stratum moleculare. In dieser Schicht findet sich ein weiterer Subtyp

inhibitorischer Interneurone, die Chandelierzellen. Im Gegensatz zu den Korbzellen bilden diese Interneurone keine axosomatischen Synapsen mit dem Perikaryon, sondern axo-axonale Verbindungen mit dem Initialsegment der Prinzipalzellen. Neben den Axonen, die über den Alveus in Fimbria hippocampi und Fornix verlaufen, bilden die Pyramidenzellen der CA3-Region zusätzlich rückläufige Axonkollaterale aus (Schaffer-Kollaterale), die mit den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen Synapsen bilden (zur Übersicht: Johnston und Amaral, 1998).

Der Gyrus dentatus weist ebenfalls die für den Allokortex charakteristischen drei Schichten auf, die Prinzipalzellschicht wird hier aber nicht von Pyramidenzellen sondern von Körnerzellen gebildet. Die Dendriten der Körnerzellen erstrecken sich in die darüberliegende Molekularschicht. Die Axone der Körnerzellen werden als Moosfasern bezeichnet und entspringen an der Zellbasis, gegenüber dem Ursprung der Dendriten. Die Moosfasern ziehen durch die angrenzende polymorphe Schicht. Hier geben sie Kollaterale ab, die mit verschiedenen Subtypen inhibitorischer Interneurone sowie mit einer weiteren Form von Prinzipalzellen, den Mooszellen, Synapsen bilden. Die polymorphe Zellschicht, die von supra- und infrapyramidalem Blatt des Gyrus dentatus umschlossen wird, bezeichnet man auch als Hilus. Die Moosfasern verlassen den Hilusbereich und ziehen zu ihren Zielzellen, den Pyramidenzellen der CA3-Region des Ammonshorns.

Im entorhinalen Cortex wird zwischen oberflächlichen (I, II und III) und tiefen (IV, V, VI) Schichten unterschieden, die durch eine Lamina dissecans getrennt sind. Die Lamina dissecans ist nur im medialen Anteil der Region identifizierbar, im lateralen entorhinalen Cortex lässt sie sich nicht von Schicht III abgrenzen. Die oberflächlichen Schichten II und III bilden die Ursprungsregion des Tractus perforans, dem wichtigsten afferenten System des Hippocampus. Dieses Faserbündel „perforiert“ das Subiculum und endet sowohl in der Molekularschicht des Gyrus dentatus als auch in der CA3-Region des Ammonshorns (zur Übersicht: Lopes da Silva et al., 1990). Die trisynaptische Verschaltung von Tractus perforans auf die Körnerzellen, von den Körnerzellen über die Moosfasern auf die Pyramidenzellen der CA3-Region und schließlich über die Schaffer-Kollaterale auf die Pyramidenzellen der CA1-Region stellt den wichtigsten exzitatorischen Kreislauf der Hippocampusformation dar.

Die Hippocampusformation ist beim Menschen von großer Bedeutung für das Gedächtnis (zur Übersicht: Eichenbaum et al., 1992). Den entscheidenden Hinweis für diesen Zusammenhang liefert die Arbeit von Scoville und Milner, die über den Patienten H. M. nach bilateraler Resektion der Hippocampusformation zur Behandlung einer therapierefraktären Epilepsie berichtet haben (Scoville und Milner, 1957). Bei erhaltener kognitiver Leistungsfähigkeit verlor H. M. infolge der Operation die Fähigkeit, neue Informationen aufzunehmen und ins Langzeitgedächtnis zu überführen – eine Leistung des Gehirns, die seither der Hippocampusformation zugeschrieben wird. Ergebnisse neuerer Studien weisen darauf hin, dass die Hippocampusformation insbesondere für das Ortsgedächtnis und das episodische Gedächtnis von Bedeutung ist (zur Übersicht: Burgess et al., 2002).

1.3.2 Pathologie und Pathophysiologie

Ihrer physiologischen Funktion entsprechend führen pathologische Veränderungen im Bereich der Hippocampusformation unter anderem zu Störungen der Gedächtnisleistung. Es wurde in einer Fallstudie gezeigt, dass bereits die Schädigung der CA1-Region des Ammonshorns infolge eines ischämischen Insults ausreicht, um eine ausgeprägte anterograde Amnesie hervorzurufen, während kognitive Funktion und Langzeitgedächtnis intakt bleiben (Zola-Morgan et al., 1986). In einer weiteren Studie, die drei Fallbeschreibungen zusammenfasst, wird erstmals postuliert, dass eine Schädigung der Hippocampusformation auch zu einer retrograden Amnesie führen kann (Rempel-Clower et al., 1996).

Neben Störungen der Gedächtnisfunktion stellt die Generierung epileptischer Anfälle die wichtigste pathophysiologische Veränderung der Hippocampusformation dar. Die Hirnregion besitzt die niedrigste Schwelle für das Auftreten epileptischer Entladungen im Gehirn (Green, 1964). Bei der häufigsten Form der chronischen Epilepsie, der Temporallappenepilepsie (siehe 1.1.2), entstehen 87 % der Anfälle in der Hippocampusformation (Spencer et al., 1990). Die chirurgische Entfernung dieser Struktur ist ein effektives Verfahren zur Behandlung therapierefraktärer Temporallappenepilepsien (Engel, Jr., 1993). Über 80 % der Resektate weisen neuropathologische Veränderungen auf (Williamson et al., 1993). Diese sind gekennzeichnet durch Neuronenverluste und Gliose mit Verhärtung und Schrump-

fung des Ammonshorns. Hieraus resultierte die Bezeichnung Ammonshornsklerose (oder: Hippocampussklerose). Der Zelluntergang beschränkt sich hierbei charakteristischerweise auf die CA1- und CA3-Region des Ammonshorns und den Hilusbereich des Gyrus dentatus (Babb et al., 1984a; Babb et al., 1984b).

2 FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT

Zu den Folgen des Status epilepticus zählt unter anderem die chronische Epilepsie als Ausdruck einer gesteigerten Exzitabilität und Synchronizität des Hirngewebes. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem tierexperimentellen Modell das zeitliche und räumliche Verhalten epileptischer Aktivität nach Status epilepticus untersucht. Besonderes Interesse galt hierbei der Kinetik funktioneller Veränderungen im Verlauf nach Status epilepticus. Im Einzelnen sollten die folgenden Hypothesen überprüft werden:

1. **Der Status epilepticus führt zu einer gesteigerten Exzitabilität des Hirngewebes mit einer erniedrigten Schwelle für das Auftreten epileptischer Aktivität.**

Diese Hypothese lässt sich klinisch nur schwer überprüfen, da der Status epilepticus beim Patienten selten isoliert, sondern als Folge einer pathologischen Veränderung auftritt. In verschiedenen tierexperimentellen Statusmodellen wurden jedoch strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hirngewebes identifiziert, die mit einer gesteigerten Erregbarkeit des Hirngewebes einhergehen. Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die funktionellen Veränderungen durch Latenzmessungen in einem *in vitro*-Modell epileptischer Aktivität.

2. **Im Vergleich zum elektrisch induzierten Status epilepticus hat die alleinige Stimulation weniger funktionelle Folgen für das Hirngewebe.**

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Präparate stammen von Tieren nach elektrisch induziertem Status epilepticus. In diesem Modell kommt es zum Auftreten spontaner Anfälle. Neben einer operierten Kontrollgruppe (Elektrodenkontrollen) wurde eine weitere Kontrollgruppe gebildet, die unter Barbituratnarkose, also ohne Induktion eines Status epilepticus, stimuliert wurde (Stimulationskontrollen). So konnte zwischen funktionellen Folgen des Status epilepticus und Folgen der elektrischen Stimulation unterschieden werden.

3. **Nach Status epilepticus kommt es zu Änderungen von Ursprung und Ausbreitungsmuster epileptischer Aktivität im Hirnschnitt als Hinweis für eine veränderte Plastizität.**

Es gibt Hinweise dafür, dass eine Korrelation zwischen dem Ausbreitungsmuster epileptischer Aktivität im Hirngewebe und dem Schweregrad einer Epilepsie besteht. So konnte klinisch gezeigt werden, dass ein epilepsiechirurgischer Eingriff bei Patienten mit diskontinuierlichem Ausbreitungsmuster der Aktivität eine schlechtere Prognose hat als bei kontinuierlicher Ausbreitung. Für die Untersuchung des Ausbreitungsmusters wurde die hohe zeitliche Auflösung der elektrophysiologischen Messungen mit der optischen Messmethode kombiniert, um das räumliche Verhalten der epileptischen Aktivität optimal analysieren zu können.

4. Der Gyrus dentatus ist nach Status epilepticus in seiner Funktion beeinträchtigt.

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass der Gyrus dentatus unter normalen Bedingungen die Propagation anfallsartiger Ereignisse vom entorhinalen Cortex in die CA1- und CA3-Region des Ammonshorns verhindert. Bei der Kombination eines *in vivo*-Modells für chronische Temporallappenepilepsie (Kindling) mit dem Niedrig-Mg²⁺-Modell wurde beobachtet, dass die epileptische Aktivität diese Barriere überwinden konnte und es zur Invasion des Ammonshorns kam. In der vorliegenden Arbeit soll unter anderem überprüft werden, ob ein elektrisch induzierter Status epilepticus zu ähnlichen Veränderungen führt. In der Literatur finden sich in verschiedenen Tiermodellen des Status epilepticus Hinweise für eine Beeinträchtigung der GABAergen Inhibition im Gyrus dentatus.

5. Die funktionellen Änderungen sind im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus progredient.

Innerhalb der ersten beiden Monate nach elektrisch induziertem Status epilepticus kommt es zu einer progressiven Anfallsentwicklung. Elektrophysiologische Messungen haben gezeigt, dass es in diesem Zeitraum im Gyrus dentatus zu einer permanenten Hyperexzitabilität kommt, die mit dem epileptischen Zustand der Tiere ursächlich in Zusammenhang gebracht wurde.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsprotokoll

Mit Hilfe von elektrophysiologischen und optischen Messmethoden wurde das Verhalten epileptischer Aktivität in kombinierten Hirnschnittpräparaten von Wistar-Ratten im Niedrig-Mg²⁺-Modell untersucht. Hierbei handelte es sich um Tiere nach elektrisch induziertem, über drei Stunden selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) sowie um Elektroden-Kontrollen und Stimulationen-Kontrollen (siehe 3.3). Diese beiden Kontrollgruppen wurden gebildet, um zwischen Folgen des Status epilepticus und Folgen der Manipulation differenzieren zu können. Für die Beurteilung des dynamischen Verhaltens möglicher funktioneller Veränderungen wurden die *in vitro*-Experimente zu drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt: sieben bis zehn Tage, 28-32 Tage oder 56-60 Tage nach dem Status epilepticus. Zur Vereinfachung werden die SSSE-Gruppe und die beiden Kontrollen eines Untersuchungszeitpunktes im Folgenden als Ein-Wochen-, Vier-Wochen- bzw. Acht-Wochen-Gruppen bezeichnet.

3.2 Versuchstiere und Implantation der Elektroden

Die *in vivo*-Experimente wurden von Julia Matzen im Rahmen ihres Dissertationsprojektes durchgeführt (siehe Dissertation Julia Matzen, Kapitel 2, 2003). Hierbei wurden männliche Wistar-Ratten (220-460 g) durch intraperitoneale Applikation von 52 mg/kg KG Pentobarbital anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Anhand von stereotaktischen Koordinaten wurden Bohrlöcher für die Elektroden in die Schädelkalotte gesetzt. Den jeweiligen Koordinaten entsprechend wurden anschließend die Stimulationselektrode bis in den Tractus perforans und die Ableitelektrode in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus abgesenkt (jeweils 2-3 mm tief). Die Feinabstimmung der Tiefe der Elektrodenposition erfolgte unter Gabe von Teststimuli (150 μ s, 8 mA, 10 Stimuli alle 2 min) und gleichzeitiger Beurteilung des resultierenden Summenaktionspotenzials. Hierbei waren Amplitudengröße und physiologisches Aussehen die entscheidenden Parameter. Abschließend wurden die Elektroden am Schädeldach fixiert.

3.3 Gruppeneinteilung und Induktion des Status epilepticus

Nach einer Erholungsphase von acht bis zehn Tagen wurden die Tiere über die entsprechende Elektrode 120 min elektrisch stimuliert (20 Hz, 50-150 μ s, 3-5 mA). Etwa 60 min nach Beginn der Stimulation wurden zunehmende hochamplitudige Entladungen beobachtet. Dieses Entladungsmuster hielt auch nach Stimulationsende mit einer Frequenz von > 1 Hz an, wodurch die elektrophysiologischen Kriterien eines selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) erfüllt waren. Der SSSE wurde nach 180 min durch die intraperitoneale Injektion von 30 mg Pentobarbital/kg KG beendet. Die Stimulations-Kontrollen erhielten die Barbiturat-injektion bereits vor Beginn der Stimulation, so dass sich bei keinem der Tiere ein klinisch oder elektrographisch nachweisbarer Status epilepticus entwickelte. Die Elektroden-Kontrollen wurden nicht stimuliert, sondern erhielten lediglich die Barbituratinjektion zum gleichen Zeitpunkt, also eine Woche nach der Implantation der Elektroden.

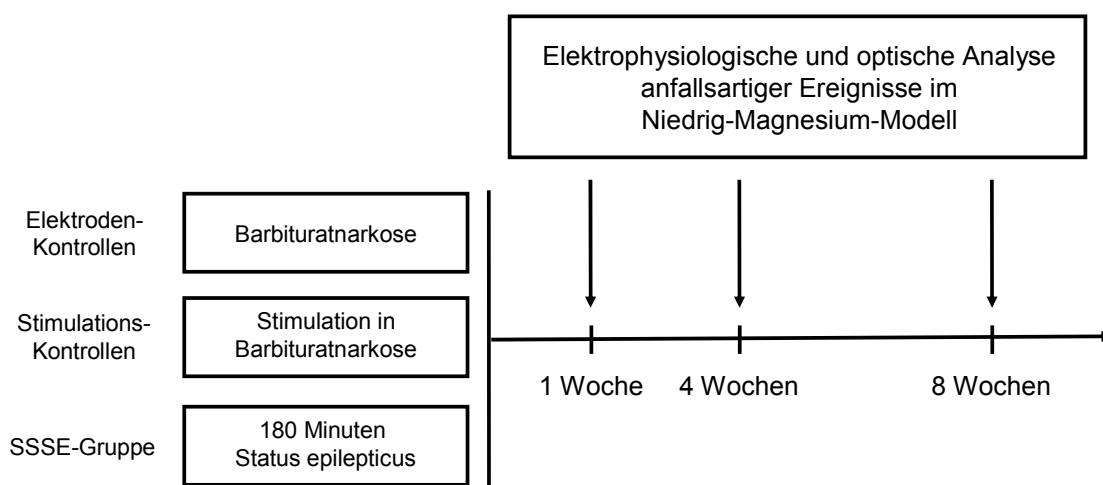


Abb. 2

Übersicht über die verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf der Studie. Den Ausgangspunkt der Zeitachse bildet je nach Gruppe die Barbituratinjektion (Elektroden-Kontrollen), die Stimulation unter Barbituratnarkose (Stimulations-Kontrollen) oder die Induktion eines über drei Stunden selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE-Gruppe). Nach einer Woche, vier Wochen und acht Wochen wurde jeweils eine vergleichbare Anzahl von Tieren aus jeder Gruppe den elektrophysiologischen und optischen Messungen im Niedrig- Mg^{2+} -Modell zugeführt.

3.4 Präparation und Anfertigung der Hirnschnitte

Die *in vitro*-Experimente wurden eine Woche, vier Wochen oder acht Wochen nach Status epilepticus, Stimulation unter Barbituratnarkose oder Barbituratinjektion durchgeführt (siehe Abbildung 2). Zur Anfertigung der *in vitro*-Präparate wurden die Versuchstiere in tiefe Äthernarkose versetzt. Erst als keine Reaktion mehr auf Schmerzreize erfolgte, wurden die Tiere dekapitiert. Anschließend wurde der Elektrodensockel mit Hilfe einer Knochensplitterzange vom Schädeldach gelöst und gleichzeitig die Elektroden atraumatisch aus dem Hirngewebe entfernt. Mit einem Skalpell wurde nun die verbliebene Kopfhaut entlang der Mittellinie von rostral nach occipital durchtrennt, um freien Zugang zum Schädelknochen zu bekommen. Die temporale Kaumuskulatur wurde ebenfalls mit einem Skalpell beidseits abgelöst. Mit Hilfe eines Knochenschabers wurde die Schädeloberfläche gesäubert. Durch Einschnitte im Bereich des Foramen magnum mit einer Knochensplitterzange wurde die Occipitalschuppe mobilisiert und entfernt.

Von diesem Zeitpunkt an wurde das Gehirn kontinuierlich mit eisgekühlter und oxygenierter (Carbogen 95 % O₂, 5 % CO₂) Nährlösung (siehe 3.6) beträufelt. Nach Eröffnung der Sagittalnaht wurden die Parietalschuppen vorsichtig getrennt und zur Seite weggeklappt. Mit einer Feinschere wurde die Dura mater eröffnet und mittels einer gebogenen Präzisionspinzette behutsam entfernt. Die Frontalpole wurden mit einem spitzen Skalpell in Projektion auf die Koronarnaht abgesetzt. Der verbliebene Hirnanteil wurde mit Hilfe eines gebogenen Spatels vorsichtig aus der Schädelgrube herausgelöst und die Hirnnerven und Gefäße der Hirnbasis mit einer feinen Schere durchtrennt. Schließlich wurde das Gehirn mit der Hirnbasis nach unten auf einer gekühlten Porzellanplatte abgelegt.

Mit einer gekühlten Rasierklinge wurden das Kleinhirn abgesetzt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt, die anschließend vorsichtig auf die Mantelkante gedreht wurden. Parallel zur Hippocampusformation wurde nun durch einen Transversalschnitt jeweils der hochparietale Anteil der Hemisphäre abgetrennt. Die hierdurch entstandene Fläche wurde genutzt, um die Gehirnhälften auf der zuvor mit Klebstoff (Cyanacrylat, UHU GmbH & Co. Kg; Bühl, BRD) präparierten Plattform in der Schneidekammer nebeneinander zu fixieren.

Die Kammer wurde unverzüglich mit eisgekühlter Nährlösung aufgefüllt, bis beide

Hemisphären einschließlich der nun nach oben ausgerichteten Hirnbasis bedeckt waren. Über einen Plastikslauch erfolgte während des gesamten Schneidevorgangs die Oxygenierung des Nährmediums mit Carbogen. Mit Mikropinzette und Mikroschere wurde dann die Pia mater vorsichtig mobilisiert und vom Cortex abgelöst.

Zunächst wurde mit einem Vibratom (Vibroslice 752 M, Campden Instruments; Sileby, UK) bei horizontaler Schnittführung eine Gewebeschicht von 2500 µm ausgehend von der Hirnbasis abgetragen. Es folgte die Anfertigung von Hirnschnitten mit einer Schichtdicke von jeweils 400 µm, die einzeln mit Hilfe eines feinen Pinsels und eines kleinen Löffels vorsichtig aus der Schneidekammer gehoben und in die Interfacemesskammer (siehe 3.5) transferiert wurden. Dort wurden sie jeweils auf einem mit einer 0.4 µm dicken transparenten Membran (Milicell-CM, Milipore; Bedford, UK) beklebten Platinrahmen abgelegt. Mit dieser Methode wurden pro Hemisphäre zwei bis drei Hirnschnitte gewonnen.

3.5 Perfusionskammern

Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Interfacebedingungen. Hierbei werden die Schnitte in den Perfusionskammern an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase des Nährmediums plaziert.

Die beiden Perfusionskammern (Aufbewahrungs- und Messkammer) wurden durch Vertiefungen im Deckel eines breiten Plexiglaszylinders gebildet. Der Zylinder war unterhalb der Perfusionskammern bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt, welches durch eine Heizspirale unter Kontrolle eines Temperaturfühlers konstant auf eine Temperatur von $35 \pm 0,5$ °C reguliert wurde. In das destillierte Wasser erfolgte eine kontinuierliche Carbogeneinleitung. Das hierdurch angewärmte und zu 100 % wasserdampfgesättigte Gas stieg innerhalb des Zylinders auf, erreichte die Perfusionskammern durch seitliche Belüftungsschlitze und bildete hier die gasförmige Phase.

Die flüssige Phase wurde durch Einleitung einer in einem externen Wasserbad vorgewärmten und oxygenierten Nährlösung in die beiden Kammern mit Hilfe einer Umwälzpumpe (Fließgeschwindigkeit von 1,5 – 2 ml/min) gebildet. Die Ver-

sorgung der Messkammer erfolgte dabei über ein separates Schlauchsystem. So konnten beide Kammern mit unterschiedlichen Nährlösungen versorgt werden. Vor Eintritt in die Kammern wurden die entsprechenden Zulaufschläuche zusätzlich im destillierten Wasser des Plexiglaszylinders erwärmt. Nach Durchlaufen der Kammern wurde die Nährlösung jeweils am gegenüberliegenden Ende der Perfusionskammer abgeleitet und entsorgt. So wurde in beiden Perfusionskammern ein kontinuierlicher und gleichmäßiger Durchfluss der Perfusionslösung gesichert.

3.6 Perfusionslösungen

Die Hirnschnitte in den Perfusionskammern wurden kontinuierlich mit einer künstlichen Nährlösung versorgt, die in ihrer Zusammensetzung mit dem Liquor der Ratte weitestgehend übereinstimmt. Für die Herstellung wurden die verschiedenen Inhaltsstoffe in folgenden Konzentrationen zusammengefügt (Angaben in mM): NaCl 124,0; KCl 3,0; MgSO₂; CaCl₂ 2,0; NaH₂PO₄ 1,25; NaHCO₃ 26,0 und Glucose 10,0 (alle Chemikalien von Merck; Darmstadt, BRD). Während der Mg²⁺-Auswaschphasen wurde der Nährlösung das MgSO₂ entzogen.

Osmolalität und pH-Wert der begasten Nährlösung lagen mit 300 ± 10 mosmol/kg bzw. 7,4 ± 0,5 im physiologischen Bereich. Der pH-Wert wurde hierbei mit einem pH-Meter (pH-Meter 761 Calimatic, Knick; Berlin, BRD), die Osmolalität mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Gonotec; Berlin, BRD) bestimmt.

3.7 Elektroden

3.7.1 Ionenselektive Mikroelektroden

Um Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^+]_o$ (o = outside) im Hirnschnittpräparat registrieren zu können, wurden ionenselektive Mikroelektroden eingesetzt. Diese wurden dem von Lux, Neher und Heinemann beschriebenen Verfahren entsprechend hergestellt (Heinemann et al., 1977; Lux, 1974; Lux und Neher, 1973). Hierbei kamen Kapillaren aus doppellumigem Borosilikatglas (Thetaglas) zum Einsatz. Nach gründlicher Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (Mischverhältnis 3:1) und anschließender Spülung mit destilliertem Wasser, wurden die Kapillaren mit hochgereinigter Pressluft ge-

trocknet. Mit einem Elektrodenziehgerät (vertikaler Chicago-Puller, Eigenbau der technischen Abteilung des Instituts) wurden die Kapillaren anschließend ausgezogen und mit einem Glasstab bis auf einen Spitzendurchmesser von 2 – 3 µm zurückgebrochen. Der später als Referenzseite fungierende Kapillarschenkel wurde mit 150 mM NaCl-Lösung gefüllt, in welche ein chlorierter Silberdraht eingelegt wurde.

Die ionensensitive Seite wurde zunächst mit einer Salzlösung des zu messenden Ions, in diesem Fall also mit 100 mM KCl-Lösung gefüllt. Vor dem Einbringen des Ionenaustauschers in die Elektrodenspitze, wurde diese mit einer Lösung von 5 % Trimethyl-1-Chlorsilan (FLUKA; Buchs, Schweiz) in 95 % CCl₄ lipophilisiert. Hierbei wurde die Lösung mit Hilfe einer Einwegspritze und eines in das entsprechende Kapillarlumen eingebrachten Teflonschlauches abwechselnd in die Elektrodenspitze aufgezogen und anschließend herausgepresst. In gleicher Weise wurde die Spitze daraufhin mit dem K⁺-selektiven Ionenaustauscher (K⁺-Ionophore I Cocktail A 60031, FLUKA; Buchs, Schweiz) gefüllt, der in der Elektrodenspitze verblieb. Nun wurde über das Elektrodenende ebenfalls ein chlorierter Silberdraht in die KCl-Lösung eingetaucht. Um die beiden Silberdrähte zu fixieren, wurde das Elektrodenende mit heißem Dentalwachs verschlossen.

Die auf diese Weise hergestellten Mikroelektroden ermöglichen die Umsetzung von Ionenkonzentrationsänderungen in elektrische Potenzialänderungen. In dem eingesetzten Ionenaustauscher sind K⁺-spezifische Carriermoleküle gelöst. Diese ermöglichen den selektiven Ionentransport zwischen Extrazellulärraum (EZR) und Kaliumchlorid-Lösung, entlang eines Konzentrationsgefälles für das Mession zwischen den beiden Elektrolytlösungen. Die mit dieser Ionenverschiebung einhergehende Ladungsverschiebung resultiert in einem Nettostrom. Dieser Strom fließt so lange, bis ein Gleichgewicht zwischen Diffusionskräften und einem sich entgegengesetzt aufbauenden Potenzial erreicht ist. In diesem Gleichgewichtszustand lässt sich [K⁺]_o entsprechend der modifizierten Nernst-Gleichung:

$$[K^+]_o = [K^+]_{\text{Badlösung}} \times \log_{10} ((E_o/S) - 1)$$

ermitteln, wobei E₀ der gemessenen extrazellulären Potenzialänderung und S der Anstiegssteilheit der Mikroelektrode in Bezug auf definierte Kalibrierungslösungen entspricht (beide Angaben in mV).

3.7.2 Bipolare Reizelektroden

Für die Herstellung der Reizelektroden wurden ebenfalls doppelumige Thetglas-Kapillaren verwendet, die mittels des Elektrodenziehgerätes ausgezogen und auf einen Spitzendurchmesser von über 100 µm zurückgebrochen wurden. Zwei Silberdrähte wurden mit je einem Platin–Iridium-Draht (Goodfellow; Cambridge, UK) verlötet und so in die Lumina eingeführt, dass die Platindrähte im Abstand von maximal 100 µm aus der Elektrodenspitze herausragten. Diese wurden anschließend an der Spitze der Glaskapillare mit Schellack fixiert und mittels einer feinen Schere auf eine Länge von etwa 2 mm zurückgeschnitten. Am anderen Elektrodenende wurden die herausragenden Silberdrähte mit Dentalwachs fixiert.

3.8 Elektrophysiologische Messungen

3.8.1 Viabilitätsprüfung der Präparate

Nach dem Transfer wurden die Schnitte für mindestens 60 min zur Äquilibration in der Mess- bzw. Aufbewahrungskammer belassen. Mit Hilfe von am Labor-tisch magnetisch fixierten Mikromanipulatoren wurde die bipolare Reizelektrode im Bereich des Tractus perforans sowie eine Ableitelektrode in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus platziert. Um die Viabilität des Hirngewebes zu überprüfen, erfolgte nun die Stimulation des Tractus perforans und die Ableitung des im Gyrus dentatus induzierten Feldpotenzials. Die applizierten Stimuli wurden durch einen Stimulusisolator generiert, welcher über ein programmierbares Reizgerät (Master-8; A.M.P.I.; Jerusalem, Israel) angesteuert wurde. Die Darstellung der abgeleiteten Feldpotenzialantwort erfolgte nach Verstärkung des Signals (Differenzverstärker, Zwischenverstärker, Eigenbau des Instituts) auf einem Speicheroszilloskop (HM305; HAMEG, Frankfurt a. M., BRD). Die Umwandlung des Signals mittels eines Digitalwandlers (Digidata 1200B; Axon Instruments; Foster City, USA) ermöglichte die Speicherung der Daten unter Verwendung einer speziellen Computersoftware (pClamp 6.0.3; Axon Instruments; Foster City, USA). Die Stimuli wurden mit einer Reizstärke von 2 bis maximal 20 V appliziert, gegebenenfalls wurde die Position der Elektroden in Abhängigkeit von der Stimulationsantwort nochmals korrigiert. Ein Schnitt wurde nur dann weiter untersucht, wenn dabei ein Summenaktionspotenzial mit einer Amplitude von mindestens 2 mV registriert wurde, das

bei Gabe von sechs Einzelstimuli im Abstand von je 30 Sekunden stabil blieb.

3.8.2 Kontinuierliche Ableitungen

Nach Abschluss der Viabilitätsprüfung wurde zunächst die Reizelektrode aus der Messkammer entfernt. Die Mikroelektrode wurde aus der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus in die tiefen Schichten des medialen entorhinalen Cortex umgesetzt. Diese Schichten wurden gewählt, weil bekannt ist, dass Amplitude und Dauer anfallsartiger Ereignisse im Niedrig-Mg²⁺-Modell in den Schichten IV/V dieser Region am größten sind (Jones und Heinemann, 1988). Eine zweite ionenselektive Mikroelektrode wurde in vergleichbarer Schichttiefe im temporalen Cortex platziert. Beide Elektrodenspitzen wurden dabei mit Hilfe der Manipulatoren etwa 100 µm in das Hirngewebe abgesenkt. Während bei der Viabilitätsprüfung nur Änderungen des Feldpotenzials aufgezeichnet wurden, erfolgte nun auch die Aufzeichnung der Änderung der $[K^+]_o$. Dies wurde durch den Einsatz des Differenzverstärkers möglich, der das gemessene Feldpotenzial von der Potenzialänderung des ionenselektiven Kanals subtrahierte und so den Anteil an der Potenzialänderung isolierte, der durch Kaliumverschiebungen verursacht wurde. Für die Aufzeichnung der Daten wurde neben der speziellen Computersoftware zusätzlich ein Mehrkanalthermoschreiber (DASH IVxl, Astro-Med; West Warwick, USA) eingesetzt.

Mit Hilfe der beschriebenen extrazellulären Messungen von Feldpotenzial und $[K^+]_o$ wurden die anfallsartigen Ereignisse während der Auswaschphase identifiziert. Hirnschnitte, die 90 min nach Beginn des Magnesium-Entzuges keinerlei epileptische Aktivität zeigten, wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Anfallsartige Ereignisse wurden nur dann weiter ausgewertet, wenn sie die folgenden elektrographischen Kriterien erfüllten: 1) Feldpotenzialabfall von mindestens 1 mV für die Mindestdauer von 10 s, 2) Überlagerung des Potenzialabfalls durch schnelle Aktionspotenziale, 3) zeitgleicher Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration.

3.9 Messung intrinsischer optischer Signale

Als intrinsisches optisches Signal (IOS) bezeichnet man die aktivitätsabhängige Änderung der optischen Eigenschaften des Hirngewebes. Im Gegensatz zur Messung extrinsischer optischer Signale kann bei dieser Methode auf den Einsatz von Farbstoffen oder anderen Substanzen verzichtet werden. Das nicht-invasive Messverfahren ermöglicht es, Ursprung und Ausbreitungsmuster epileptischer Aktivität simultan im gesamten Präparat zu detektieren und zu analysieren. Bei der Analyse epileptischer Aktivität im Hirnschnitt wurde gezeigt, dass die Änderung des IOS unmittelbar nach der elektrophysiologischen Signaländerung auftritt (Weissinger et al., 2000; Meierkord et al., 1997).

Als Kaltlichtquelle für die optischen Messungen diente eine stabilisierte und spannungsregulierte Halogenlampe (KL 1500 electronic; Scott, Wiesbaden, BRD). Das Licht wurde ungefiltert über Glasfasern bis zum Boden der Messkammer geleitet. So konnte der Hirnschnitt von unten durch den Plexiglasboden der Messkammer und die transparente Membran hindurch beleuchtet werden. Vor Beginn des Experiments wurde die Position des Hirnschnittes in der Messkammer so optimiert, dass sämtliche Regionen gleichmässig beleuchtet wurden. Dies geschah unter optischer Kontrolle über ein binokulares Mikroskop (MS 5, Leica; Bensheim, BRD), das über der Messkammer installiert war. Der eingestellte Bildausschnitt wurde über einen zusätzlichen Phototubus mit einer 8 Bit-CCD-Videokamera (VC 1910, Sanyo; Osaka, Japan) gefilmt und auf einem Videomonitor angezeigt. Die Bildsequenzen wurden während des Experiments mit einem S-VHS-Videorekorder (AG-6720A, Panasonic; Osaka, Japan) zur späteren Auswertung auf Videoband aufgenommen oder zum Teil zeitgleich auf dem ebenfalls angeschlossenen Computer mitgeschnitten. Dabei wurde das analoge Videosignal bei einem Bildintervall von etwa 220 ms mit einer Video-Digitalisierungskarte (Video-Grabber Karte PCI Grabber 4+, Phytex GmbH; Mainz, BRD) für den Computer digitalisiert. Dies geschah unter Anwendung eines speziell für optische Messungen dieser Art entwickelten Computerprogrammes. Diese Spezialsoftware wurde dabei nicht nur zur Datenerfassung, sondern später auch zur Analyse sämtlicher optischer Parameter genutzt. Jedes so erstellte Bild bestand aus 240 Reihen mit je 320 Bildpunkten (Pixel). Der Lichtintensität im Originalbild entsprechend wurde jedem dieser Bildpunkte eine von 256 Graustufen zugeteilt. Aufgrund der erheblichen Datenmenge,

die bei einer kontinuierlichen digitalen Aufzeichnung der Bilder anfallen würde, wurde die Digitalisierung erst jeweils dann gestartet, wenn ein anfallsartiges Ereignis elektrographisch identifiziert war. Um trotzdem die vollständige optische Erfassung des AEs zu garantieren, speicherte und löschte die Spezialsoftware in einer Endlosschleife durchgehend eine Folge von bis maximal 100 Bildern. Bei der Mehrzahl der aufgezeichneten Ereignisse wurde eine Endlosschleife aus 80 Bildern gewählt. Beim Aufnahmestart des eigentlichen AEs wurde diese Schleife automatisch gestoppt, und die so gesicherte Filmsequenz vor die mitgeschnittene Sequenz angefügt. So wurde für jedes AE eine Vorlaufzeit von etwa 15 Sekunden vor Aktivitätsbeginn sichergestellt. Bei jedem so erfassten AE konnte nun die Änderung des intrinsischen optischen Signals durch das Erstellen von Differenzbildern analysiert werden. Dafür wurde das erste Bild einer Filmsequenz von jedem der darauffolgenden Bildern subtrahiert. Die Berechnung der Differenzbilder ermöglichte die Demarkierung der Bereiche des Hirnschnittes, die im zeitlichen Verlauf eine Änderung der Lichtdurchlässigkeit aufwiesen. Dieses Phänomen konnte durch eine Fehlfarbencodierung zusätzlich verdeutlicht werden, wobei jedem Grauwert ein Farbwert zugeordnet wurde.

3.10 Datenerfassung und –analyse

Um einen möglichen Einfluss der Hemisphärenseite auf die verschiedenen Parameter beurteilen zu können, wurden die Daten für jede Seite gesondert erfasst und innerhalb jeder Untergruppe miteinander verglichen. Dies geschah sowohl mit den elektrographisch als auch mit den optisch erhobenen Daten.

3.10.1 Elektrophysiologische Daten

Zur Auswertung der Latenz vom Beginn der Auswaschphase bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität und der Frequenz der anfallsartigen Ereignisse wurden die Aufzeichnungen des Mehrkanalthermoschreibers herangezogen. Mit Hilfe der Computersoftware pClamp 6.0.3 erfolgte die Bestimmung der elektrographischen Dauer der einzelnen AEs sowie der Amplitudengröße von Feldpotenzial und extrazellulärer Kaliumkonzentration.

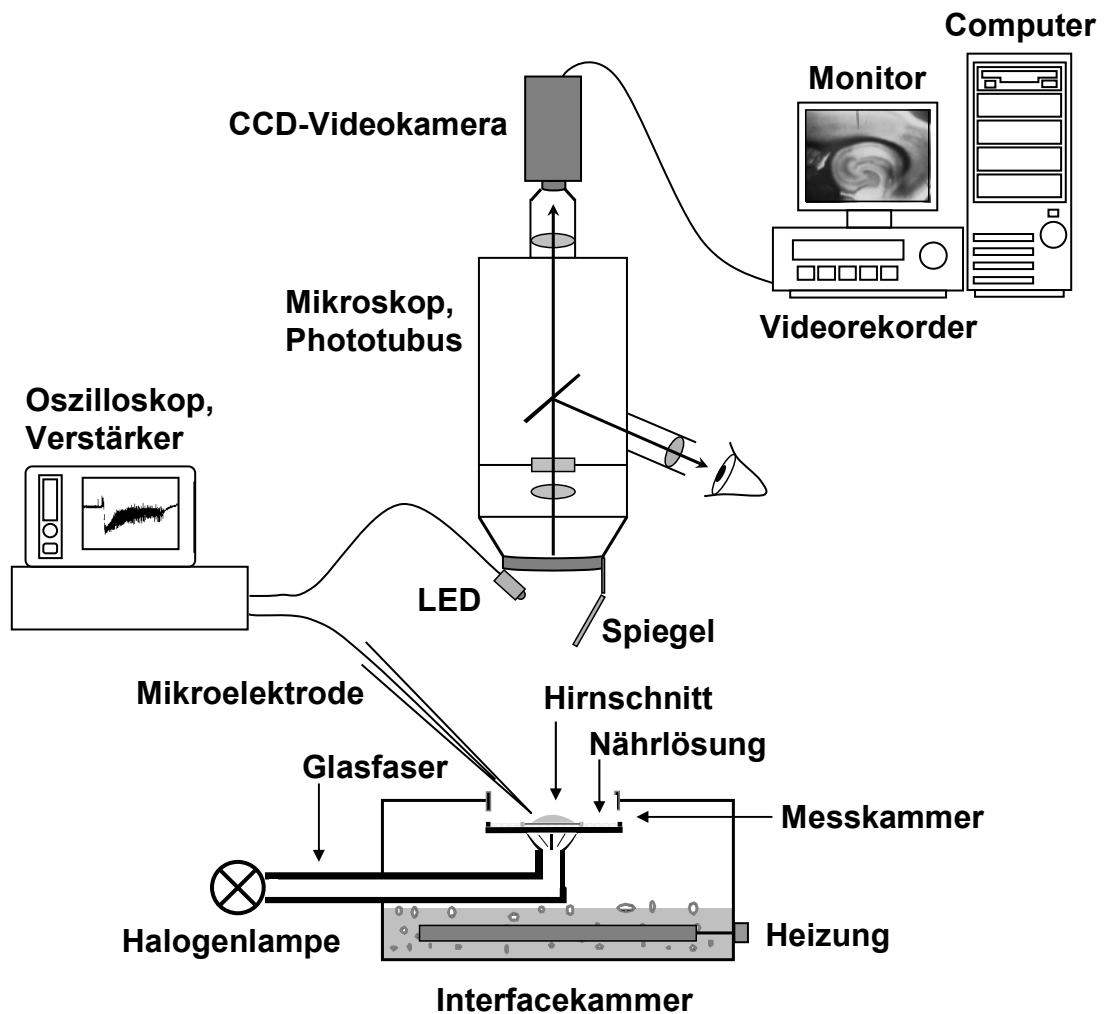


Abb. 3

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der Hirnschnitt befand sich in einer Interfacekammer. Er wurde kontinuierlich von einer angewärmten und oxygenierten Nährlösung umspült. Als Untergrund diente eine transparente, semipermeable Membran. Die electrophysiologischen Messungen erfolgten mit Hilfe von ionenselektiven Elektroden, deren Signal über einen Zwischen- und Differenzverstärker modifiziert und auf dem Oszilloskop dargestellt wurde. Für die optischen Messungen wurde das Licht einer Halogenlampe über eine Glasfaser zum Boden der Messkammer geleitet und der Hirnschnitt so von unten durchleuchtet. Über der Messkammer befand sich ein mit einem Phototubus kombiniertes Mikroskop, das mit einer CCD-Kamera verbunden war. So wurde das Präparat während der Experimente gefilmt. Die entstandenen Bilder wurden mittels eines Videorekorders auf Videoband aufgenommen und auf der Festplatte eines Computers weiterverarbeitet und gespeichert. Durch die Erstellung von Differenzbildern wurden die Transmissionsänderungen des Gewebes so als fehlfarbencodierte Filmsequenzen oder als Transmissionskurven registriert. Eine Änderung des Feldpotenzials führte zum Aufleuchten der Leuchtdiode (*light-emitting diode*, LED), die mit dem Zwischenverstärker verbunden und am Mikroskop befestigt war. Über einen Spiegel wurde das Licht außerhalb der relevanten anatomischen Regionen auf den Hirnschnitt gelenkt. Dies ermöglichte eine zusätzliche Kontrolle der zeitlichen Korrelation von electrophysiologischem und optischem Signal.

3.10.2 Optische Daten

Die Auswertung der optischen Daten erfolgt ebenso wie die Datenerfassung mit Hilfe des speziellen Bildverarbeitungsprogramms.

3.10.2.1 *Transmissionsänderung*

Zunächst wurde die Änderung der Lichtdurchlässigkeit des Gewebes in den verschiedenen Regionen berechnet. Dafür wurden nach Sichtung der fehlfarben-codierten Bildsequenz die Bereiche innerhalb jeder Region identifiziert, in denen im Verlauf der Sequenz die maximale Änderung des Farbwertes stattgefunden hat. Zur Quantifizierung dieser Veränderung wurden definierte Messfelder (100 Bildpunkte entsprechend $0,03 \text{ mm}^2$) an den entsprechenden Punkten über alle Regionen des Hirnschnittes verteilt. Für jedes dieser Areale wurde die Änderung der mittleren digitalen Intensität (ΔT) im Vergleich zum Kontrollbild als Integral über die gesamte Fläche der entsprechenden Messfelder im Zeitverlauf der Bildsequenz berechnet und als ASCII-Datei gespeichert. Die Differenz der Intensität des Signals wurde stets als prozentualer Anteil vom Ausgangswert der Lichtdurchlässigkeit T im entsprechenden Feld des Kontrollbildes angegeben, also als $\Delta T/T$ in %. Die maximale Transmissionsänderung lag bei sämtlichen Experimenten im Bereich von 0,4 % bis 5,12 %, während das optische Rauschen im Durchschnitt weniger als 0,1 % betrug. Damit lag das Signal-Rausch-Verhältnis zwischen 4 und 51,2. Aus den so gesammelten Daten wurde für jedes AE die maximale Transmissionsänderung in allen an der Aktivität beteiligten Regionen ermittelt.

3.10.2.2 *Lokalisation und Größe der Ursprungsorte*

Als weiterer optischer Parameter wurde der Entstehungsort der anfallsartigen Ereignisse untersucht. Der Aktivitätsbeginn wurde dabei optisch ab einer Transmissionsänderung von etwa 0,3 % wahrgenommen. Lag der Ursprung in unmittelbarer Nähe der im entorhinalen Cortex platzierten Elektrode, konnte der zeitliche Beginn des AEs zusätzlich anhand des von der Leuchtdiode (siehe Abbildung 3) produzierten Lichtpunktes im Videobild abgesichert werden. So wurde zunächst die anatomische Region identifiziert, in der die erste Transmissionsänderung stattfand. Neben der topographischen Einordnung erfolgte die Beurteilung der räumli-

chen Ausdehnung des initial aktivierten Bereiches.

3.10.2.3 Ausbreitungsmuster und -grad

Die aus Differenzbildern zusammengesetzte Filmsequenz ermöglichte es, das zeitliche und räumliche Ausbreitungsverhalten der Aktivität zu beurteilen. Die zeitliche Auflösung ergab sich hierbei aus dem kleinstmöglichen Bildintervall der CCD-Kamera von 220 ms. Die räumliche Auflösung als kleinste abgrenzbare Propagationsstrecke lag bei etwa 200 μm . So konnte anhand der durch die Bildverarbeitung visualisierten Aktivitätsfront rekonstruiert werden, auf welchem Weg sich die epileptische Aktivität ausgehend vom Ursprungsort auf weitere anatomische Regionen ausgebreitet hat. Außerdem konnte für jedes analysierte AE der Ausbreitungsgrad als Anzahl der im Verlauf des Ereignisses aktivierten anatomischen Regionen bestimmt werden.

3.10.3 Statistik und Datenpräsentation

Für sämtliche elektrographisch erhobenen Daten einer Gruppe wurde jeweils das arithmetische Mittel berechnet und zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Bei den optischen Messgrößen wurde dieses Verfahren nur für die Änderung der Lichtdurchlässigkeit angewendet. Für die Parameter „Ursprungsregion“, „wechselnde Ursprungsregion“, „fokaler und großflächiger Ursprung“, „Ausbreitungsmuster“, „Ausbreitungsgrad“ sowie „autonomer Schrittmacher im DG“ wurde jeweils die prozentuelle Verteilung innerhalb der Gruppe berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den Daten wurde durch den ANOVA (LSD/Bonferroni/Scheffé/Tukey) Test für Varianzanalysen mit dem Statistikprogramm WinSTAT 3.0 (Kalmia Co.; Cambridge MA, USA) ermittelt. Für jede Gruppe wurden hierbei mindestens 64 anfallsartige Ereignisse bzw. sieben Hirnschnitte von drei verschiedenen Tieren herangezogen. Als signifikant wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen ab einem Level von $p < 0,05$, als hochsignifikant ab einem Level von $p < 0,001$ bezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird auf die Dokumentation der Zahlenwerte nichtsignifikanter (ns) p-Werte verzichtet. Die Bilder und Grafiken wurden überwiegend mit der PC-Software MS PowerPoint 2002 (Microsoft Corporation; Redmond, USA) erstellt.

4 ERGEBNISSE

Insgesamt konnte in 77 Präparaten von 41 Tieren epileptische Aktivität durch Entzug der Magnesium-Ionen induziert werden. Von den dabei aufgezeichneten AEs erfüllten 1017 die Kriterien für die weitere Analyse. Die Aufteilung dieser n-Zahlen auf die verschiedenen Gruppen und Untersuchungszeitpunkte wird in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die elektrophysiologischen und optischen Daten wurden zunächst für die rechte und linke Hemisphäre getrennt analysiert. Wenn sich beim Vergleich der Werte keine signifikanten Unterschiede ergaben, wurden die Ergebnisse für beide Hemisphären zusammen berechnet und dargestellt.

Tab. 1

Übersicht über die Anzahl der untersuchten Tiere, der gewonnenen Hirnschnitte und der verwertbaren anfallsartigen Ereignisse.

	Elektroden-Kontrollen			Stimulations-Kontrollen			SSSE-Gruppe		
	1 Wo	4 Wo	8 Wo	1 Wo	4 Wo	8 Wo	1 Wo	4 Wo	8 Wo
Tiere	5	7	5	4	4	3	5	4	4
Schnitte	9	9	9	7	7	10	7	9	10
AEs	100	105	134	111	64	91	113	132	167

Wo = Woche; AE = anfallsartiges Ereignis

4.1 Elektrophysiologische Messgrößen

4.1.1 Latenz und Frequenz epileptischer Aktivität

Die Zeit vom Beginn der Auswaschphase bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität lag bei den neun einbezogenen Hirnschnitten der Elektroden-Kontrollen eine Woche nach Barbituratinjektion bei $31,3 \pm 13,4$ min, die Frequenz (f) der AEs lag bei $0,34 \pm 0,18$ min⁻¹. Die neun Schnittpräparate der nach vier Wochen untersuchten Tiere entwickelten nach $43,4 \pm 21,6$ min ($f = 0,30 \pm 0,12$ min⁻¹) und die

neun Hirnschnitte der Acht-Wochen-Gruppe nach $38,6 \pm 15,3$ min ($f = 0,28 \pm 0,13 \text{ min}^{-1}$) Spontanaktivität.

Bei den sieben Präparaten, die eine Woche nach Stimulation unter Barbituratnarkose analysiert wurden, dauerte es $29,8 \pm 11,5$ min ($f = 0,30 \pm 0,13 \text{ min}^{-1}$), bei den sieben Hirnschnitten der entsprechenden Vier-Wochen-Gruppe $44 \pm 25,2$ min ($f = 0,28 \pm 0,16 \text{ min}^{-1}$) bis zum Aktivitätsbeginn. In der zugehörigen Acht-Wochen-Gruppe lag die Latenz der zehn Hirnschnitte bei $36,5 \pm 20,8$ min ($f = 0,39 \pm 0,23 \text{ min}^{-1}$). Zu allen drei Zeitpunkten waren die Werte der beiden Kontrollgruppen also gut vergleichbar und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die sieben Schnitte der eine Woche nach Status epilepticus untersuchten Tiere zeigten eine zu den entsprechenden Kontrollen vergleichbare Latenz von $29,5 \pm 8,5$ min und Frequenz von $0,39 \pm 0,15 \text{ min}^{-1}$. Bei den neun Schnitten der vier Wochen nach Status epilepticus untersuchten SSSE-Gruppe zeigte sich eine im Vergleich zu beiden Kontrollen jeweils signifikant ($p < 0,05$) kürzere Latenz von $18,4 \pm 7,7$ min bei einer jeweils signifikant ($p < 0,05$) höheren Frequenz von $0,46 \pm 0,13 \text{ min}^{-1}$. Für die neun Präparate der entsprechenden Acht-Wochen-Gruppe ergab sich für die mittlere Latenz ein zu beiden Kontrollen signifikant ($p < 0,05$) kleinerer Wert von $18,9 \pm 5,3$ min bei einer signifikant ($p < 0,05$) höheren Frequenz von $0,56 \pm 0,13 \text{ min}^{-1}$ gegenüber den Elektroden-Kontrollen. Die elektrophysiologischen Daten für Latenz und Frequenz der epileptischen Aktivität sind in Abbildung 4 als Histogramm dargestellt.

Im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus fand sich nach vier Wochen eine signifikante ($p < 0,05$) Verkürzung der Latenz im Vergleich zur Ein-Wochen-Gruppe (siehe Abbildung 5). Dieser Effekt hielt auch in der Acht-Wochen-Gruppe noch an ($p < 0,05$). Für die Frequenz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf.

4.1.2 Dauer der anfallsartigen Ereignisse

Die durchschnittliche Dauer der epileptischen Aktivität in temporalem und entorhinalem Cortex wurde jeweils durch die Berechnung des arithmetischen Mittels

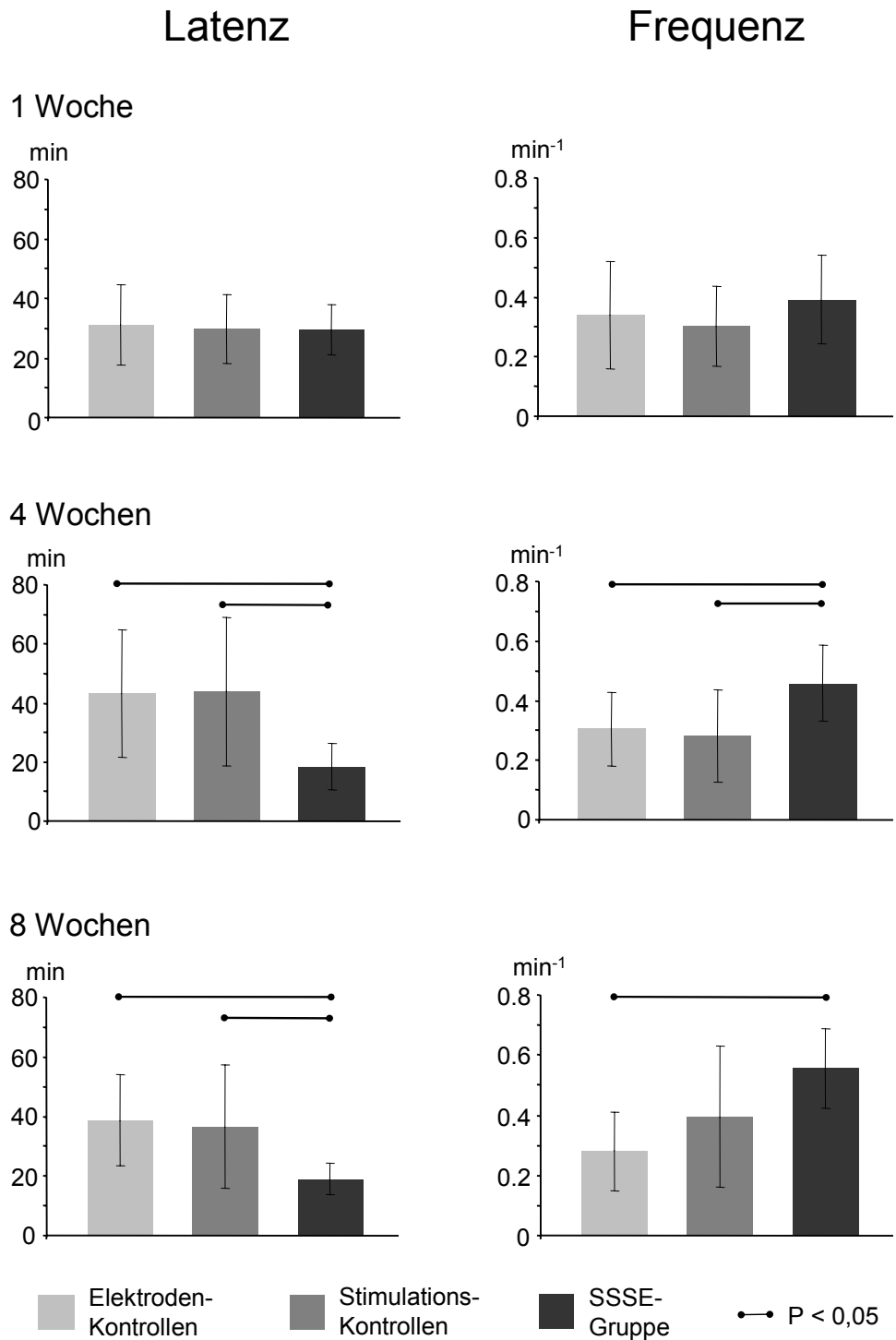


Abb. 4

Durchschnittliche Latenz vom Beginn der Auswaschphase bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität (linke Spalte) und Frequenz der anfallsartigen Ereignisse (rechte Spalte): In den Zeilen sind die entsprechenden Ergebnisse eines Untersuchungszeitpunktes zusammengefasst. Eine Woche nach SSSE ergaben sich vergleichbare Werte sowohl zu den Elektroden-Kontrollen, als auch zu den Stimulations-Kontrollen. Vier Wochen nach SSSE kam es zu einer signifikanten Verkürzung der Latenz im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Die signifikant kürzere Latenz im Vergleich zu den Elektroden-Kontrollen hielt auch acht Wochen nach SSSE noch an. Für die Frequenz ergab sich vier Wochen nach SSSE im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, acht Wochen nach SSSE im Vergleich zu den Elektroden-Kontrollen ein signifikant höherer Wert (jeweils $p < 0,05$).

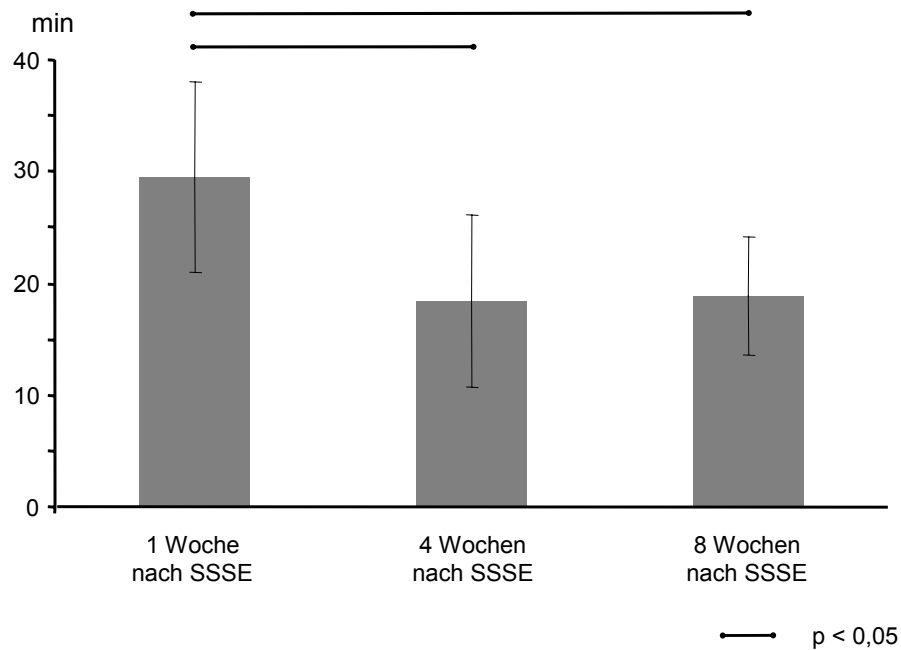


Abb. 5

Durchschnittliche Latenz bis zum Aktivitätsbeginn im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus: Im Intervall zwischen einer und vier Wochen nach SSSE kam es zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Verkürzung der Latenz bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell. Auch acht Wochen nach SSSE blieb dieser signifikante Unterschied bestehen.

der elektrographisch registrierten Dauer des Feldpotenzialabfalls bestimmt.

Es ergaben sich für die Elektroden-Kontrollen zu den drei Untersuchungszeitpunkten folgende Werte für die AE-Dauer: Eine Woche nach Barbituratinjektion: $30,5 \pm 12,8$ s im TE und $43,2 \pm 29,6$ s im EC; vier Wochen nach Barbituratinjektion: $30,4 \pm 14$ s im TE und $33,3 \pm 18,5$ s im EC; acht Wochen nach Barbituratinjektion: $39,9 \pm 12$ s im TE und $40,9 \pm 10,2$ s im EC.

Für die AEs der Stimulation-Kontrollen ergaben sich in den Untergruppen folgende Werte: Eine Woche nach Stimulation: $27,5 \pm 7,7$ s im TE und $33,6 \pm 8,4$ s im EC; vier Wochen nach Stimulation: $35,7 \pm 9,9$ s im TE und $35,7 \pm 14,8$ s im EC, acht Wochen nach Stimulation: $36 \pm 22,1$ s im TE und $27,9 \pm 14,9$ s im EC. Zwischen den beiden Kontrollgruppen ergaben sich somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AE-Dauer.

In der SSSE-Gruppe wurden die folgenden Werte gemessen: Eine Woche nach Status epilepticus: $40,11 \pm 15,12$ s im TE und $29 \pm 12,6$ s im EC; vier Wochen nach Status epilepticus: $27,6 \pm 7,1$ s im TE und $29,9 \pm 6,4$ s im EC; acht Wochen

nach Status epilepticus: $23,3 \pm 3,5$ s im TE. Mit $20,6 \pm 8,8$ s im EC fand sich acht Wochen nach SSSE eine im Vergleich zu den Elektroden-Kontrollen signifikant ($p < 0,05$) kürzere Aktivitätsdauer in dieser Region.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich acht Wochen nach Status epilepticus eine signifikante ($p < 0,05$) Verkürzung der Aktivitätsdauer im TE im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt. Im EC wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (siehe Abbildung 6).

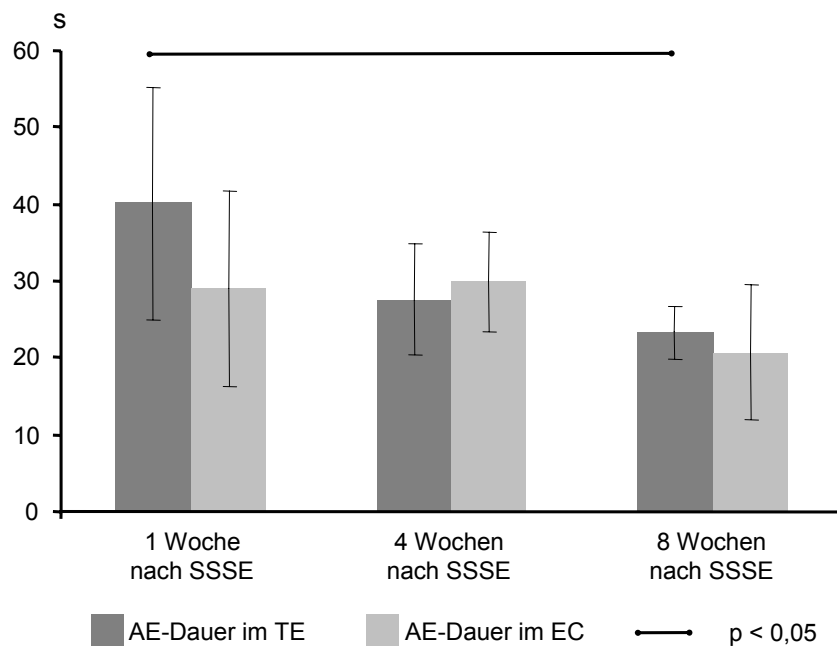


Abb. 6

AE-Dauer im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus: Die mittlere Aktivitätsdauer der AEs im EC verkürzte sich mit zunehmendem Abstand vom SSSE. Nach acht Wochen bestand ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied im Vergleich zur AE-Dauer eine Woche nach SSSE.

4.1.3 Feldpotenzial und extrazelluläre K^+ -Konzentration

Für alle in die Untersuchung einbezogenen AEs wurde die maximale Änderung von Feldpotenzial (ΔF_p) und extrazellulärer Kaliumkonzentration ($\Delta [K^+]_o$) in temporalem Cortex (TE) und entorhinalem Cortex (EC) ermittelt und hieraus der Mittelwert bestimmt.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt ergaben sich für diese Parameter keine signifikanten Unterschiede. Vier Wochen nach Status epilepticus ergab sich für den

Feldpotenzialabfall mit $1,73 \pm 0,45$ mV ein im Vergleich zu Elektroden-Kontrollen ($2,9 \pm 0,81$ mV) und Stimulations-Kontrollen ($2,62 \pm 0,36$ mV) jeweils signifikant ($p < 0,05$) niedrigerer Wert. Acht Wochen nach Status epilepticus wurde mit $1,40 \pm 0,25$ mV ebenfalls eine signifikant ($p < 0,05$) kleinere Feldpotenzialamplitude registriert als in den Präparaten der entsprechenden Stimulations-Kontrollen ($2,27 \pm 0,71$ mV). Eine Zusammenfassung der Daten gibt die Tabelle 2.

Auch im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus sank der Wert für die Amplitude des Feldpotenzials in signifikantem Ausmaß: Während eine Woche nach Status epilepticus noch $2,3 \pm 0,29$ mV registriert wurden, war der Wert vier Wochen nach SSSE mit $1,73 \pm 0,45$ mV signifikant ($p < 0,05$) kleiner. Im weiteren Verlauf reduzierte sich der Abfall des Feldpotenzials in den Präparaten der SSSE-Gruppe weiter bis auf $1,40 \pm 0,25$ mV, die Differenz zum vorangegangenen Wert erreichte aber kein signifikantes Ausmaß (siehe Abbildung 7).

Tab. 2

Änderungen von Feldpotenzial (ΔFp) und extrazellulärer Kaliumkonzentration ($\Delta [K^+]_o$) in der SSSE-Gruppe und beiden Kontrollgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten. Für jedes AE wurde zunächst das arithmetische Mittel aus den für TE und EC ermittelten Werten gebildet und anschließend Mittelwert und Standardabweichung für jede Untergruppe bestimmt. ^asignifikant mit $p < 0,05$ vs. Elektroden-Kontrollen und Stimulations-Kontrollen; ^bsignifikant mit $p < 0,05$ vs. Stimulations-Kontrollen; ^csignifikant mit $p < 0,05$ vs. Elektroden-Kontrollen.

	ΔFp in mV			$\Delta [K^+]_o$ in mMol		
	Elektroden-Kontrollen	Stim.-Kontrollen	SSSE-Gruppe	Elektroden-Kontrollen	Stim.-Kontrollen	SSSE-Gruppe
1 Wo	2,07 $\pm 0,46$	2,5 $\pm 0,34$	2,3 $\pm 0,29$	11,15 $\pm 0,74$	12,27 $\pm 0,88$	11,91 $\pm 0,87$
4 Wo	2,9 $\pm 0,81$	2,62 $\pm 0,36$	^a 1,73 $\pm 0,45$	13,46 $\pm 2,95$	12,92 $\pm 1,35$	^c 10,28 $\pm 1,95$
8 Wo	2,11 $\pm 0,6$	2,27 $\pm 0,71$	^b 1,40 $\pm 0,25$	11,53 $\pm 1,67$	11,26 $\pm 2,13$	11,48 $\pm 1,8$

Wo = Woche; ΔFp = Abfall des Feldpotenzials; $\Delta [K^+]_o$ = Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration; Stim.-Kontrollen = Stimulations-Kontrollen

Zum ersten und letzten Untersuchungszeitpunkt bestanden bezüglich der Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der SSSE-Gruppe und beiden Kontrollgruppen. In der Vier-Wochen-Gruppe der Elektroden-Kontrollen ergab sich ein im Vergleich zur entsprechenden SSSE-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) höherer Wert. Beim Vergleich mit den anderen acht Untergruppen fällt auf, dass es sich hierbei um den höchsten Wert handelt. Im zeitlichen Verlauf kommt es also ausgerechnet in der Kontrollgruppe mit der geringsten initialen Manipulation zu einer vorübergehenden Zunahme der $[K^+]_o$ -Amplitude von 20 %. Da es für dieses Verhalten keine neurobiologische Erklärung gibt, wurde der hieraus resultierende signifikante Unterschied als Artefakt gewertet.

Tabelle 2 fasst die Mittelwerte und Standardabweichungen der für extrazelluläre Kaliumkonzentration und Abfall des Feldpotenzials erhobenen Daten im Überblick zusammen.

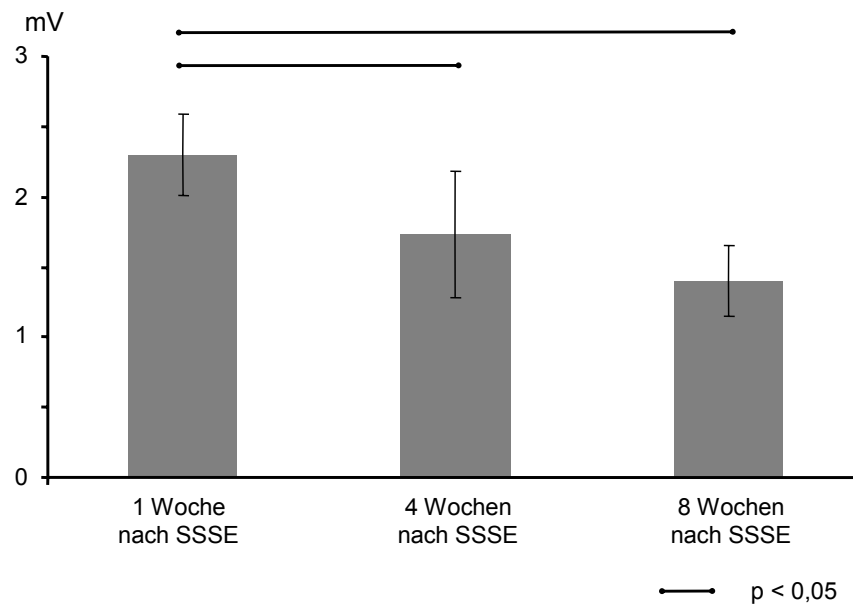


Abb. 7

Überblick über den gemessenen Abfall des Feldpotenzials im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus: Vier Wochen nach SSSE wurde ein signifikant kleinerer Abfall des Feldpotenzials registriert als in der zugehörigen Ein-Wochen-Gruppe. Im Zeitraum zwischen vier und acht Wochen nach SSSE kam es erneut zu einem Abfall des Wertes, der signifikante Unterschied im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt blieb bestehen.

4.2 Optische Messgrößen

4.2.1 Änderungen der Transmission

Bei sämtlichen untersuchten anfallsartigen Ereignissen ging die elektrographisch registrierte epileptische Aktivität mit einer Transmissionszunahme des Hirngewebes einher. Diese Zunahme konnte als entsprechende Änderung des intrinsischen optischen Signals erfasst werden. Für jede Gruppe wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten der Mittelwert der Transmissionsänderung in allen anatomischen Regionen des Hirnschnittes bestimmt.

Die höchste Transmissionszunahme fand sich in der Regel im entorhinalen Cortex. Die Elektroden-Kontrollen erreichten dabei eine Woche nach Barbituratinjektion mit einer Transmissionszunahme von $2,2 \pm 0,6$ % den höchsten Mittelwert für diesen Parameter. Neben dem Transmissionsmaximum im entorhinalen Cortex verhielten sich die Schnitte von SSSE-Gruppe und Kontrollgruppen sehr ähnlich bezüglich der Transmissionseigenschaften der verschiedenen anatomischen Regionen. Es wurden für keine Region und zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der SSSE-Gruppe und den Kontrollgruppen gefunden (Daten nicht dargestellt).

4.2.2 Ursprungsregionen

Für die Bestimmung des Ursprungsortes der epileptischen Aktivität eines AEs wurde die anatomische Region identifiziert, in der die erste Änderung der Lichtdurchlässigkeit registriert werden konnte. Bei einem Teil der Ereignisse wurde ein zeitgleicher Beginn der Aktivität in mehreren anatomischen Regionen beobachtet. Dieses Phänomen wurde als multiregionaler (MR) Ursprung bezeichnet. In den meisten Schnitten wurde die Mehrheit der AEs im entorhinalen Cortex generiert. Die CA1- und CA3-Region wurde in keiner Gruppe und zu keinem Zeitpunkt als Ursprungsregion epileptischer Aktivität identifiziert.

Für die Hirnschnitte der Elektroden-Kontrollen ergab sich bezüglich des Ursprungsortes folgende prozentuale Verteilung auf die anatomischen Regionen: Ein-Wochen-Gruppe: 80 % im EC, 17 % im SUB und 3 % MR; Vier-Wochen-Gruppe: 86,7 % im EC, 10,5 % im TE, 1,8 % im PER und 1,0 % MR; Acht-Wochen-Gruppe:

58,2 % im EC, 15,7 % MR, 13,4 % im TE, 11,2 % im SUB, und 1,5 % im PER. Die Stimulation in Barbituratnarkose führte zu folgender Verteilung der Ursprungsregionen: Ein-Wochen-Gruppe: 100 % im EC; Vier-Wochen-Gruppe: 43,8 % im TE, 39 % im EC, 9,4 % im SUB, 6,2 % MR und 1,6 % im DG; Acht-Wochen-Gruppe: 73,6 % im EC, 25,3 % MR und 1,1 % im TE.

Tab. 3

Ursprungsregionen der AEs in den verschiedenen Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten. Ein zeitgleicher Aktivitätsbeginn in mehreren Regionen wurde als multiregional (MR) bezeichnet. Die CA1- und CA3-Region des Ammonshorns sind in die Darstellung nicht einbezogen, da in keiner Gruppe ein Aktivitätsbeginn in dieser Region registriert wurde. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt überwog der entorhinale Cortex als Ursprungsregion der Aktivität in allen drei Gruppen. In der SSSE-Gruppe überwog acht Wochen nach Status epilepticus die Anzahl multiregional generierter AEs gegenüber denen, die vom entorhinalen Cortex ausgingen.

1 Woche	TE	PER	EC	SUB	DG	MR
Elektroden-Kontrollen	/	/	80 %	17 %	/	3 %
Stimulations-Kontrollen	/	/	100 %	/	/	/
SSSE-Gruppe	3,5 %	/	85 %	10,6 %	/	0,9 %

4 Wochen	TE	PER	EC	SUB	DG	MR
Elektroden-Kontrollen	10,5 %	1,8 %	86,7 %	/	/	1,0 %
Stimulations-Kontrollen	43,8 %	/	39 %	9,4 %	1,6 %	6,2 %
SSSE-Gruppe	1,5 %	/	64,4 %	/	/	34,1 %

8 Wochen	TE	PER	EC	SUB	DG	MR
Elektroden-Kontrollen	13,4 %	1,5 %	58,2 %	11,2 %	/	15,7 %
Stimulations-Kontrollen	1,1 %	/	73,6 %	/	/	25,3 %
SSSE-Gruppe	19,8 %	0,6 %	30,5 %	/	2,4 %	46,7 %

TE = temporaler Cortex, PER = perirhinaler Cortex, EC = entorhinaler Cortex, SUB = Subiculum; DG = Gyrus dentatus; MR = multiregional

Nach dreistündigem Status epilepticus ergaben sich die folgenden Werte: Ein-Wochen-Gruppe: 85 % im EC, 10,6 % im Sb, 3,5 % im TE und 0,9 % MR; Vier-Wochen-Gruppe: 64,4 % im EC, 34,1 % MR und 1,5 % im TE; Acht-Wochen-Gruppe: 46,7 % MR, 30,5 % im EC, 19,8 % im TE, 2,4 % im DG und 0,6 % im PC.

Im zeitlichen Verlauf nach SSSE zeigte sich eine deutliche Zunahme des Anteils von AEs mit multiregionalem Ursprung: Acht Wochen nach SSSE war bei fast der Hälfte der AEs mehr als eine Region am Aktivitätsbeginn beteiligt.

In der Mehrheit der untersuchten Hirnschnitte wurden sämtliche AEs in derselben anatomischen Region bzw. multiregional generiert. In allen drei Untersuchungsgruppen fanden sich jedoch auch Schnitte, die im Verlauf des Experiments einen Wechsel der initial aktivierten Region aufwiesen. Dies geschah im Gegensatz zu den im Gyrus dentatus beobachteten unabhängigen Schrittmachern (siehe 4.2.6) ohne Abweichung von der Grundfrequenz. Der Ursprungsort wechselte bei diesen Schnitten zwischen zwei bis drei Regionen.

Die Verteilung der Ursprungsorte anfallsartiger Ereignisse auf die anatomischen Regionen wird in Tabelle 3 zusammengefasst.

4.2.3 Größe des Ursprungs

Bei der Analyse der Ursprungsorte fanden sich deutliche Unterschiede bezüglich des räumlichen Verhaltens der epileptischen Aktivität. So ließen sich die Ereignisse bezüglich der Größe des initial aktivierten Bereiches in zwei Gruppen einteilen: AEs mit fokalem Ursprung und AEs mit großflächigem Ursprung. Als „großflächig“ wurde ein Ursprungsort bezeichnet, wenn bereits 400 ms nach Aktivitätsbeginn (entspricht einer Sequenz von zwei Bildern) über 80 % der Fläche der betroffenen anatomischen Region eine Transmissionsänderung aufwiesen, oder es sich um einen multiregionalen Ursprung handelte. Exemplarisch zeigt die Abbildung 8 eine Gegenüberstellung von fokalem und großflächigem Ursprung. Die AEs in Hirnschnitten der Elektroden-Kontrollen boten überwiegend das Bild eines fokalen Ursprungs. Ein großflächiger Beginn der Aktivität wurde in der zugehörigen Ein-Wochen-Gruppe in 3 % der 100 AEs, nach vier Wochen in keinem der 105 AEs und nach acht Wochen in 17,9 % der 134 AEs gesehen.

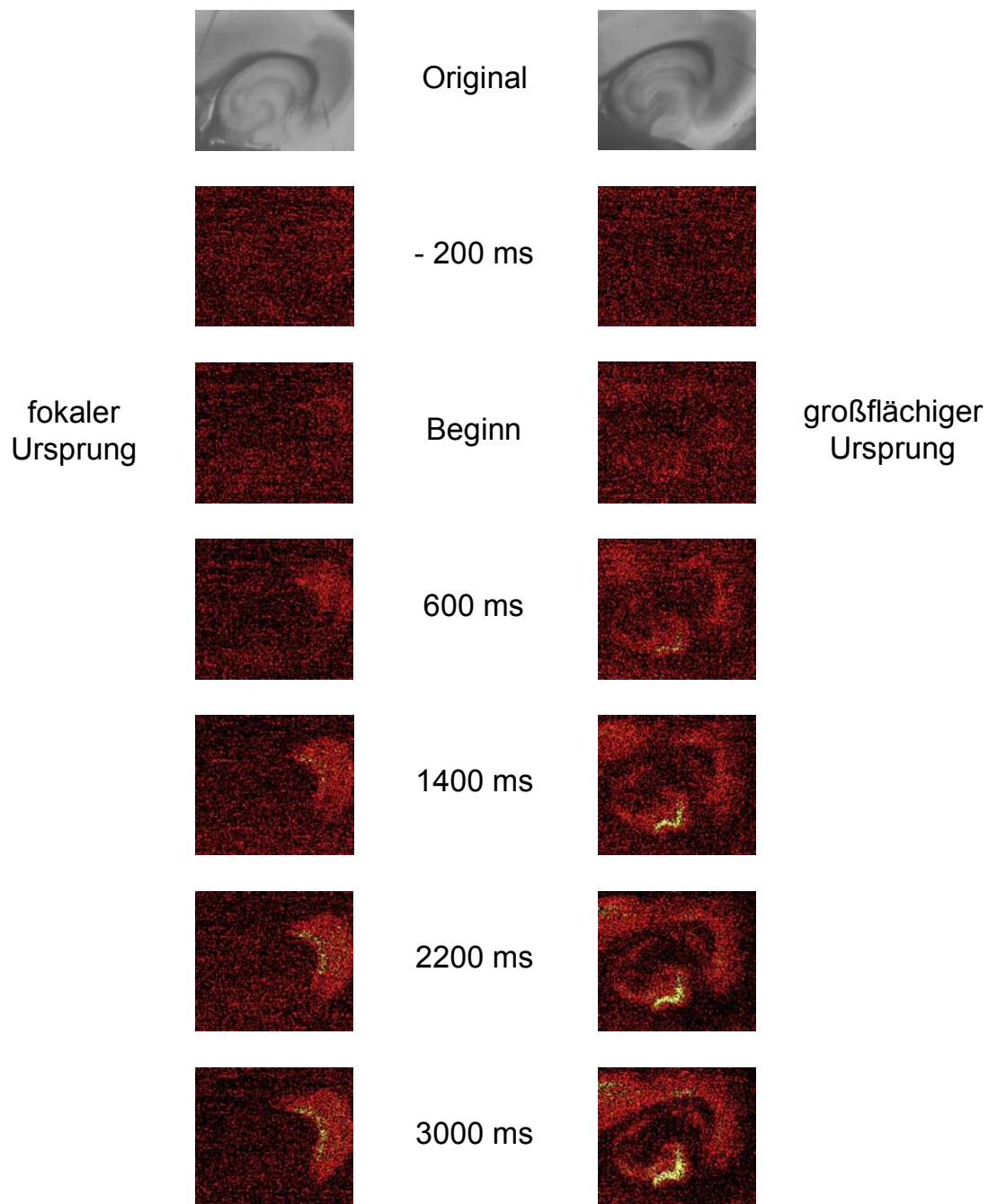


Abb. 8

Sequenz von Differenzbildern eines Hirnschnitts mit großflächigem Aktivitätsbeginn (rechte Spalte) im Vergleich zu einem Präparat mit fokalem Ursprung der epileptischen Aktivität (linke Spalte). Das erste Bild jeder Sequenz stellt das zugrundeliegende Originalbild dar, in dem man auch die in entorhinalen und temporalem Cortex platzierten Mikroelektroden erkennt. Das Originalbild wurde von jedem darauffolgendem Bild subtrahiert. So entstanden die dargestellten fehlfarbencodierten Differenzbilder. In der linken Spalte (Beispiel einer Elektroden-Kontrolle eine Woche nach Barbiturat-Injektion) leuchtet bei Beginn des anfallsartigen Ereignisses nur ein umschriebener Bereich im entorhinalen Cortex auf. Ausgehend von diesem Fokus breitet sich die Aktivität in Richtung Subiculum und perirhinaler Cortex aus. Die Bildsequenz der rechten Spalte (Beispiel eines Tieres acht Wochen nach Status epilepticus) zeigt einen großflächigen Aktivitätsursprung, der neben dem entorhinalen auch den temporalen Cortex sowie Anteile von Ammonshorn und Gyrus dentatus mit einbezieht.

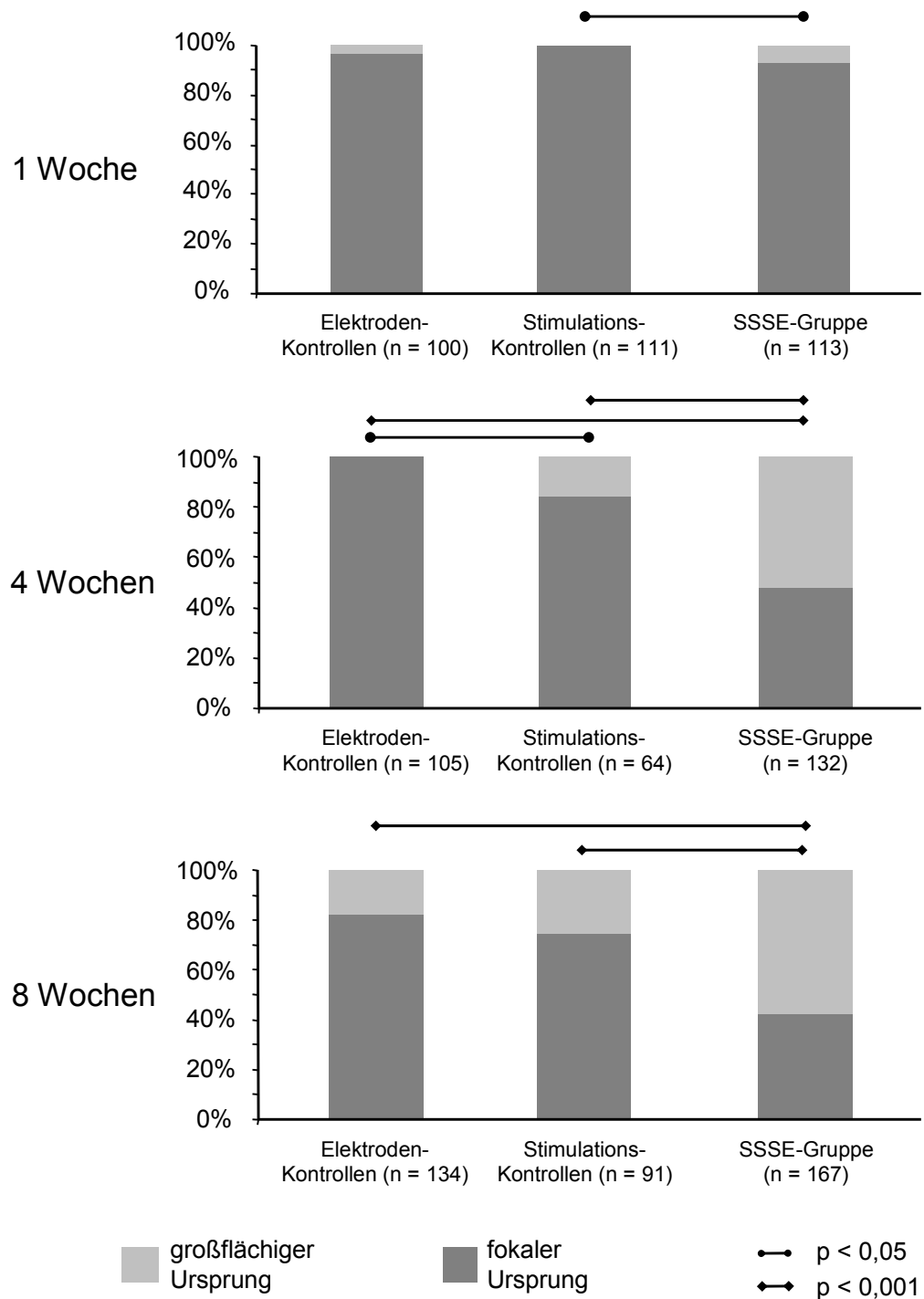


Abb. 9

Anteil von großflächigem und fokalem Ursprung epileptischer Aktivität in den verschiedenen Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten. In den Ein-Wochen-Gruppen zeigte die deutliche Mehrheit der anfallsartigen Ereignisse einen fokalen Beginn der Aktivität, es ergab sich aber ein signifikanter Unterschied zwischen Stimulations-Kontrollen und SSSE-Gruppe. Vier Wochen nach Status epilepticus begann über die Hälfte der anfallsartigen Ereignisse großflächig. Acht Wochen nach Status epilepticus ist der Anteil des großflächigen Ursprungs in dieser Gruppe weiter gestiegen.

Die Stimulations-Kontrollen zeigten nach einer Woche in keinem der 111 AEs einen großflächigen Ursprung. Vier Wochen nach Stimulation wurden mit 15,7 % von 64 AEs signifikant mehr ($p < 0,05$) großflächige Ursprungsorte gesehen als bei den Elektroden-Kontrollen. Acht Wochen nach Stimulation in Barbituratnarkose waren es 25,3 % der 91 analysierten AEs, die ein großflächiges Ursprungsgebiet aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen.

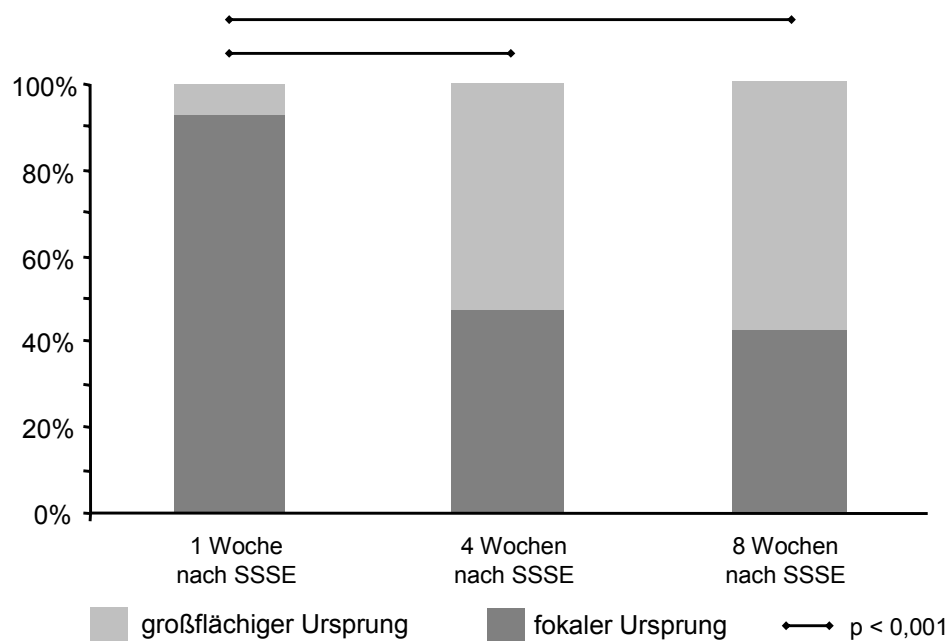


Abb. 10

Anteil der AEs mit großflächigem Ursprung im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus. Nach Vier Wochen war dieser Anteil hochsignifikant größer als in der Ein-Wochen-Gruppe. Auch acht Wochen nach SSSE wurde der großflächige Ursprung hochsignifikant häufiger registriert als in der Ein-Wochen-Gruppe.

In den Präparaten der SSSE-Gruppe entstand die epileptische Aktivität eine Woche nach Status epilepticus mit 7 % der 113 AEs verglichen mit den zugehörigen Stimulations-Kontrollen signifikant ($p < 0,05$) häufiger in einem großflächigen Bereich. Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen ergaben sich vier Wochen nach Status epilepticus mit 52,3 % der 132 AEs, die eine großflächige Aktivierung zeigten. Der Anteil war acht Wochen nach Status epilepticus mit 57,5 % der AEs ($n = 167$) im Vergleich zu beiden Kontrollen ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,001$) größer.

Im zeitlichen Verlauf von einer bis vier Wochen nach Status epilepticus stieg der Anteil von AEs mit großflächigem Ursprung in hochsignifikantem ($p < 0,001$) Maße an. Dieser Effekt blieb bei den Präparaten der Acht-Wochen-Gruppe bestehen (siehe Abbildung 10).

4.2.4 Ausbreitungsmuster

Ausgehend vom Ursprungsort wurde analysiert, wie sich die epileptische Aktivität im Verlauf der AEs über das Hirnschnittpräparat ausbreitete. Hierbei wurde zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Aktivierung der anatomischen Regionen unterschieden. Ereignisse mit kontinuierlicher Ausbreitung wanderten mit einer abgrenzbaren Ausbreitungsfront vom Ursprungsort aus in die jeweils angrenzende Region. Diskontinuierliche Ausbreitungsmuster waren hingegen durch das Fehlen einer optisch nachvollziehbaren Wanderung der Aktivität gekennzeichnet. Hierzu zählten neben Ereignissen, die ein sprunghaftes Übergreifen der Aktivität auf entfernte Regionen zeigten, auch solche, die sich nach einem ausgedehnten großflächigen Ursprung nicht weiter über den Hirnschnitt ausbreiteten.

Die 100 AEs der Elektroden-Kontrollen eine Woche nach Barbituratinjektion zeigten ausschließlich kontinuierliche Ausbreitungsmuster. Nach vier Wochen trat eine diskontinuierliche Ausbreitung bei 2,6 % der 105 Ereignisse auf. In der zugehörigen Acht-Wochen-Gruppe fanden sich bei 134 AEs wiederum ausschließlich kontinuierliche Ausbreitungsmuster.

Eine Woche nach Stimulation unter Barbituratnarkose wurden bei 111 AEs nur kontinuierliche Ausbreitungsmuster gesehen. In der Vier-Wochen-Gruppe trat die diskontinuierliche Ausbreitung mit 15,6 % von 64 AEs signifikant ($p < 0,05$) häufiger auf als bei den Elektroden-Kontrollen. Die 91 Hirnschnitte der Acht-Wochen-Gruppe zeigten erneut ausschließlich kontinuierliche Ausbreitungsmuster.

Von den 113 AEs der SSSE-Gruppe zeigten eine Woche nach Status epilepticus 8 % ein diskontinuierliches Muster und unterschieden sich somit von beiden Kontrollgruppen in jeweils hochsignifikantem Maße ($p < 0,001$). In der Vier-Wochen-Gruppe waren es mit 12,9 % der 132 AEs im Vergleich zu den Elektroden-Kontrollen signifikant ($p < 0,05$) mehr AEs mit diesem Ausbreitungsmuster.

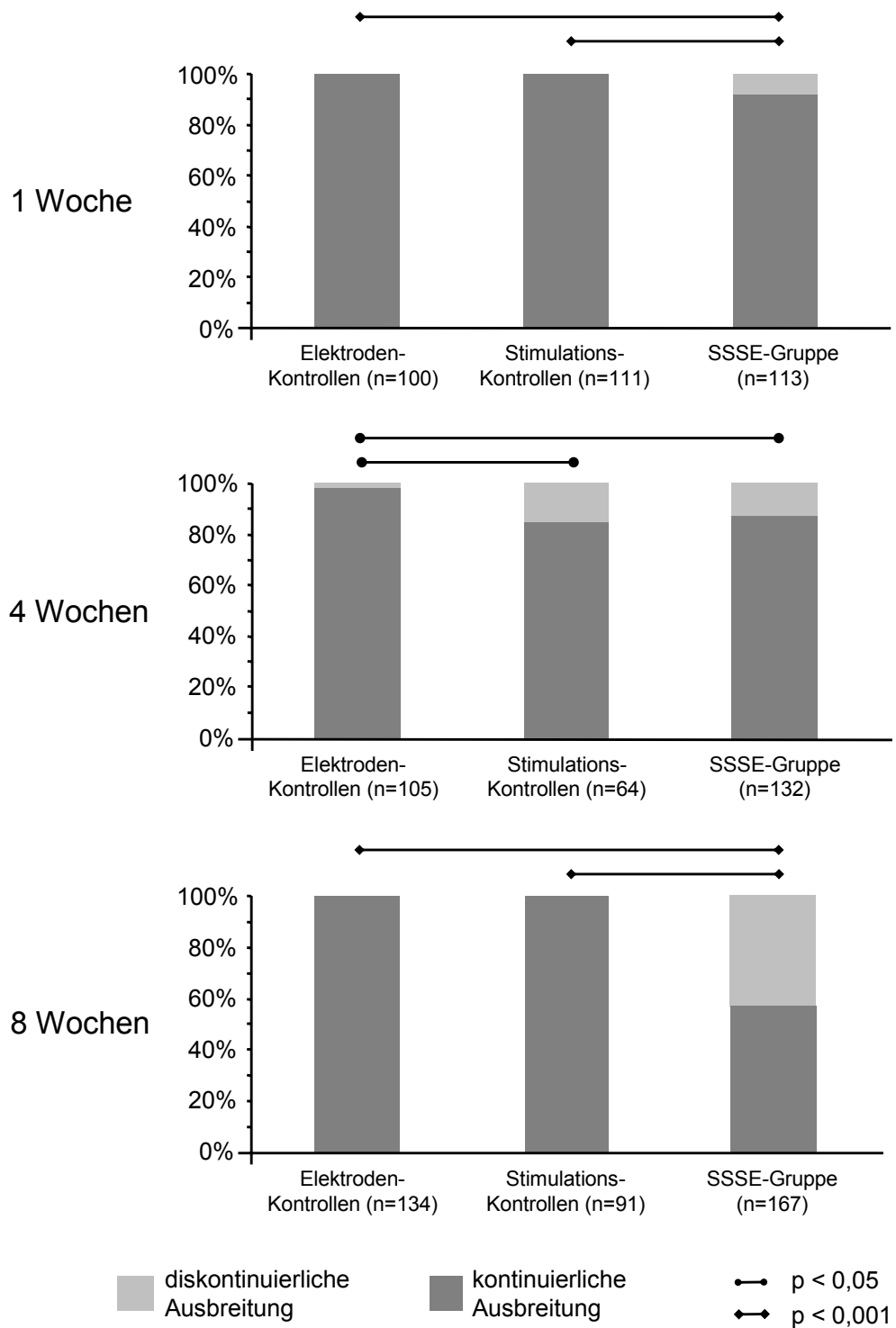


Abb. 11

Prozentualer Anteil von AEs mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Ausbreitung an der Gesamtzahl der Ereignisse für alle neun Untersuchungsgruppen. Bereits eine Woche nach SSSE zeigte sich eine hochsignifikante Häufung der diskontinuierlichen Ausbreitung im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Nach vier Wochen fand sich sowohl in der SSSE-Gruppe als auch bei den Stimulations-Kontrollen eine signifikante Häufung im Vergleich zu den Präparaten der Elektroden-Kontrollen. In der Acht-Wochen-Gruppe war der Anteil der diskontinuierlichen Ausbreitung nach SSSE erneut hochsignifikant größer als in beiden Kontrollgruppen.

Acht Wochen nach Status epilepticus lag der Anteil der Ereignisse mit diskontinuierlicher Ausbreitung bei 43,1 % von 167 AEs und war damit erneut jeweils hochsignifikant ($p < 0,001$) größer als in beiden Kontrollgruppen. Einen Überblick über die Art der Ausbreitung in den verschiedenen Gruppen und zu allen Untersuchungszeitpunkten gibt die Abbildung 11.

Im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus kam es zu einer deutlichen Zunahme des Anteils von AEs mit diskontinuierlicher Ausbreitung (siehe Abbildung 12). In der Acht-Wochen-Gruppe ergab sich ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zur Ein- und Vier-Wochen-Gruppe der Tiere nach Status epilepticus (siehe Abbildung 12).

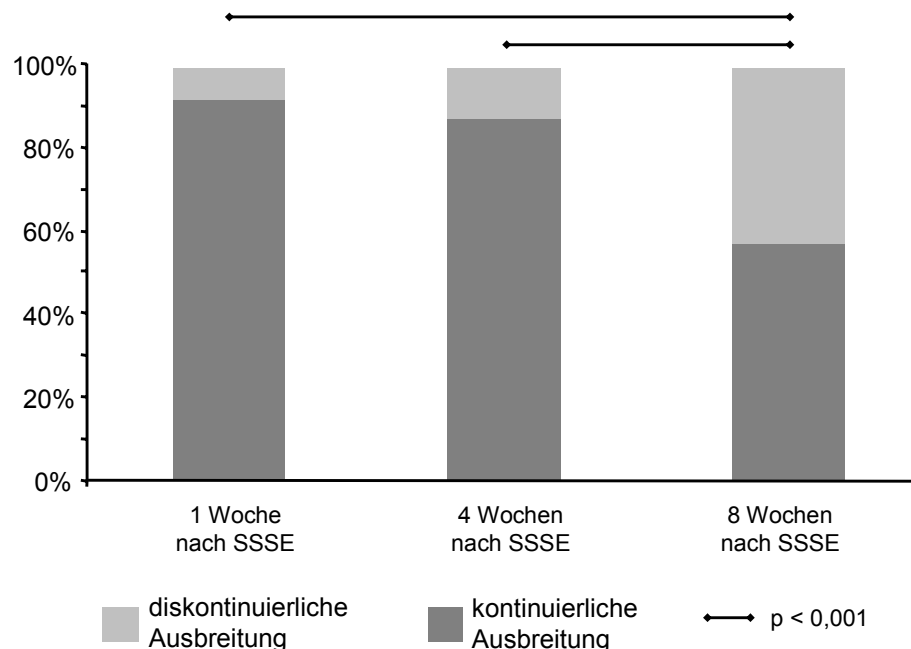


Abb. 12

Ausbreitungsmuster der AEs im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus. Es zeigte sich eine Zunahme des Anteils von AEs mit diskontinuierlicher Propagation, der acht Wochen nach SSSE einen zu beiden früheren Untersuchungszeitpunkten signifikant höheren Wert erreichte.

4.2.5 Ausbreitungsgrad

Für jedes in die Untersuchung einbezogene AE wurde die Anzahl der Regionen bestimmt, die im Verlauf des Ereignisses von der epileptischen Aktivität erreicht wurden. Da die Propagation der AEs häufig im Grenzbereich zwischen zwei Regionen endete, wurden TE, PER, EC, SUB, CA1, CA3 und DG nur dann als „akti-

viert“ bewertet, wenn mindestens 25 % der Fläche eine in den Differenzbildern erkennbare Zunahme der Lichtdurchlässigkeit aufwies. Auf diese Weise wurde jedem AE ein Ausbreitungsgrad zwischen 1 (nur eine aktivierte Region) und 7 (sieben aktivierte Regionen) zugeteilt. Zur vereinfachten Darstellung wurde zwischen Ereignissen mit einem Ausbreitungsgrad von 1-2 Regionen, 3-4 Regionen, 5-6 Regionen und 7 Regionen unterschieden. Letzteres entsprach der Aktivierung des gesamten Schnittpräparates.

Tab. 4

Ausbreitungsgrade der anfallsartigen Ereignisse in den drei verschiedenen Gruppen, eine Woche, vier Wochen und acht Wochen nach Barbituratinjektion, Stimulation in Barbituratnarkose bzw. Status epilepticus. In der SSSE-Gruppe kam es acht Wochen nach Status epilepticus zu einer gesteigerten Variabilität des Ausbreitungsgrades durch die Zunahme des Anteils der kurzläufigen und weitläufigen anfallsartigen Ereignisse.

1 Woche	1 – 2 Reg.	3 – 4 Reg.	4 – 6 Reg.	7 Reg.
Elektroden-Kontrollen	0 %	40 %	50 %	10 %
Stimulations-Kontrollen	0 %	5 %	95 %	0 %
SSSE-Gruppe	1 %	31 %	65 %	3 %

4 Wochen	1 – 2 Reg.	3 – 4 Reg.	4 – 6 Reg.	7 Reg.
Elektroden-Kontrollen	0 %	26 %	63 %	11 %
Stimulations-Kontrollen	0 %	5 %	69 %	26 %
SSSE-Gruppe	2 %	32 %	66 %	0 %

8 Wochen	1 – 2 Reg.	3 – 4 Reg.	4 – 6 Reg.	7 Reg.
Elektroden-Kontrollen	0 %	61 %	39 %	0 %
Stimulations-Kontrollen	5 %	35 %	58 %	2 %
SSSE-Gruppe	17 %	56 %	13 %	14 %

Reg. = anatomische Regionen

Die überwiegende Mehrheit der AEs in beiden Kontrollgruppen breitete sich zu allen Untersuchungszeitpunkten über 3-4 und 5-6 anatomische Regionen des Hirnschnitts aus. In der SSSE-Gruppe erreichte eine und vier Wochen nach Status epilepticus mit jeweils über 90 % ebenfalls die überwiegende Mehrheit der AEs zwischen 3 und 6 Regionen. Acht Wochen nach SSSE zeigten die Hirnschnitte der SSSE-Gruppe jedoch ein deutlich variables Verhalten bezüglich des Ausbreitungsgrades. Sowohl der Anteil von AEs mit einer auf nur 1-2 Regionen begrenzten Ausbreitung, als auch der Anteil von AEs mit kompletter Aktivierung des Präparates stiegen deutlich an. Diese vergleichsweise weite Streuung des Ausbreitungsgrades fand sich in dieser Gruppe für beide Hemisphären. Einen Überblick über den Ausbreitungsgrad der AEs in den verschiedenen Gruppen gibt die Tabelle 4.

4.2.6 Epileptische Aktivität im Gyrus dentatus

Im Rahmen der Analyse des intrinsischen optischen Signals fanden sich in allen Untersuchungsgruppen Präparate, die epileptische Aktivität im Gyrus dentatus aufwiesen. Hierbei traten zwei verschiedene Aktivierungsformen der Region auf. Zum einen kam es zur Invasion dieser Region im Rahmen der Propagation eines AEs, das in einer anderen anatomischen Region generiert wurde. Dieses Phänomen fand sich bei den Elektroden-Kontrollen in der Ein-Wochen-Gruppe bei einem von zehn, in der Vier-Wochen-Gruppe bei zwei von neun und in der Acht-Wochen-Gruppe bei zwei von sieben Hirnschnitten.

Die Präparate der Stimulations-Kontrollen zeigten eine Propagation in den Gyrus dentatus in der Ein-Wochen-Gruppe in zwei von sieben, in der Vier-Wochen-Gruppe in zwei von sieben und in der Acht-Wochen-Gruppe in zwei von zehn Hirnschnitten. Eine Woche nach SSSE sahen wir das Phänomen in einem von acht, vier Wochen nach SSSE in zwei von sieben und acht Wochen nach SSSE in zwei von fünf Präparaten mit wandernder Aktivität. Damit fanden sich weder zwischen den verschiedenen Gruppen noch im zeitlichen Verlauf nach SSSE signifikante Unterschiede bezüglich der Invasion des Gyrus dentatus durch AEs.

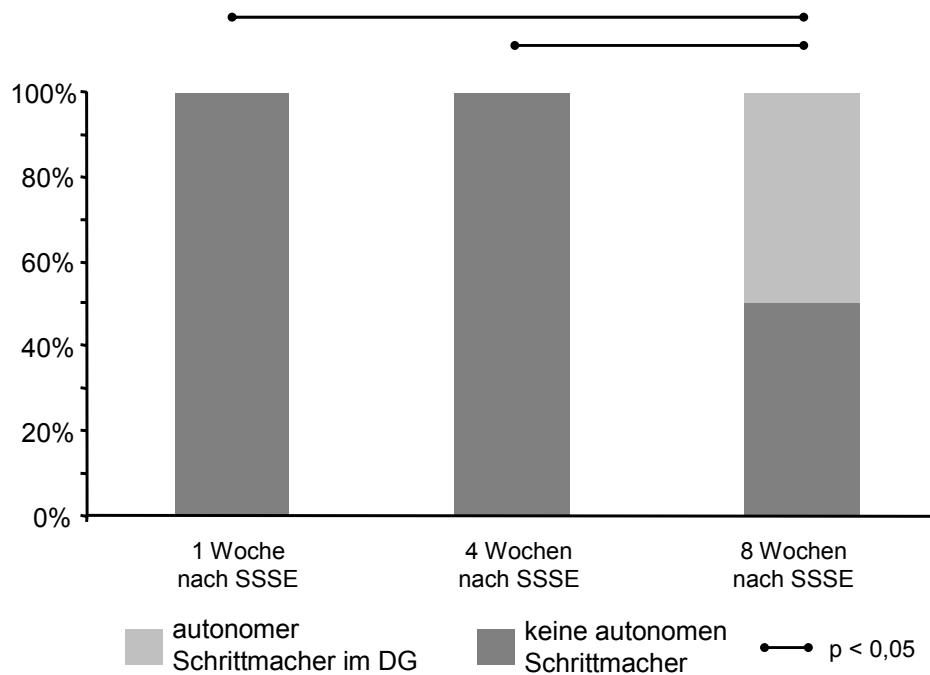
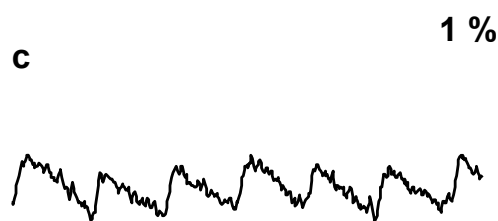
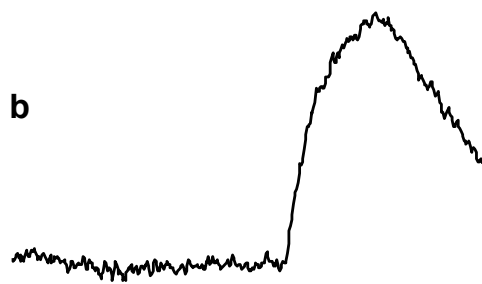
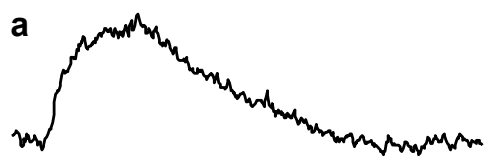
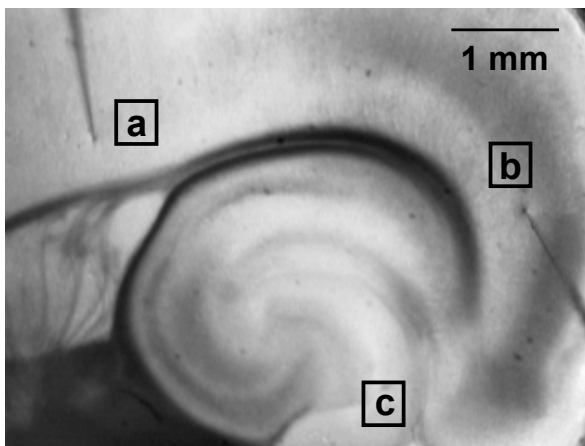


Abb. 13

Prozentualer Anteil von Hirnschnitten mit autonomem Schrittmacher im Gyrus dentatus im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus. In beiden Kontrollgruppen wurde zu keinem Zeitpunkt ein zusätzlicher Schrittmacher gefunden. Acht Wochen nach Status epilepticus wurde bei 50 % der Präparate ein unabhängiger Schrittmacher im Gyrus dentatus identifiziert.

Als zweite Form von epileptischer Aktivität wurde ein unabhängiger Fokus im Gyrus dentatus beobachtet. Bei den betroffenen Hirnschnitten fand sich in dieser Region eine von den außerhalb der Dentatusregion generierten AEs zeitlich und räumlich unabhängig auftretende epileptische Aktivität mit eigener Frequenz (siehe Abbildung 14). Die mittlere Frequenz lag im Gyrus dentatus mit $2,18 \text{ min}^{-1}$ gegenüber $0,5 \text{ min}^{-1}$ in der Ursprungsregion der AEs signifikant höher ($p < 0,05$). Zur vorläufigen Einordnung des Phänomens wurde hier die Bezeichnung „autonomer Schrittmacher“ gewählt. Ein autonomer Schrittmacher wurde ausschließlich in Präparaten von Tieren acht Wochen nach SSSE beobachtet, und zwar in fünf von zehn Hirnschnitten. Somit ergab sich jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen dieses Untersuchungszeitpunktes sowie im zeitlichen Verlauf nach SSSE im Vergleich zu beiden früheren Untersuchungszeitpunkten. Eine Gegenüberstellung der oben genannten Frequenzen für alle betroffenen Präparate zeigt die Tabelle 5, die Kinetik des autonomen Schrittmachers nach SSSE ist in Abbildung 13 dargestellt.



1 min

Abb. 14

Beispiel eines Hirnschnitts mit autonomem Schrittmacher im Gyrus dentatus. Der Ursprungsort der AEs wechselte bei diesem Hirnschnitt zwischen TE und EC. Um zu untersuchen, ob eine direkte Relation zwischen der Aktivität im Gyrus dentatus und den AEs besteht, wurde je ein Messfeld im TE (a), EC (b) und DG (c) platziert. Die zugehörigen Transmissionsänderungen im zeitlichen Verlauf zeigen, dass die epileptische Aktivität im DG (c) sowohl von dem im TE generierten AE (a) als auch von dem darauffolgenden im EC generierten AE (b) zeitlich unabhängig auftritt. Außerdem weist die epileptische Aktivität im Gyrus dentatus eine deutlich höhere Frequenz auf als die AEs außerhalb der Dentatusregion.

Tab. 5

Gegenüberstellung der Frequenz epileptischer Aktivität in Gyrus dentatus und der Frequenz der anfallsartigen Ereignisse für die fünf Hirnschnitte der Tiere, die acht Wochen nach SSSE einen autonomen Schrittmacher in dieser Region aufwiesen.

Präparate der SSSE-Gruppe mit Autonomie im DG	Frequenz im DG	Frequenz der AEs (außerhalb vom DG)
Präparat 1, links	0,8 min ⁻¹	0,3 min ⁻¹
Präparat 2, links	2,4 min ⁻¹	0,8 min ⁻¹
Präparat 3, rechts	4,3 min ⁻¹	0,3 min ⁻¹
Präparat 4, rechts	0,8 min ⁻¹	0,6 min ⁻¹
Präparat 5, links	2,6 min ⁻¹	0,5 min ⁻¹
Mittelwert mit Standardabweichung	2,18 min ⁻¹ ± 1,46 min ⁻¹	0,5 min ⁻¹ ± 0,21 min ⁻¹

DG = Gyrus dentatus; AE = anfallsartiges Ereignis

4.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es fanden sich bezüglich des Verhaltens epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus folgende signifikante Unterschiede im Vergleich zu einer oder beiden Kontrollgruppen:

Es wurde vier und acht Wochen nach SSSE eine im Vergleich zur Ein-Wochen-Gruppe kürzere Latenz bis zum Auftreten epileptischer Aktivität beobachtet. Die Frequenz der AEs war zu diesen Untersuchungszeitpunkten höher als bei den Kontrollen. Acht Wochen nach SSSE trat zusätzlich eine signifikant kürzere Aktivitätsdauer im EC auf. Im zeitlichen Verlauf verkürzte sich außerdem die Aktivitätsdauer im TE der Acht-Wochen-Gruppe im Vergleich zur Ein-Wochen-Gruppe. Es kam vier und acht Wochen nach SSSE zu einem geringeren Abfall des Feldpotenzials im Vergleich zu mindestens einer Kontrollgruppe.

Vier Wochen nach SSSE zeigte ein im Vergleich zu den Kontrollen hochsignifikant größerer Anteil der AEs einen großflächigen Ursprung. Dasselbe galt für die Acht-Wochen-Gruppe. Im zeitlichen Verlauf ergab sich ebenfalls eine hochsignifikante

Zunahme des großflächigen Aktivitätsbeginns im Vergleich zur Ein-Wochen-Gruppe. Bezüglich der Ausbreitung epileptischer Aktivität zeigten die Hirnschnitte der SSSE-Gruppe zu allen drei Zeitpunkten einen signifikant bis hochsignifikant größeren Anteil von AEs mit diskontinuierlicher Propagation. Im zeitlichen Verlauf fand sich hierbei eine zur Ein- und Vier-Wochen-Gruppe hochsignifikante Zunahme des Anteils von AEs mit diskontinuierlicher Ausbreitung acht Wochen nach SSSE. Ein autonomer Schrittmacher im Gyrus dentatus wurde ausschließlich in Schnittpräparaten von Tieren acht Wochen nach Status epilepticus identifiziert. Die Anzahl der Schnitte, die dieses Phänomen zeigten, war somit sowohl zu den entsprechenden Kontrollen, als auch zur Ein- und Vier-Wochen-Gruppe nach Status epilepticus signifikant erhöht.

5 DISKUSSION

Der Status epilepticus stellt die extremste Erscheinungsform des epileptischen Anfalls dar und geht mit einer hohen Mortalität (Garzon et al., 2003; Coeytaux et al., 2000; DeLorenzo et al., 1995) und neurologischen Morbidität (DeLorenzo et al., 1995; Celesia, 1983; Rowan und Scott, 1970) einher. Es gibt Hinweise dafür, dass auch die Entwicklung einer chronischen Epilepsie zu den ernstzunehmenden Folgen des Krankheitsbildes gehört (Hesdorffer et al., 1998). Da bei vielen Patienten schon prämorbid strukturelle ZNS-Läsionen bestehen, bleibt meist unklar, ob in der Folge auftretende epileptische Anfälle in direktem Zusammenhang mit dem Status epilepticus stehen oder durch die vorbestehende Läsion hervorgerufen werden. Dies ist einer der Gründe, warum sich die Beantwortung der Frage nach einem Zusammenhang zwischen Status epilepticus und Epileptogenese am Patienten schwierig gestaltet (DeLorenzo et al., 1995). Weitere Gründe sind: 1) Es besteht die Möglichkeit, dass eine fortschreitende Epileptogenese nicht wahrgenommen wird, da eine prophylaktische antikonvulsive Therapie das klinische Symptom des epileptischen Anfalls unterdrückt. 2) Bislang ist ungeklärt, welche weiteren Parameter beim Patienten die Epileptogenese widerspiegeln könnten. Da durch das Oberflächen-EEG nur etwa ein Drittel der kortikalen Hirnfunktion reflektiert wird (Zschocke, 2002) besteht die Möglichkeit, dass Areale mit gesteigerter Erregbarkeit nicht detektiert werden. Inwieweit strukturelle, aber auch funktionelle Prozesse, die mit bildgebenden Verfahren dargestellt werden können, der Epileptogenese entsprechen, ist noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen (Duncan, 1997). 3) Bei sämtlichen am Patienten eingesetzten Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass nur Longitudinaluntersuchungen geeignet sind, die Epileptogenese zu untersuchen, was mit einem erheblichen logistischen, zeitlichen und personellen Aufwand verbunden wäre.

Durch die Verwendung tierexperimenteller Modelle konnten in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Erkenntnisse über funktionelle und morphologische Veränderungen des neuronalen Netzwerkes nach Status epilepticus gewonnen und mit dem Auftreten spontaner Anfälle in Beziehung gebracht werden (Mazarati et al., 2002; Mello et al., 1993; Lothman et al., 1990). Dennoch konnte bis heute nicht

vollständig geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt und in welchen Hirnarealen funktionelle Defizite als Ausdruck der zunehmenden Erregbarkeit des Hirngewebes nach Status epilepticus auftreten. Die Beantwortung dieser Frage ist von großer Bedeutung, da ein besseres Verständnis des epileptogenen Prozesses zur Optimierung therapeutischer Ansätze beitragen könnte. Ziel der vorliegenden Studie war es, durch die Beurteilung epileptischer Aktivität *in vitro* mittels elektrophysiologischer und optischer Messmethoden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Status epilepticus funktionelle Änderungen zu lokalisieren und im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Hierzu wurden durch elektrische Stimulation des Tractus perforans ein Status epilepticus *in vivo* induziert und im Anschluss kombinierte Hirnschnitte zu definierten Zeitpunkten analysiert.

Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Modelle konzentrieren sich nicht ohne Grund auf den Temporallappen bzw. Hippocampus. In dieser Hirnregion ist die Schwelle für die Entstehung epileptischer Aktivität besonders niedrig, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich etwa zwei Drittel aller lokalisationsbezogenen Epilepsien dieser Region zuordnen lassen (Siemes und Bourgeois, 2001). Im Folgenden sollen zunächst die eingesetzten Methoden und deren Nutzen erörtert werden. Danach werden die Ergebnisse im Hinblick auf die in der Fragestellung der Arbeit vorgestellten Hypothesen diskutiert.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 *In vivo*-Modell des Status epilepticus

Um einen Status epilepticus in vitalem Hirngewebe zu induzieren, steht heute eine Vielzahl pharmakologischer und elektrischer Modelle zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden Schnittpräparate von Ratten untersucht, bei denen im Vorfeld durch Applikation von elektrischem Strom ein über 180 min selbsterhaltender Status epilepticus induziert wurde. Es konnte experimentell in einer grundlegenden Studie gezeigt werden, dass strukturelle Läsionen nach Status epilepticus als Funktion der Statusdauer auftreten. Die kürzeste Statusdauer, die zu entsprechenden Veränderungen führte, lag bei 82 min (Meldrum und Brierley, 1973). Um sicherzustellen, dass der Status epilepticus in der vorliegenden Studie ausreichende strukturelle Läsionen verursacht hat, wurde die Dauer von 180 min ge-

wählt. Ein entscheidender Vorteil des elektrischen Modells liegt darin, dass die Stimulation direkt auf das Hirnareal mit der höchsten Bereitschaft für epileptische Aktivität zielt: den Hippocampus. Mögliche neurotoxische oder systemische Effekte von konvulsiven Substanzen (Ferkany et al., 1984), die in pharmakologischen Modellen des Status epilepticus wie dem Pilocarpin- und dem Kainsäure-Modell eingesetzt werden, können somit ausgeschlossen werden. Einen Nachteil des elektrischen Modells stellt der erhöhte Arbeitsaufwand durch die notwendige stereotaktische Elektrodenimplantation dar. Hierbei handelt es sich um einen neurochirurgischen Eingriff und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Prozesse initiiert werden, die Morphologie oder Funktionalität des Gehirns der Ratte im postoperativen Verlauf beeinflussen. Das gleiche gilt für die anhaltende Irritation des Hirngewebes durch das Verweilen von Stimulations- und Ableitelektrode. Auch die elektrische Stimulation selbst stellt eine unphysiologische Situation dar, die entsprechende Konsequenzen für das Gehirn haben könnte. Durch die Analyse der beiden Kontrollgruppen parallel zu den Tieren nach Status epilepticus sollte eine Fehldeutung möglicher Effekte minimiert werden.

5.1.2 Kombiniertes Hirnschnittpräparat

Aus den Gehirnen der vorbehandelten Tiere wurden kombinierte Hippocampus-entorhinaler Cortex-Hirnschnittpräparate gewonnen. Durch den Schneidvorgang wird eine Vielzahl afferenter und efferenter Faserverbindungen zwischen Präparat und angrenzendem Gewebe unterbrochen. Dies zeigen die Ergebnisse einer anderen Arbeit, in der die räumliche Ausdehnung inhibitorischer Interneurone des Gyrus dentatus im Ganzhirnpräparat analysiert und mit der Situation im Hirnschnitt verglichen wurde (Buckmaster und Schwartzkroin, 1995). Hierbei wurde gezeigt, dass weniger als 50 % der efferenten Axone eines hilären Interneurons innerhalb des Hirnschnittes erhalten bleiben. Die restlichen Fasern, deren Zielzellen zum Teil in einer Entfernung liegen, die der Hälfte der Länge des Hippocampus entspricht, werden somit unterbrochen. Gleiches gilt für die inhibitorischen Afferenzen der Körnerzellen im Hirnschnitt. Dass dieser Faserverlust auch funktionelle Konsequenzen hat, zeigen die in derselben Arbeit durchgeführten Messungen von Doppelpulsen *in vivo* und *in vitro*. Hier wurde gezeigt, dass die Körnerzellen des Gyrus dentatus *in vitro* deutlich weniger inhibitorische Signale erhalten als *in vivo*.

In einer anderen Studie konnte aber durch intraaxonale Mikroinjektion von Farbstoffen (Rhodamin-Dextran-Amin) gezeigt werden, dass die meisten bekannten Verbindungen zwischen entorhinalem Cortex, Hippocampus und Gyrus dentatus im kombinierten Hirnschnittpräparat erhalten bleiben (Boulton et al., 1992). Die erhaltene Konnektivität zwischen entorhinalem Cortex und CA1-Region im Schnittpräparat wurde in einer weiteren Arbeit durch die Messung von Feldpotenzialen bestätigt (Empson und Heinemann, 1995). Damit erfüllt das kombinierte Schnittpräparat die entscheidenden Voraussetzungen, um die Propagation epileptischer Aktivität zwischen hippocampalen und parahippocampalen Strukturen zu analysieren. Das zeigt auch der erfolgreiche Einsatz der Präparationsmethode in vorangegangenen Studien, in denen das zeitliche und räumliche Verhalten epileptischer Aktivität untersucht wurde (Holtkamp et al., 2003; Buchheim et al., 2000; Buchheim et al., 1999).

5.1.3 Kombination verschiedener Modelle

Die kombinierten Hirnschnittpräparate der vorbehandelten Tiere wurden im Niedrig-Mg²⁺-Modell *in vitro* auf funktionelle Folgen des Status epilepticus *in vivo* hin untersucht. Der Einsatz eines *in vitro*-Modells als Werkzeug zur Analyse der Folgen epileptischer Ereignisse *in vivo* findet sich auch in vorangegangenen Studien. Beispielsweise wurden die Auswirkungen von Kindling *in vivo* auf das Verhalten epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell analysiert (Behr et al., 1996). Beim Kindling werden durch die elektrische Stimulation limbischer Strukturen einzelne epileptische Anfälle induziert, deren Schweregrad mit zunehmender Anzahl der Stimulationen steigt (Goddard et al., 1969). Da der Kindling-Prozess in einer chronisch gesteigerten Empfindlichkeit des Hirngewebes gegenüber elektrischen Stimulationen resultiert, wird dieser Ansatz als Modell der chronischen Epilepsie angesehen (McIntyre et al., 2002; Treiman, 1998; Sato et al., 1990). In anderen Studien wurde im Pilocarpin-Modell der Ratte (Kohling et al., 1995) bzw. der Maus (D'Antuono et al., 2002) zunächst ein Status epilepticus *in vivo* induziert, um später das Verhalten epileptischer Aktivität in kombinierten Hirnschnittpräparaten von Untersuchungs- und Kontrollgruppe nach Applikation von 4-Aminopyridin (4-AP) zu analysieren. Im Pilocarpin-Modell wird ein Status epilepticus durch die Applikation des Chemokonvulsivums Pilocarpin induziert, das als Agonist von Acetylcholin

am Muscarin-Rezeptor wirkt. Die Applikation von Pilocarpin erfolgt intraperitoneal oder subcutan und resultiert in der Induktion fokaler Anfälle mit sekundärer Generalisierung, die schließlich in einen Status epilepticus übergehen (Cavalheiro et al., 1982). Bei 4-AP handelt es sich um einen K^+ -Kanalblocker, dessen Applikation *in vitro* ähnlich wie der Mg^{2+} -Entzug zum Auftreten anfallsartiger Ereignisse führt, allerdings geht die Aktivität seltener und verzögerter in Spätaktivität über (Treiman, 1998).

Aus der Kombination unterschiedlicher Modelle ergeben sich einige Probleme: Im Allgemeinen besteht der Sinn eines Modells des Status epilepticus darin, ein zeitlich begrenztes epileptisches Ereignis zu induzieren, um dessen Auswirkungen auf physiologische Abläufe zu analysieren. In der vorliegenden Studie wurde hingegen nach stattgehabtem Status epilepticus erneut experimentell epileptische Aktivität im Hirngewebe induziert. Deshalb besteht die Gefahr, dass modellspezifische Eigenschaften des *in vitro*-Modells als Folgen des *in vivo*-Modells gewertet werden und umgekehrt. Durch den Vergleich mit vorbestehenden Daten und den entsprechenden Kontrollgruppen wird diese Gefahr jedoch minimiert.

Die Kombination des *in vitro*-Modells für fokale epileptische Anfälle mit dem *in vivo*-Modell des Status epilepticus ermöglicht allerdings eine Aussage dazu, ob bzw. in welchem Ausmaß der Status epilepticus den Schweregrad spontaner epileptischer Anfälle und damit den Grad der Vulnerabilität des Hirngewebes beeinflusst hat: Eine verkürzte Latenz bis zum Auftreten epileptischer Aktivität weist beispielsweise auf eine gesteigerte Exzitabilität hin. Eine Zunahme der Größe des Ursprungsortes und ausgedehntere Ausbreitungsmuster der anfallsartigen Ereignisse sprechen für eine gesteigerte Synchronizität.

5.1.4 *In vitro*-Modell fokaler Anfälle

In der vorliegenden Arbeit wurde das Niedrig- Mg^{2+} -Modell als Werkzeug genutzt, um mögliche Veränderungen der Erregbarkeit des Hirngewebes nach Status epilepticus zu registrieren und zu beurteilen. Die anfallsartigen Ereignisse, die in diesem *in vitro*-Modell neben anderen Formen epileptischer Aktivität auftreten, weisen charakteristische pathophysiologische Veränderungen auf, die dem fokalen Anfall *in vivo* gleichen (Ayala, 1983). Es bestehen noch weitere Möglichkeiten

zur Induktion epileptischer Ereignisse im kombinierten Hirnschnittpräparat, die fokalen Anfällen *in vivo* ähneln, zum Beispiel die Badapplikation von 4-AP (Perreault und Avoli, 1991) oder die elektrische Stimulation spezifischer Areale (Wadman und Gutnick, 1993). Es gibt mehrere Gründe dafür, warum in der vorliegenden Arbeit das Niedrig-Mg²⁺-Modell gewählt wurde: 1) Es sollte, wie auch unter *in vivo*-Bedingungen auf den Einsatz eines Chemokonvulsivums verzichtet werden. 2) Es liegt nahe, dass epileptische Aktivität, die durch lokale Stimulation induziert wird, unabhängig von regionalen Unterschieden der Erregungsschwelle immer im Bereich der Stimulationselektrode beginnt. Der Ursprungsort der anfallsartigen Ereignisse ist jedoch in der vorliegenden Studie als Parameter für die Identifizierung der Region bzw. der Regionen mit der niedrigsten Erregungsschwelle von großer Bedeutung. Für das Niedrig-Mg²⁺-Modell wurde gezeigt, dass in naivem Hirngewebe die überwiegende Mehrheit der anfallsartigen Ereignisse im entorhinalen Cortex generiert wird (Holtkamp et al., 2003; Buchheim et al., 2000; Meierkord et al., 1997). Durch den Vergleich des metabolischen Niedrig-Mg²⁺-Modells mit dem chemokonvulsiven 4-AP-Modell wurde gezeigt, dass die Bevorzugung dieser Ursprungsregion im naiven Hirngewebe adulter Tiere modellspezifisch ist (Buchheim et al., 2000). Abweichende Ursprungsregionen im Niedrig-Mg²⁺-Modell weisen also auf funktionell relevante Änderungen hin.

5.1.5 Interface- und Submerged-Bedingungen

Die Analyse der kombinierten Hirnschnitte erfolgte unter Interface-Bedingungen, d. h. die Präparate in der Messkammer befanden sich im Gegensatz zu Submerged (unter Wasser)-Bedingungen nicht unterhalb des ACSF-Spiegels, sondern an der Grenze zwischen flüssiger und gasförmiger Phase (siehe 3.5). Ein Vorteil der Submerged-Messung liegt darin, dass sich das Objektiv des Mikroskops und das Präparat im selben Medium befinden, so dass ein Wechsel der optischen Dichte und hiermit verbundene Brechungsphänomene im Verlauf des Strahlenganges ausbleiben. Außerdem ist ein höherer Vergrößerungsfaktor bzw. eine detailliertere Abbildung des Präparates möglich. Dass die Nährlösung mit einer höheren Fließgeschwindigkeit durch die Messkammer geleitet werden kann als unter Interface-Bedingungen, ist vor allem dann von Nutzen, wenn pharmakologische Substanzen kurzfristig ein- bzw. ausgewaschen werden sollen. Eine Stu-

die, in der beide Methoden direkt miteinander verglichen wurden, ergab, dass das Volumen des Extrazellulärtraumes unter Submerged-Bedingungen im Vergleich zur Interface-Messung deutlich größer ist (Schuchmann et al., 2002). Hier liegt ein klarer Nachteil der Methode für die Analyse anfallsartiger Ereignisse, da ein großer Extrazellulärtraum durch die Unterdrückung nicht-synaptischer Erregungsfortleitung der Ausbreitung epileptischer Aktivität entgegenwirken kann (Hochman et al., 1995). So ließe sich erklären, dass die anfallsartigen Ereignisse unter Interface-Bedingungen länger andauern und eine größere Amplitude des Feldpotenzials aufweisen als unter Submerged-Bedingungen (Schuchmann et al., 2002; Meierkord et al., 1997). Diese Erkenntnisse waren ausschlaggebend dafür, dass die Wahl in der vorliegenden Arbeit auf die Interface-Messung fiel.

5.1.6 Elektrophysiologische und optische Messung

Um Hinweise für eine veränderte Vulnerabilität der verschiedenen Regionen des Schnittpräparates zu den drei Untersuchungszeitpunkten zu finden, wurden zwei Messmethoden parallel angewandt: elektrographische Ableitungen über ionenselektive Messelektroden und die Aufzeichnung intrinsischer optischer Signale. Die elektrographische Ableitung ermöglicht die kontinuierliche Messung von Feldpotenzial und extrazellulärer Kaliumkonzentration. Hervorzuheben ist hierbei die hohe zeitliche Auflösung der Messmethode, die im Bereich von Mikrosekunden liegt. Einen Nachteil der Methode stellt die räumliche Auflösung dar, die auf die unmittelbare Umgebung der Elektrodenspitze limitiert bleibt.

Eine Möglichkeit, die räumliche Auflösung zu verbessern, besteht im gleichzeitigen Einsatz mehrerer Mikroelektroden in so genannten „Multielektroden-Arrays“ (Alefeld et al., 1998; Holsheimer und Lopes da Silva, 1989). Mit jeder in das Präparat eingebrachten Elektrode steigt allerdings die Gefahr, dass Irritationen des Hirngewebes auftreten, die ihrerseits zu funktionellen Auffälligkeiten führen können. Die Gefahr einer mechanischen Gewebsschädigung konnte durch die Entwicklung von planaren Multielektroden-Arrays verringert werden. Zwischen Hirnschnitt und Elektroden-Array, das bis zu 64 planare Elektroden beinhaltet, befindet sich hier eine spezielle Polyimid-Schicht, auf der das Präparat so gut haftet, dass die Messungen über einen Zeitraum von bis zu sechs Stunden durchgeführt wer-

den können (Oka et al., 1999). Der entscheidende Nachteil der Methode besteht darin, dass sämtliche Elektroden innerhalb des Arrays fixiert sind und deshalb nicht individuell den anatomischen und elektrophysiologischen Gegebenheiten im Hirnschnitt entsprechend positioniert werden können.

Ein weiteres Messverfahren, das sich durch eine hohe räumliche Auflösung auszeichnet, ist die Analyse extrinsischer optischer Signale. Diese Methode erfordert im Gegensatz zur Analyse intrinsischer optischer Signale den Einsatz spezieller Farbstoffe (Lian et al., 2001; Chesi et al., 1998; Albowitz et al., 1998). Dadurch besteht die Gefahr unerwünschter Nebeneffekte durch den verwendeten Farbstoff. So kann es zu Veränderungen von synaptischer Transmission, Membranwiderstand und der Aktivität von Ionenpumpen kommen. In Kombination mit einer intensiven Illumination des Präparates erleichtert die Anwesenheit der Farbstoffmoleküle außerdem die Bildung freier Sauerstoffradikale, die schwere Schäden an der neuronalen Zellmembran verursachen können (Grinvald et al., 1988).

Die Messung intrinsischer optischer Signale ist hingegen eine rein nicht-invasive Methode, die zudem die simultane Analyse des gesamten Schnittpräparates ermöglicht. So können Ursprungsorte ausserhalb der Elektrodenreichweite detektiert und das Ausbreitungsmuster der epileptischen Aktivität im Hirnschnitt nachvollzogen werden. Der Nachteil der optischen Methode liegt in der zeitlichen Auflösung, die aufgrund der maximalen Bildfrequenz der CCD-Kamera auf 20 Bilder pro Sekunde begrenzt ist.

Die neurobiologischen Grundlagen der Änderung des IOS sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die Erstbeschreiber des Phänomens vermuteten, dass Veränderungen der Viskosität des Zytosols dem Signal zugrunde liegen (Hill und Keynes, 1949). Andere Autoren diskutieren Änderungen der extrazellulären Matrix (Kohn et al., 2000), Änderungen des Volumens der Mitochondrien (Aitken et al., 1999) oder Konformationsänderungen von Dendriten (Jarvis et al., 1999) als Ursache der Signaländerung. Eine wichtige Rolle kommt dem EZR-Volumen zu, wobei unter Interface-Bedingungen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Schrumpfung des EZR (bzw. Schwellung von Gliazellen) und der Richtung der IOS-Änderung besteht (Buchheim et al., 2002; Buchheim et al., 1999).

Durch die Kombination der elektrographischen Messung mit der Aufzeichnung

intrinsischer optischer Signale im Versuchsaufbau konnten die Vorteile der Verfahren vereinigt und zur Analyse funktioneller Veränderungen des Hirngewebes nach Status epilepticus genutzt werden.

5.2 Gesteigerte Exzitabilität nach Status epilepticus

5.2.1 Latenz bis zum Aktivitätsbeginn

In der vorliegenden Studie wurde das Niedrig-Mg²⁺-Modell genutzt, um epileptische Aktivität in den gewonnenen Hirnschnittpräparaten zu induzieren. Wie bereits beschrieben, beruht die Generierung spontaner anfallsartiger Ereignisse in diesem Modell hauptsächlich auf der Steigerung der Exzitabilität der Neurone durch das Lösen des Mg²⁺-Blockes aus dem Ionenkanal des exzitatorischen NMDA-Rezeptors (siehe 1.6). Mit zunehmender Dauer der Auswaschphase erhöht sich die Anzahl der entblockten Ionenkanäle. Der resultierende Einstrom von Ca²⁺-Ionen führt schließlich zur Depolarisation einzelner Zellen. Aufgrund ihrer Hyperexzitabilität werden die umliegenden Nervenzellen schnell rekrutiert. So kommt es schließlich zu synchronen Entladungen ganzer Neuronenverbände, die sich als anfallsartige Ereignisse im Schnittpräparat ausbreiten.

Die für das Auftreten epileptischer Aktivität erforderliche Mindestdauer der Auswaschphase entsprach in den Kontrollgruppen dieser Studie mit 30 bis 45 min den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten im Niedrig-Mg²⁺-Modell (Holtkamp et al., 2003; Buchheim et al., 2000; Buchheim et al., 1999). In einer anderen Studie lag der Wert mit durchschnittlich 50 – 60 min etwas höher (Schmitz et al., 1997). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass im Gegensatz zu den anderen Arbeiten ausschließlich Präparate von weiblichen Tieren verwendet wurden, die möglicherweise grundsätzlich eine größere Suszeptibilität für epileptische Anfälle aufweisen als männliche Tiere. Hierfür sprechen die Ergebnisse einer Studie, in der gezeigt wurde, dass bei weiblichen Ratten nach intraventrikulärer Applikation des Chemokonvulsivums N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) signifikant weniger und signifikant kürzere Anfälle auftreten als bei männlichen Tieren (Standley et al., 1995). Geschlechtsspezifische Unterschiede traten auch unter Verwendung des GABA_A-Antagonisten Picrotoxin zur Induktion epileptischer Aktivität auf. Bei niedriger Dosierung zeigten die weiblichen Tiere, bei hoher Dosierung die männlichen Tiere

eine größere Bereitschaft für epileptische Anfälle (Thomas, 1990). Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass die Anfälligkeit des Hirngewebes für epileptische Aktivität durch den Hormonstoffwechsel beeinflusst wird. Es ist denkbar, dass auch andere Parameter einen Einfluss auf die Dauer der Auswaschphase bis zum Auftreten epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell haben, zum Beispiel das Lebensalter. Interessanterweise ergab der Vergleich von adulten und senilen Tieren diesbezüglich jedoch keine Unterschiede (Holtkamp et al., 2003).

Vier Wochen nach elektrisch induziertem Status epilepticus war die Latenz vom Beginn der Auswaschphase bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität in der vorliegenden Studie sowohl im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen als auch im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt der SSSE-Gruppe signifikant verkürzt. Diese erleichterte Aktivierbarkeit des Hirngewebes blieb bis acht Wochen nach SSSE bestehen. In einer vorangegangenen Studie, in der kombinierte Hirnschnitte von Ratten nach Kindling *in vivo* im Niedrig-Mg²⁺-Modell analysiert wurden, ergab sich im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikante Verkürzung der Auswaschphase bis zum Auftreten epileptischer Aktivität (Behr et al., 1996). Der Grund für dieses abweichende Ergebnis könnte sein, dass beim Kindling im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit kein Status epilepticus, sondern fokale Anfälle induziert werden (siehe 5.1.3).

Im scheinbaren Gegensatz zu den bisher beschriebenen Hinweisen für eine gesteigerte Erregbarkeit steht die signifikante Abnahme der Amplitude des Feldpotenzials in TE und EC vier und acht Wochen nach SSSE. Die Verkleinerung der Änderung dieses Summenpotentials lässt möglicherweise mit einem neuronalen Zelluntergang diesen Regionen erklären, wie er in einem vergleichbaren Modell histologisch nachgewiesen wurde (Hsieh, 1999).

5.2.2 Mögliche Grundlagen der gesteigerten Exzitabilität

Die bis acht Wochen nach elektrisch induziertem Status epilepticus anhaltende Latenzverkürzung bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell wurde als Hinweis für eine chronische Exzitabilitätssteigerung des Hirngewebes gewertet. Mögliche Ursachen dieser Hyperexzitabilität sollen im Folgenden vorgestellt werden.

5.2.2.1 Zunahme der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitiation

Da die Generierung anfallsartiger Ereignisse im Niedrig-Mg²⁺-Modell auf der Entblockung von Ionenkanälen der exzitatorischen NMDA-Rezeptoren beruht, liegt es nahe, dass auch die beobachtete Latenzverkürzung auf eine Veränderung auf Ebene dieser Rezeptoren, also auf eine Erhöhung der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitabilität, zurückzuführen ist.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse intra- und extrazellulärer Messungen in oberflächlichen (Bear et al., 1996) und tiefen (Fountain et al., 1998) Schichten des entorhinalen Cortex von Ratten ein bis sieben Monate nach elektrisch induziertem Status epilepticus unterstützt. Bei der intrazellulären Ableitung fiel auf, dass in Präparaten dieser Tiere die Applikation von Einzelreizen zur Induktion depolarisierender Ereignisse mit aufgelagerten multiplen Aktionspotentialen ausreicht, was auf eine gesteigerte Erregbarkeit der Zellen hindeutet. Für Ruhemembranpotenzial und Eingangswiderstand der Neurone ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass Veränderungen intrinsischer Eigenschaften der Zellen ursächlich unwahrscheinlich erscheinen. Der innerhalb derselben Studie durchgeführte Vergleich intra- und extrazellulärer Ableitungen von Neuronen im entorhinalen Cortex ergab, dass durch die Stimulation von Afferenzen mehr Aktionspotentiale induziert werden als durch die direkte Stimulation der Einzelzellen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der Hyperexzitabilität vorwiegend synaptische Mechanismen zugrunde liegen. Die epileptischen Reizantworten konnten durch Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten 2-Amino-5-Phosphovalerat (APV) zumindest teilweise unterdrückt werden, was darauf hindeutet, dass diese Hyperexzitabilität unter anderem NMDA-Rezeptor-vermittelt ist. Als Grundlage dieses Phänomens kommen zwei Mechanismen in Betracht: 1) eine gesteigerte Expression von NMDA-Rezeptoren nach Status epilepticus oder 2) eine gesteigerte Aktivierung vorbestehender NMDA-Rezeptoren nach Status epilepticus.

5.2.2.2 Abnahme inhibitorischer Einflüsse

Eine Beeinträchtigung der Inhibition nach Status epilepticus könnte ebenfalls die Ursache für das vorzeitige Auftreten simultaner Entladungen in parahippocampalen Cortexarealen im Niedrig-Mg²⁺-Modell sein. Im Neocortex des Meer-

schweinchens führte die kontrollierte Abschwächung inhibitorischer Einflüsse mittels GABA_A-Blockade zum Auftreten paroxysmaler Feldpotenziale als Ausdruck einer überwiegenden Exzitabilität (Connors, 1984). In den zuvor erwähnten Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Lothman wurde neben einer gesteigerten NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitabilität der Neurone ebenfalls eine Verminderung inhibitorischer Einflüsse im entorhinalen Cortex als Folge des elektrisch induzierten Status epilepticus registriert (Fountain et al., 1998; Bear et al., 1996). Intrazelluläre Ableitungen in dieser Region ergaben eine deutliche Abnahme bis hin zum kompletten Verlust inhibitorischer postsynaptischer Potenziale (IPSP).

5.3 Folgen der elektrischen Stimulation

In der vorliegenden Studie wurden neben der Untersuchungsgruppe zwei Kontrollgruppen analysiert. Den Elektroden-Kontrollen wurden die Elektroden ohne anschließende Stimulation implantiert, um bei der Ergebnisauswertung mögliche Folgen der Operation und des Verweilens der Implantate berücksichtigen zu können. Im Gegensatz zu vergleichbaren Arbeiten wurden in dieser Studie erstmals zusätzlich Stimations-Kontrollen gebildet, die unter Barbituratnarkose stimuliert wurden und somit keinen selbsterhaltenden Status epilepticus entwickeln konnten. Auf diese Weise konnte zwischen Folgen der zweistündigen Belastung des Hirngewebes durch die Stimulation und den Folgen des Status epilepticus unterschieden werden. Durch dieses Vorgehen sollte die Überbewertung von Folgen der Stimulation als Folgen des Status epilepticus vermieden und eine bessere Charakterisierung des elektrischen Statusmodells erreicht werden. In vorangegangenen Studien wurden zum Teil diejenigen Tiere als Stimationskontrollen verwendet, bei denen die elektrische Stimulation erfolglos blieb (Mathern et al., 1997; Wasterlain et al., 1996). Dieser Ansatz erscheint deshalb problematisch, weil die Gründe für das Scheitern der Induktion des Status epilepticus bei den betroffenen Tieren unklar bleiben.

Vereinzelt ergaben sich zwischen den beiden Kontrollgruppen tatsächlich signifikante Unterschiede bezüglich der beobachteten funktionellen Veränderungen des Hirngewebes. So deutet das auffällige räumliche Verhalten der epileptischen Aktivität in der Vier-Wochen-Gruppe auf temporäre funktionelle Folgen der alleinigen

Stimulation hin: Großflächiger Ursprung und diskontinuierliche Ausbreitung traten zu diesem Zeitpunkt bei den Stimulationen-Kontrollen signifikant häufiger auf als bei den Elektroden-Kontrollen. Allerdings wurden diese Unterschiede zu den anderen Untersuchungszeitpunkten nicht beobachtet. Die Dauer des Mg^{2+} -Entzuges bis zum Auftreten anfallsartiger Ereignisse als Parameter für die Exzitabilität des Hirngewebes war zu allen Untersuchungszeitpunkten zwischen den Kontrollgruppen gut vergleichbar. Ein autonomer Schrittmacher im Gyrus dentatus wurde nach alleiniger Implantation oder Stimulation zu keinem Zeitpunkt gesehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass im elektrischen Modell des Status epilepticus auch die elektrische Stimulation zu funktionellen Veränderungen des Hirngewebes beitragen kann. Das Ausmaß dieser funktionellen Folgen ist im Vergleich zu den Folgen des Status epilepticus deutlich geringer. Dies zeigt, dass das elektrische Modell geeignet ist, um die Auswirkungen eines Status epilepticus zu analysieren.

5.4 Gesteigerte Synchronizität nach Status epilepticus

5.4.1 Ursprung

Der Ursprungsort epileptischer Aktivität entspricht der Lokalisation der Neuronenpopulation, die zu Beginn simultan depolarisiert. Ausgehend von diesem umschriebenen Areal werden umliegende Neurone rekrutiert. In der vorliegenden Studie wurde der Ursprungsort anfallsartiger Ereignisse anhand intrinsischer optischer Signalveränderungen identifiziert. Er wurde als der Bereich des Hirnschnittes definiert, in dem die erste Änderung der Lichttransmission auftritt. Dieser Ansatz wird durch die Ergebnisse der Arbeit nahe gelegt, in der die zeitliche Korrelation zwischen dem Auftreten epileptischer Aktivität und der Änderung des intrinsischen optischen Signals im Niedrig- Mg^{2+} -Modell untersucht wurde (Weissinger et al., 2000). Dabei wurde gezeigt, dass in unmittelbarer Umgebung der Messelektrode ohne signifikante Latenz zum elektrographisch registrierten Abfall des Feldpotenzials eine Änderung der Lichtdurchlässigkeit des Hirngewebes auftritt.

5.4.1.1 Lokalisation des Ursprungs

Bezüglich der Lokalisation des Ursprungsortes ist zunächst hervorzuheben,

dass im Verlauf nach Status epilepticus zunehmend eine simultane Aktivierung mehrerer Regionen beobachtet wurde (Acht Wochen nach SSSE bei 46,7 % der Ereignisse), wodurch keine Zuordnung des Ursprungsortes zu einer einzelnen anatomischen Region mehr möglich war (siehe 5.4.1.2).

Betrachtet man allerdings die Gesamtheit der anfallsartigen Ereignisse mit identifizierbarem fokalem Ursprung aus allen Gruppen und zu allen Zeitpunkten, so lag dieser in 81,3 % der Fälle im entorhinalen Cortex. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen vorangegangener Studien an kombinierten Hirnschnittpräparaten der Ratte im Niedrig-Mg²⁺-Modell überein (Holtkamp et al., 2003; Buchheim et al., 2000; Meierkord et al., 1997).

Mögliche Ursachen für die Bevorzugung dieser Region als Ursprungsort im Niedrig-Mg²⁺-Modell lassen sich aus den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie ableiten: Intrazelluläre Messungen spontaner exzitatorischer postsynaptischer Potenziale (sEPSP) haben Hinweise dafür geliefert, dass sich die Neurone im entorhinalen Cortex in einem ständigen Erregungszustand befinden (Berretta und Jones, 1996). Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass dieser Erregungszustand auf der Existenz präsynaptischer NMDA-Rezeptoren in dieser Region beruht, deren Aktivierung die kontinuierliche Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat bewirkt. Demnach würde die Schwelle für die Generierung epileptischer Aktivität während des Mg²⁺-Entzuges im entorhinalen Cortex sowohl direkt über die Aktivierung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren, als auch indirekt über die gesteigerte Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt nach Entblockung präsynaptischer NMDA-Rezeptoren abgesenkt werden.

In einer weiteren Studie wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt, dass die durch Blockade der NMDA-Rezeptoren potenziell neuroprotektive Substanz 7-C1-KYNA im entorhinalen Cortex des Rattenhirns wirkungslos ist (Wu et al., 2002). *In vivo* erfolgte die Applikation der Substanz (bzw. der Vorstufe 4-C1-KYN, da 7-C1-KYNA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann) in Verbindung mit dem Chemokonvulsivum Kainsäure, einem hochpotenten Glutamatagonisten (Treiman, 1998). Die durchschnittliche Dauer des induzierten Status epilepticus verkürzte sich durch die Substanz gegenüber der Kontrollgruppe um 43 %. Die anschließende histologische Untersuchung der Gehirne ergab im Vergleich zu den Kon-

trollen ein deutlich geringeres Ausmaß der Läsionen in piriformem Cortex und CA1-Region, der Schaden im entorhinalen Cortex entsprach hingegen dem für das Modell charakteristischen Muster.

Die *in vitro*-Analyse an Hirnschnittpräparaten in derselben Studie erbrachte ebenfalls Hinweise für eine im Vergleich zu anderen limbischen Strukturen hohe Suszeptibilität der Regio entorhinalis für epileptische Aktivität: Während die durch Mg^{2+} -Entzug induzierte epileptische Aktivität im Hippocampus bereits durch Applikation niedriger Dosen 7-C1-KYNA unterdrückt werden konnte, bestand sie im entorhinalen Cortex fort.

Eine mögliche Erklärung für diese regionale Besonderheit ist die Heterogenität der NMDA-Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass die Kombination der Untereinheiten eines NMDA-Rezeptors entscheidend für die Dauer der vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Potenziale und die Stärke des Mg^{2+} -Blockes im zugehörigen Ionenkanal ist (Monyer et al., 1994). Interessanterweise hat eine weitere experimentelle Studie ergeben, dass die Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zwischen den verschiedenen corticalen Regionen des Rattenhirnes variiert (Sun et al., 2000). Es ist denkbar, dass der im entorhinalen Cortex dominierende Rezeptor-Subtyp im Vergleich zu den Rezeptoren der anderen Regionen schneller auf einen Abfall der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration anspricht und die Generierung epileptischer Aktivität in dieser Region somit ebenfalls beschleunigt ist.

5.4.1.2 Größe des Ursprungs

Für die räumliche Ausdehnung des Ursprungsortes der anfallsartigen Ereignisse ergaben sich in der vorliegenden Arbeit zwischen den Untersuchungsgruppen signifikante Unterschiede. Die Präparate der Kontrollgruppen zeigten überwiegend einen kleinen umschriebenen Aktivitätsbeginn. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Ergebnissen für den Ursprung anfallsartiger Ereignisse wie er in vergleichbaren Präparaten von juvenilen (Weissinger et al., 2000), adulten (Buchheim et al., 2000) und senilen (Holtkamp et al., 2003) Tieren durch die Analyse intrinsischer optischer Signale im Niedrig- Mg^{2+} -Modell in allen Fällen registriert wurde.

Im Gegensatz hierzu fand sich im Verlauf nach Status epilepticus eine signifikante

Zunahme anfallsartiger Ereignisse mit großflächigem Ursprungsort, der zum Teil mehrere anatomische Regionen des Schnittes (multiregionaler Ursprung), mindestens aber 80 % einer Region einbezog. Auch bei Aufzeichnungen mit der im verwendeten Versuchsaufbau höchsten zeitlichen Auflösung von 20 Bildern pro Sekunde, welche die Erfassung von Geschwindigkeiten bis ca. 50 mm/s ermöglicht, konnte innerhalb dieser Ursprungsorte zu keinem Zeitpunkt eine Ausbreitungsfront identifiziert werden.

Für den großflächigen Ursprung gibt es also zwei mögliche Grundlagen: 1) die simultane Aktivierung weitläufiger neuronaler Netzwerke oder 2) ein umschriebener Aktivitätsbeginn mit initial hoher Ausbreitungsgeschwindigkeit (> 50 mm/s). Die zweite Möglichkeit erscheint aufgrund der in diesem Modell bisher beobachteten deutlich niedrigeren Ausbreitungsgeschwindigkeiten (siehe 5.4.2) aber eher unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass dieses Phänomen in der Acht-Wochen-Gruppe der vorliegenden Studie auch bei 17,9 % der Elektroden-Kontrollen gesehen wurde, legt die Vermutung nahe, dass der operative Eingriff und das Verweilen der Elektroden zu Irritationen des Hirngewebes geführt haben.

In Schnittpräparaten des Neocortex von naiven Meerschweinchen wurden ähnlich ausgedehnte Ursprungsorte beschrieben (Wong und Prince, 1990). In dieser Studie wurde bei 50 % der Präparate stets ein annähernd simultaner Abfall des Feldpotenzials an vier über das gesamte Präparat verteilten Messelektroden registriert. Die restlichen Hirnschnitte entwickelten zunächst Ereignisse mit fokalem Ursprungsort, im Verlauf des Mg^{2+} -Entzuges wurde jedoch bei sämtlichen Präparaten die ausgedehnte Form des Ursprungs beobachtet. Diese Art des Aktivitätsbeginns wurde von den Autoren als „generalisiert“ bezeichnet, obwohl eine Latenz von 10 bis 200 ms zwischen den Elektroden auf einen fokalen Ursprung mit sehr schneller Aktivitätsausbreitung hindeutete. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beschriebenen Phänomen um die für das Niedrig- Mg^{2+} -Modell charakteristische Spätaktivität handelt (siehe 1.2.1.2). Das im Gegensatz zur Anwendung in kombinierten Hippocampus-entorhinaler Cortex-Hirnschnittpräparaten sofortige Auftreten könnte auf eine höhere Empfindlichkeit neocorticaler Regionen für diese Aktivität zurückzuführen sein.

Klinische Studien, in denen die räumliche Ausdehnung des Ursprungsortes epileptischer Anfälle im Rahmen der präoperativen Diagnostik vor epilepsiechirurgischen Eingriffen analysiert wurde, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Größe des Ursprungsortes epileptischer Anfälle und der postoperativen Prognose. Lee und Mitarbeiter konnten keine signifikante Relation zwischen der Größe des Ursprungsortes epileptischer Anfälle und postoperativer Anfallsfreiheit nach chirurgischer Intervention zeigen (Lee et al., 2000). Eine andere Studie ergab hingegen, dass ein fokaler bzw. regional begrenzter Anfallsbeginn signifikant häufiger mit postoperativer Anfallsfreiheit assoziiert ist als ein größeres Ursprungsgebiet, das gleichzeitig anteriore und posteriore Anteile des Temporallappens einbezieht (Jung et al., 1999). Eine weitere Studie ergab ebenfalls, dass Patienten mit kleinem umschriebenem Ursprungsort der Anfallsaktivität im EEG eine sehr gute Prognose bezüglich der postoperativen Anfallsfreiheit nach Temporallappenresektion aufweisen (Park et al., 1996). In einer anderen Studie wurde die Zelldichte in Resektaten von Patienten nach temporaler Lobektomie bestimmt und mit dem EEG verglichen, das präoperativ mit Tiefenelektroden abgeleitet worden war. Dieser Vergleich ergab, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe der zu Anfallsbeginn veränderten Region im EEG und dem Ausmaß der neuronalen Schädigung im reseztierten Hirngewebe besteht (Babb et al., 1984b).

Wie bereits erwähnt, kann der optisch registrierte großflächige Ursprung sowohl Ausdruck einer zeitgleichen Aktivierung weitläufiger Neuronenverbände als auch einer sehr schnellen Rekrutierung von Nervenzellen sein, die von einem umschriebenen Fokus ausgeht. Beide Möglichkeiten sprechen für eine erleichterte Kommunikation zwischen den Nervenzellen. Der großflächige Ursprung wurde somit als Hinweis für eine im Vergleich zu den Kontrolltieren gesteigerte Synchronizität der Neuronenpopulationen nach experimentellem Status epilepticus angesehen.

5.4.2 Ausbreitung

Für die Ausbreitung neuronaler Aktivität sind verschiedene Mechanismen der Erregungsfortleitung von Bedeutung. Die synaptische Übertragung stellt unter

Normalbedingungen den entscheidenden Kommunikationsmechanismus der Nervenzellen dar. Hierbei setzt das präsynaptische Neuron Transmitter frei, die postsynaptisch an Rezeptoren binden und so den Erregungszustand des nachgeschalteten Neurons beeinflussen. Abhängig vom freigesetzten Transmitter kommt es zu einer exzitatorischen (vorwiegend Glutamat) oder inhibitorischen (vorwiegend GABA) Wirkung. Während inhibitorische Transmitterstoffe eine Hyperpolarisation des Membranpotentials bewirken, führen exzitatorische Neurotransmitter zur Depolarisation und ggf. zur Generierung eines Aktionspotentials. Der Nervenleitgeschwindigkeit entsprechend, die in erster Linie vom Myelinisierungsgrad des Neurons abhängt, wird das Aktionspotential axonal fortgeleitet.

Es wurde gezeigt, dass epileptische Burst-Aktivität sich über axonale Fortleitung und synaptische Übertragung mit Geschwindigkeiten von bis zu 1800 mm/s ausbreiten kann (Holsheimer und Lopes da Silva, 1989). Im Niedrig-Mg²⁺-Modell fanden sich in kombinierten Schnittpräparaten unbehandelter adulter Tiere mit maximal 0,95 mm/s (im temporalen Cortex) deutlich niedrigere Ausbreitungsgeschwindigkeiten für die anfallsartigen Ereignisse (Holtkamp et al., 2003). Diese waren vergleichbar mit Geschwindigkeitsmessungen im Niedrig-Ca²⁺-Modell (durchschnittlich 1,7 mm/s), in dem die synaptische Übertragung blockiert ist (Konnerth et al., 1986). Dies spricht dafür, dass die Ausbreitung epileptischer Aktivität im Niedrig-Mg²⁺-Modell bei naiven Tieren in erster Linie auf nicht-synaptischen Mechanismen beruht.

Beispielsweise entstehen durch den Ionenfluß zwischen Intra- und Extrazellulärraum des Neurons lokale elektrische Felder, die Neurone in der unmittelbaren Nachbarschaft depolarisieren können (ephaptische Feldeffekte, zur Übersicht: Jefferys, 1995). Eine wichtige Rolle kommt dem extrazellulären Kalium zu, wie in Untersuchungen der CA1-Region im Niedrig-Ca²⁺-Modell gezeigt wurde: Die Reduktion des extrazellulären Kaliums führte zur Abnahme der Frequenz der anfallsartigen Ereignisse und umgekehrt (Yaari et al., 1986).

5.4.2.1 Diskontinuierliche Ausbreitung

Das Ausbreitungsmuster anfallsartiger Ereignisse im Niedrig-Mg²⁺-Modell wurde in verschiedenen Arbeiten mit Hilfe der optischen Signaländerung analysiert und es zeigte sich stets eine kontinuierliche Wanderung der Aktivitätsfront entlang

benachbarter Strukturen des Hirnschnittes (Holtkamp et al., 2003; Buchheim et al., 2000; Meierkord et al., 1997). In der vorliegenden Studie traten im Verlauf nach Status epilepticus zunehmend anfallsartige Ereignisse auf, deren Ausbreitungsmuster von dem bekannten Bild abwich. Hierzu zählten einerseits anfallsartige Ereignisse mit gleichzeitiger Aktivierung sämtlicher Regionen des Präparates, so dass keine weitere Ausbreitung mehr möglich war. Außerdem traten vermehrt Ereignisse auf, die dadurch gekennzeichnet waren, dass die epileptische Aktivität auf entfernte Regionen übergriff, von wo sie teilweise über die ausgelassenen Regionen in Richtung Ursprungsort wanderte. Bei einigen Ereignissen kam es auch von einem umschriebenen Ursprungsort aus zur flächigen Aktivierung entfernter Regionen. Für Propagationsmuster dieser Art wurde die Bezeichnung „diskontinuierliche Ausbreitung“ als Oberbegriff gewählt.

Obwohl vier Wochen nach Stimulation in Barbituratnarkose bei 15 % der in der entsprechenden Gruppe aufgetretenen Ereignisse eine diskontinuierliche Ausbreitung beobachtet wurde, bot sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Ereignisse in den Kontrollgruppen der vorliegenden Arbeit das aus vorangegangenen Studien bekannte Bild einer kontinuierlich wandernden Aktivitätsfront.

Ausbreitungsmuster, die der diskontinuierlichen Ausbreitung ähneln, wurden bei der Analyse epileptischer Entladungen in Neocortex-Schnitten des Meerschweinchens beschrieben (Wadman und Gutnick, 1993). Unter GABA_A-Blockade wurden hier durch elektrische Stimulation niedriger Intensität paroxysmale Feldpotenziale ausgelöst. Die Propagation der von zwei Stimulationsorten ausgehenden Feldpotenziale wurde mittels einer fixierten und einer mobilen Ableitelektrode elektrographisch registriert. Hier zeigte sich z. T. ebenfalls eine diskontinuierliche Ausbreitung der Feldpotenziale im Hirnschnitt: Sie sprangen auf entfernte Regionen über und wanderten mitunter von dort auf den Stimulationsort zu.

Ein klinisches Korrelat zur diskontinuierlichen Ausbreitung wurde in einer klinischen Studie gefunden (Kutsy et al., 1999). Bei der intracraniellen EEG-Ableitung vor epilepsiechirurgischen Eingriffen fiel auf, dass die epileptische Aktivität teilweise unter Umgehung angrenzender Areale auf entfernte Regionen übergriff. Patienten mit einem derartig uneinheitlichen Ausbreitungsmuster hatten eine signifikant schlechtere postoperative Prognose als Patienten mit kontinuierlicher Aktivitäts-

ausbreitung. Die Art der Ausbreitung epileptischer Aktivität könnte demnach einen Parameter für die Beurteilung des Schweregrades der pathologischen Veränderung des Hirngewebes in einem chronisch epileptischen Zustand darstellen.

5.4.3 Mögliche Grundlagen der gesteigerten Synchronizität

Vermutlich haben großflächiger Ursprungsort und diskontinuierliche Ausbreitung eine gemeinsame Grundlage: In beiden Fällen scheint die Synchronisation der Neurone im Vergleich zu den bekannten Formen von Ursprung und Ausbreitung im Niedrig-Mg²⁺-Modell deutlich erhöht zu sein. Obgleich in einigen Fällen auch Hippocampus und Gyrus dentatus an großflächigem (multiregionalem) Ursprung und diskontinuierlicher Ausbreitung beteiligt waren, wurden diese Phänomene hauptsächlich in entorhinalem und temporalem Cortex beobachtet. Das deutet auf eine erhöhte Bereitschaft dieser Regionen für synchrone Entladungen nach Status epilepticus hin. Als Grundlage einer derartigen Synchronizitätssteigerung kommen verschiedene funktionelle und morphologische Veränderungen in Betracht, die im Folgenden diskutiert werden.

5.4.3.1 *Disinhibition*

Die Verminderung inhibitorischer Einflüsse kommt ursächlich für eine gesteigerte Synchronizität in Betracht. Nach elektrisch induziertem Status epilepticus bei der Ratte hat die Arbeitsgruppe von Lothman in den oberflächlichen (Bear et al., 1996) und tiefen (Fountain et al., 1998) Schichten des entorhinalen Cortex neben der bereits erwähnten Steigerung der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitabilität auch eine Reduktion der GABAergen Inhibition registriert. Weitere Untersuchungen führten die Autoren zu der Vermutung, dass dieser Disinhibition nicht der selektive Untergang, sondern die Deafferenzierung inhibitorischer Interneurone zugrunde liegt. Sie schlossen jedoch auch eine gesteigerte gegenseitige Inhibition der Interneurone als Ursache der Disinhibition nicht aus. Vergleichbaren Ergebnissen für die oberflächlichen Schichten des entorhinalen Cortex der Ratte lieferten Untersuchungen im Pilocarpin-Modell des Status epilepticus (Kobayashi et al., 2003). Bereits erwähnt wurde die Arbeit, in der durch GABA_A-Blockade im Neocortex von naiven Meerschweinchen ein Zustand der Disinhibition erzeugt wurde und daraufhin diskontinuierliche Ausbreitungsmuster der induzierten paroxysmalen

Feldpotenziale auftraten (Wadman und Gutnick, 1993).

5.4.3.2 *Gesteigerte Inhibition*

Neben der Disinhibition ist auch die Zunahme inhibitorischer Einflüsse als Ursache der gesteigerten Synchronizität in den hippocampalen und parahippocampalen Strukturen denkbar. In der CA1-Region konnte gezeigt werden, dass der synaptische Einfluss eines einzelnen Interneurons die Entladungen einer großen Population von Prinzipalzellen synchronisieren kann (Cobb et al., 1995). Dieser Verdacht wurde bereits in einer anderen Studie nach der morphologischen Analyse der räumlichen Ausdehnung inhibitorischer Interneurone in der CA1-Region des Hippocampus der Ratte geäußert (Li et al., 1992). Am Beispiel einer „Chandelier-Zelle“, einer Untergruppe inhibitorischer Interneurone, konnten die Autoren die synaptische Verbindung mit mehr als 1200 Pyramidenzellen nachweisen. Unterstützt wird die Vermutung auch durch das Ergebnis einer weiteren Studie, in der gezeigt wurde, dass eine andere Untergruppe der inhibitorischen Interneurone, die Korbzellen (engl. basket cells), in der CA1-Region mit mehr als 1500 Pyramidenzellen über Synapsen verbunden sind (Sik et al., 1995).

Während sich die erwähnten Studien allesamt auf die CA1-Region beziehen, zeigen die Ergebnisse einer weiteren Studie, dass auch im entorhinalen Cortex weitläufige Interneurone existieren (Jones & Buhl, 1993). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass es sich um GABAerge inhibitorische Interneurone handelt und bezeichneten sie in Anlehnung an die Korbzellen des Hippocampus als „korbartige“ Interneurone (engl. basket-like interneurons). Auch für die Chandelier-Zellen des Hippocampus wurde ein morphologisches Korrelat im entorhinalen Cortex der Ratte gefunden (Soriano et al., 1993).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die morphologische Analyse der Regio entorhinalis in einer weiteren Studie (Wouterlood et al., 1995). Die Autoren fanden eine Vielzahl von Interneuron-Typen mit einer hohen Variabilität bezüglich der Morphologie, unter anderem auch korbartige Interneurone und den Chandelier-Zellen ähnliche Neurone, die eine Vielzahl synaptischer Verbindungen zu den Prinzipalzellen der Region aufweisen.

Die vorgestellten Ergebnisse vorangegangener Arbeiten legen nahe, dass mor-

phologische oder funktionelle Veränderungen des ausgeprägten Netzwerkes inhibitorischer Interneurone sowohl in hippocampalen als auch in parahippocampalen Strukturen die Grundlage der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Synchronitätssteigerung darstellen könnten.

5.4.3.3 Gap junctions

Als Gap junctions bezeichnet man synaptische Verbindungen, durch die der Strom direkt von der präsynaptischen in die postsynaptische Zelle fließt. Spezialisierte Transmembranproteine (Connexone) bilden Kanäle zwischen dem Zytoplasma der kommunizierenden Zellen. Da sich epileptische Aktivität in Neuronenverbänden, die über Gap junctions synchronisiert sind, praktisch verzögerungsfrei ausbreiten kann (Kandel und Siegelbaum, 1996), ist die Zunahme dieser elektrischen Synapsen nach Status epilepticus als Erklärung insbesondere für den großflächigen Ursprung denkbar. Es gibt Hinweise dafür, dass Gap junctions als synchronisierender Mechanismus für die Generierung und Aufrechterhaltung epileptischer Aktivität von entscheidender Bedeutung sind (zur Übersicht: Carlen et al., 2000). Im Hoch-K⁺-Niedrig-Ca²⁺-Modell wurde gezeigt, dass die auftretende spontane Burst-Aktivität in der CA3-Region durch selektive Blockade der Gap junctions antagonisiert werden kann (Margeanu und Klitgaard, 2001). Auch klinische Studien liefern Hinweise für die Bedeutung von Gap junctions für die Empfindlichkeit des neuronalen Netzwerkes gegenüber epileptischer Aktivität: In humanem Hirngewebe, das im Rahmen der Temporallappenresektion bei Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie entnommen wurde, fand sich ein erhöhter Anteil der mRNA, die für das entscheidende Protein (Connexin) der Gap junctions codiert (Naus et al., 1991). Dieses Ergebnis konnte in einer vergleichbaren Studie jedoch nicht bestätigt werden (Elisevich et al., 1997), so dass die Frage nach der Bedeutung von Gap junctions für das Ausmaß der Synchronisation beim Menschen zunächst weiter ungeklärt bleibt.

5.4.3.4 Sprossung von Axonkollateralen der Prinzipalzellen

Als weitere mögliche Ursache der gesteigerten Erregbarkeit der Zellen im entorhinalen Cortex vermuten einige Autoren das Aussprossen aberranter Axonkollateralen exzitatorischer Prinzipalzellen und hieraus resultierende rekurrente Erregungskreisläufe (Fountain et al., 1998; Scharfman et al., 1998). Entsprechende

morphologische Veränderungen nach Status epilepticus wurden für die Moosfasern im Gyrus dentatus in zahlreichen Studien beobachtet (siehe 5.5.3.3). Das aberrante Aussprossen von Axonen nach Status epilepticus konnte in entorhinalen und temporalem Cortex bislang nicht nachgewiesen werden.

5.4.4 Perspektiven

Um die Bedeutung der beschriebenen Mechanismen für das veränderte räumliche Verhalten von Ursprung und Ausbreitung epileptischer Aktivität nach Status epilepticus näher zu definieren, wären weitere Untersuchungen sinnvoll. Beispielsweise könnte die Badapplikation verschiedener Pharmaka bei Auftreten von großflächigem Ursprungsort und diskontinuierlicher Ausbreitung Hinweise zu deren Grundlage liefern: Die Abnahme der Phänomene nach Applikation von Gap junction-Blockern würde auf eine ursächliche Bedeutung der Gap junctions hindeuten. Wenn die gesteigerte Synchronizität des Hirngewebes auf einer verminderten GABAergen Inhibition beruht, lässt sich ein entsprechender Effekt durch die Applikation von GABA-Agonisten bewirken. Durch die immunhistochemische Analyse des Hirngewebes von Tieren, bei denen ein großflächiger Ursprung oder eine diskontinuierliche Ausbreitung gesehen wurden, könnten etwaige morphologische Veränderungen spezifiziert werden. Entsprechende Analysen sind für die in Paraffin fixierten Anteile des Hirngewebes der in dieser Arbeit verwendeten Tiere vorgesehen.

Da sowohl ein stattgehabter Status epilepticus in der Anamnese (Clusmann et al., 2002) als auch ein großflächiger Ursprungsort (Jung et al., 1999) und die diskontinuierliche Ausbreitung (Kutsy et al., 1999) epileptischer Aktivität im EEG mit einer schlechten Prognose nach epilepsiechirurgischen Eingriffen assoziiert sind, wäre die Beantwortung der folgenden Fragen perspektivisch interessant: 1) Finden sich großflächiger Ursprung und diskontinuierliche Ausbreitung epileptischer Aktivität im präoperativen EEG signifikant häufiger bei Patienten, die in der Vorgeschichte einen Status epilepticus erlitten haben? 2) Wie viele Patienten mit einem Status epilepticus in der Vorgeschichte präsentieren sich präoperativ mit großflächigem Ursprung und diskontinuierlicher Ausbreitung im EEG? 3) Ist das gemeinsame Auftreten der Faktoren „Status epilepticus in der Vorgeschichte“ und „großflächiger

Ursprung im EEG“ oder „diskontinuierliche Ausbreitung im EEG“ mit einer signifikant schlechteren postoperativen Prognose assoziiert als das Auftreten nur eines Faktors?

Wenn sich herausstellt, dass großflächiger Ursprung und diskontinuierliche Ausbreitung der epileptischen Aktivität nur Ausdruck eines stattgehabten Status epilepticus sind, ergäben sich hieraus keine Konsequenzen. Ein synergistischer Effekt würde hingegen dazu führen, dass die Indikation für einen epilepsiechirurgischen Eingriff bei Patienten mit positiver Status-Anamnese und großflächigem Ursprung der epileptischen Aktivität im EEG nach besonders strengen Kriterien gestellt werden sollte.

5.5 Epileptische Aktivität im Gyrus dentatus

5.5.1 Invasion des Hippocampus

In der vorliegenden Studie traten in allen Gruppen vereinzelt anfallsartige Ereignisse auf, die sich über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus und weiter in den Hippocampus ausbreiteten. Hierbei ergaben sich weder zwischen Tieren nach SSSE und Kontrollen, noch im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus oder zwischen den Hemisphären signifikante Unterschiede.

Die Invasion des Hippocampus über Tractus perforans und Gyrus dentatus wurde in vorangegangenen Studien bei der Analyse anfallsartiger Ereignisse nach Mg^{2+} -Entzug in kombinierten Hirnschnitten von naiven Tieren nie beschrieben (Behr et al., 1996; Heinemann et al., 1992; Walther et al., 1986). Auch die Messung der optischen Signaländerung in einem vergleichbaren Versuchsaufbau ergab keine Hinweise für das Einwandern der epileptischen Aktivität in den Hippocampus (Buchheim et al., 2000). Aufgrund entsprechender Beobachtungen diskutieren einige Autoren, ob eine Funktion des Gyrus dentatus darin besteht, als Filter die Ausbreitung epileptischer Aktivität in den Hippocampus zu verhindern (Lothman et al., 1992; Heinemann et al., 1992). Bei naiven juvenilen Tieren wurde eine Invasion über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus und weiter in den Hippocampus unter Verwendung der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messmethoden zwar gesehen, im Verlauf der Ontogenese (ab P14) wurde dieses Ausbreitungsmuster jedoch nicht mehr beobachtet (Weissinger et al., 2000). In einer an-

deren Studie kam es nach Kindling *in vivo* zur Propagation der anfallsartigen Ereignisse im Niedrig-Mg²⁺-Modell *in vitro* über den Gyrus dentatus hinaus bis den Hippocampus (Behr et al., 1996). Das bezüglich der Invasion des Gyrus dentatus (im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen) unterschiedliche Verhalten der Aktivität nach Kindling und nach elektrisch induziertem SSSE spricht dafür, dass es sich um ein modellspezifisches Phänomen handelt.

Eine mögliche Erklärung für die in allen Gruppen der vorliegenden Studie vereinzelt beobachtete Ausbreitung der epileptischen Aktivität über den Gyrus dentatus bis in den Hippocampus könnten Irritationen des Hirngewebes durch den operativen Eingriff und das Verweilen der Elektroden in der Dentatusregion sein. Hieraus resultierende Einblutungen und Narbenbildungen könnten in allen Gruppen gleichermaßen zu der beobachteten Einwanderung in den Gyrus dentatus beigetragen haben. Auch die aberrante Sprossung von Moosfasern wurde in Folge einer Läsion in der Region beobachtet, und zwar nicht nur ipsilateral, sondern auch zum Hilus des contralateralen Gyrus dentatus (Hoff, 1986). Diese Beobachtung könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Invasion epileptischer Gyrus dentatus und Hippocampus in der vorliegenden Arbeit auch in Schnitten der unoperierten linken Hemisphäre aufgetreten ist. In der zuvor erwähnten Studie von Behr und Mitarbeitern wurde bei der Analyse der Elektroden-Kontrollen eine Invasion der epileptischen Aktivität in den Hippocampus über den Gyrus dentatus nicht beobachtet (Behr, 1996). Für das Kindling wurde hier allerdings nur eine Elektrode in die Amygdala implantiert, d. h. mit räumlicher Distanz zum dann *in vitro* untersuchten kombinierten Hippocampus-entorhinaler Cortex-Präparat.

5.5.2 Autonomer Schrittmacher im Gyrus dentatus

Eine weitere, zuvor nie beschriebene Form epileptischer Aktivität fand sich acht Wochen nach Status epilepticus bei 50 % der untersuchten Präparate. Zeitlich und räumlich unabhängig von den anfallsartigen Ereignissen mit Ursprung im entorhinalen oder temporalen Cortex trat im Gyrus dentatus zusätzlich epileptische Aktivität auf, die sich nicht in angrenzende Regionen ausbreitete (siehe 4.2.6). Die Frequenz dieser autonomen Aktivität lag mit durchschnittlich 0,5 min⁻¹ im Vergleich zur durchschnittlichen Frequenz der außerhalb des Gyrus dentatus generierten

anfallsartigen Ereignisse ($2,18 \text{ min}^{-1}$) signifikant höher. Zur vorläufigen Einordnung wurde hier die Bezeichnung „autonomer Schrittmacher“ gewählt.

5.5.3 Mögliche Grundlagen der autonomen Aktivität im Gyrus dentatus

Das Auftreten dieses autonomen Schrittmachers im Gyrus dentatus deutet darauf hin, dass durch den elektrisch induzierten Status epilepticus ein Prozess initiiert wurde, der innerhalb von vier bis acht Wochen zu einer gesteigerten Anfälligkeit der Region für epileptische Aktivität geführt hat. Im Folgenden sollen einige Hypothesen zu möglichen Grundlagen dieses Prozesses vorgestellt werden.

5.5.3.1 *Disinhibition der Körnerzellen*

Eine mögliche Ursache für die gesteigerte Vulnerabilität des Gyrus dentatus nach Status epilepticus ist der Verlust inhibitorischer Einflüsse auf die Körnerzellen. Dieser Inhibitionsverlust wird von zahlreichen Autoren als Grundlage rekurrenter spontaner Anfälle angesehen: So wurde die hohe Inzidenz von Epilepsie bei der mongolischen Wüstenrennmaus mit einer derartigen Disinhibition der Körnerzellen des Gyrus dentatus in Zusammenhang gebracht. Anhand immunohistochemischer Untersuchungen *in vitro* wurde gezeigt, dass der Anteil GABAerger Interneurone im Gyrus dentatus bei den spontan epileptischen Wüstenrennmäusen bis zu 65 % größer ist als bei den anfallssfreien Tieren (Peterson und Ribak, 1987). Die von den Autoren aufgestellte Disinhibitionshypothese besagt, dass die gesteigerte gegenseitige Inhibition dieser im Übermaß vorhandenen GABAergen Interneurone der Disinhibition zugrunde liegt. In einem vergleichbaren Modell wurde während spontaner epileptischer Anfälle *in vivo* elektrophysiologisch eine reduzierte Inhibition im Gyrus dentatus registriert (Buckmaster et al., 2000). Daher postulierten die Autoren, dass eine Disinhibition der Körnerzellen in diesem Modell zwar nicht ausreichend für die Generierung, wohl aber bedeutend für die Aufrechterhaltung epileptischer Aktivität sein könnte.

Im Pilocarpin-Modell der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Körnerzellen in den nach Status epilepticus epileptischen Ratten auch interiktal weniger inhibitorische Impulse erhalten als in den Kontrollen (Kobayashi und Buckmaster, 2003). Dieses Phänomen wurde bereits Tage bis Wochen vor dem Auftreten spontaner rekurrenter Anfälle registriert, so dass auch hier die Disinhibition als alleinige Ursache der chronischen Epilepsie ausgeschlossen wurde.

Auch nach elektrischer Stimulation des Tractus perforans in der Ratte wurde eine Abnahme der GABAergen Inhibition im Gyrus dentatus beschrieben (Lothman et al., 1992). Parallel dazu wurde vor allem im Hilusbereich ein ausgedehnter Verlust von Interneuronen gesehen. Auf dieser Beobachtung, in Verbindung mit den Ergebnissen von Doppelpulsmessungen, die ebenfalls auf eine verminderte Inhibition der Körnerzellen hindeuteten, beruht die „dormant basket cell hypothesis“ (dt. Hypothese der schlafenden Korbzelle; Sloviter et al., 2003; Sloviter, 1991). Diese besagt, dass die Abnahme der Inhibition der Körnerzellen nach anhaltender afferenter Stimulation auf den Untergang inhibitorischer Interneurone und exzitatorischer Mooszellen im Hilusbereich zurückzuführen ist. Die inhibitorischen Interneurone der Körnerzellschicht (Korbzellen) erscheinen hingegen weniger empfindlich gegenüber epileptischer Aktivität. Aufgrund der untergegangenen Afferenzen über die Mooszellen sind die Korbzellen in ihrer Funktion jedoch stark beeinträchtigt. In einer vorangegangenen *in vitro*-Studie wurde gezeigt, dass diese Hypothese auch für die Pyramidenzellen der CA1-Region nach elektrisch induziertem Status epilepticus gültig ist. Parallel zur Applikation elektrischer Impulse wurde das resultierende inhibitorische postsynaptische Potenzial intrazellulär abgeleitet. Dabei zeigte sich, dass nur durch die direkte Stimulation der Korbzelle, nicht aber durch Stimulation ihrer Afferenzen, ein der Kontrollgruppe entsprechendes inhibitorisches Potenzial in der Pyramidenzelle induziert werden konnte (Bekenstein und Lothman, 1993).

Beobachtungen im Pilocarpin-Modell sprechen hingegen dafür, dass die Afferenzen der Korbzellen intakt bleiben und es durch die repetitive synaptische Aktivierung während des Status epilepticus lediglich zu einer transienten Abnahme des exzitatorischen Einflusses auf die Korbzellen kommt (Doherty und Dingledine, 2001). Demnach läge der Disinhibition im Gegensatz zur „Dormant Basket Cell“ Hypothese keine strukturelle, sondern eine funktionelle Ursache zugrunde.

Interessanterweise wurde bei der Analyse von chronisch epileptischem humanem Hirngewebe ebenfalls eine Disinhibition der Körnerzellen festgestellt (Williamson et al., 1999). Hierbei ergab die intrazelluläre Ableitung der Körnerzellen eine Reduktion der inhibitorischen postsynaptischen Potenziale sowohl bei monosynaptischer als auch bei polysynaptischer Stimulation. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Abnahme der inhibitorischen Einflüsse nicht ausschließlich auf die

verminderte Exzitation inhibitorischer Interneurone zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wurden Veränderungen an der Synapse zwischen Korb- und Körnerzelle und der Untergang inhibitorischer Interneurone vermutet.

Nach immunohistochemischen Untersuchungen im Pilocarpin-Modell wurde der Verdacht geäußert, dass die Disinhibition der Körnerzellen durchaus auf dem Untergang der Korbzellen selbst beruht (Fritschy et al., 1999). Nach elektrisch induziertem Status epilepticus wurde ein drastischen Rückgang der Korbzellpopulation beschrieben (Gorter et al., 2001). In diesem Zusammenhang wird allerdings auch die Möglichkeit diskutiert, dass dieses Ergebnis eher auf einer veränderten Immunreaktivität des Markers Parvalbumin nach Status epilepticus als auf dem Verlust der Korbzellen selbst beruht (Scotti et al., 1997). Bei der Analyse der CA1-Region spontan epileptischer mongolischer Wüstenrennmäuse konnten die Autoren durch die parallele Quantifizierung Parvalbumin-immunreaktiver und GABA-haltiger Neurone zeigen, dass der Parvalbumingehalt intakter GABAerger Interneurone abnimmt, sobald spontane epileptische Anfälle auftreten.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf, so registrierte Sloviter bereits im direkten Anschluss an die anhaltender elektrische Stimulation eine abgeschwächte Inhibition der Körnerzellen (Sloviter, 1991). Diese Veränderungen konnten ohne Progression noch 400 Tage später nachgewiesen werden. Auch in einer anderen Studie wurde die Abnahme der Inhibition bereits in den ersten ein bis zwei Tagen nach Status epilepticus registriert, der maximale Inhibitionsverlust wurde nach vier bis fünf Tagen erreicht (Doherty und Dingledine, 2001). Durchschnittlich 30 Tage nach dem Status epilepticus erreichten die inhibitorischen Einflüsse wieder das Ausgangsniveau.

Die Kinetik der gesteigerten Aktivierbarkeit des Gyrus dentatus in der vorliegenden Studie unterscheidet sich also vom zeitlichen Verlauf der Disinhibition der Körnerzellen in vorangegangenen Untersuchungen. Dem autonomen Schrittmacher im Gyrus dentatus, der acht Wochen nach Status epilepticus erstmals gesehen wurde, scheinen in erster Linie andere pathophysiologische Mechanismen zugrunde zu liegen.

5.5.3.2 Gesteigerte Inhibition der Körnerzellen

Eine weitere Veränderung der inhibitorischen Mechanismen des Gyrus dentatus nach Status epilepticus stellt die Sprossung von Axonkollateralen der überlebenden inhibitorischen Interneurone in die Molekularschicht dar. Nach elektrisch induziertem Status epilepticus in der Ratte wurden entsprechende Veränderungen immunhistochemisch nachgewiesen (Mathern et al., 1997). Auch in humanen Hippocampusresektaten konnte dieses Phänomen durch Quantifizierung der Glutamat-Decarboxylase-, Somatostatin- und Neuropeptid-Y-haltigen inhibitorischen Interneurone in der Molekularschicht des Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Mathern et al., 1995a). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei dieser morphologischen Veränderung um einen Kompensationsmechanismus handelt, der die reduzierte inhibitorische Einwirkung auf die Körnerzellen in Folge des Untergangs von Interneuronen ersetzt. Einige Autoren weisen jedoch daraufhin, dass inhibitorische Interneurone durch die Ausbildung zusätzlicher axonaler bzw. synaptischer Verbindungen auch direkt synchronisierend auf die Prinzipalzellen einwirken und somit selbst zur Generierung epileptischer Aktivität beitragen können (Cobb et al., 1995; Babb et al., 1989). Demnach würden exzitatorische Signale, die am Ende einer inhibitorischen Periode eingehen, auf eine größere Anzahl von Körnerzellen mit simultaner Entladungsbereitschaft treffen und somit epileptische Aktivität generieren.

Für einen Zusammenhang zwischen zunehmenden inhibitorischen Einflüssen auf die Körnerzellen des Gyrus dentatus und steigender Anfälligkeit für epileptische Aktivität spricht auch, dass nach Status epilepticus im Pilocarpin-Modell der Ratte die Dichte von Axonen GABAerger Neurone in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus zunimmt (Andre et al., 2001). Das Ausmaß dieser Steigerung inhibitorischer Mechanismen stand in direktem zeitlichem Zusammenhang mit dem Auftreten spontaner Anfälle. Die Reorganisation von Axonen GABAerger Neurone im Gyrus dentatus könnte zur gesteigerten Synchronisation der Körnerzellen führen, die durch den Untergang von Interneuronen ohnehin übererregbar geworden waren.

5.5.3.3 Rekurrente Erregungskreisläufe durch Moosfasersprossung

In verschiedenen Arbeiten wurde nach elektrisch induziertem Status epilepticus

eine Ausprossung der Moosfasern, vor allem in die Molekularschicht des Gyrus dentatus, gesehen (Mazarati et al., 2002; Lothman et al., 1992). Als Ursache dieses Phänomens wird der Verlust der ursprünglichen Zielzellen der Moosfasern, der Pyramidenzellen der CA3-Region und der Mooszellen im Hilusbereich, vermutet (Babb et al., 1991). Nach elektrisch induziertem Status epilepticus konnte gezeigt werden, dass über 90 % der Synapsen ausgesprosser Axone nicht mit GABAergen Interneuronen, sondern mit benachbarten Körnerzellen ausgebildet werden (Buckmaster et al., 2002). Für eine gesteigerte Erregbarkeit durch die Moosfasersprossung sprechen auch die Ergebnisse nach Pilocarpin-induziertem Status epilepticus: Durch antidrome Stimulation der Moosfasern wurden im Vergleich zu Präparaten von Kontrolltieren signifikant mehr Körnerzellen erregt (Okazaki et al., 1999). Da die Moosfasern den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat ausschütten, liegt die Vermutung nahe, dass Erregungskreisläufe über rekurrente Kollaterale zur Initiation oder Verstärkung von Anfällen bzw. anfallsartigen Ereignissen beitragen könnten. Im elektrischen Statusmodell wurde von manchen Autoren eine direkte Korrelation zwischen dem Grad der Moosfasersprossung und dem Auftreten spontaner Anfälle nachgewiesen (Mazarati et al., 2002). Am Beispiel von Pyramidenzellen der CA3-Region nach tetanischer Stimulation wurde gezeigt, dass über rekurrente exzitatorische Axonkollaterale unter GABA_A-Blockade die Stimulation einer einzelnen Zelle zur Depolarisation der gesamten Neuronenpopulation führen kann (Miles und Wong, 1986). Es gibt allerdings auch Hinweise dafür, dass die Moosfasersprossung in keinem direkten Zusammenhang mit der Prädisposition für epileptische Aktivität steht (Longo und Mello, 1997) oder sogar eher zu einer gesteigerten Inhibition als Exzitation führt (Sloviter, 1992; Ribak und Peterson, 1991).

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Moosfasersprossung vier bis neun Tage nach Status epilepticus beginnt und im Verlauf mehrerer Monate progressiv zunimmt, bis nach ca. 100 Tagen ein Plateau erreicht wird (Okazaki et al., 1995; Mello et al., 1993). Die aberrante Sprossung von Moosfasern kommt demnach als eine mögliche Ursache für die zeitlich verzögerte Steigerung der Aktivierbarkeit des Gyrus dentatus nach Status epilepticus in Betracht: Das Auftreten des unabhängigen Schrittmachers erst acht Wochen nach Status epilepticus wäre dann auf die ausreichende Ausbildung rekurrenter Erregungs-

kreisläufe zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen.

5.5.3.4 Veränderte Dendriten der Körnerzellen

Neben der Moosfasersprossung könnte auch die Zunahme basaler Dendriten der Körnerzellen im Sinne eines zusätzlichen erregenden Schaltkreises zur Hyperexzitabilität der Körnerzellen beitragen, wie sie im Pilocarpin-Modell beobachtet wurde (Kobayashi und Buckmaster, 2003). Im Hippocampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie wurde jedoch gezeigt, dass die Dendriten der Körnerzellen im Vergleich zu normalem Gewebe in ihrer Anzahl eher vermindert sind. Außerdem wurde eine Verkürzung der Dendriten beschrieben. Dies könnte wiederum zu einer gesteigerten Potenz der exzitatorischen Impulse führen, da diese näher am Anfangsteil des Axons, dem Initialsegment, auf die Prinzipalzelle einwirken (Isokawa, 1997).

5.5.3.5 Veränderungen der Körnerzellschicht

Im Pilocarpin-Modell wurde im Gyrus dentatus der Ratte neben Zellverlusten und Moosfasersprossung eine Dispersion der Körnerzellschicht als weitere morphologische Veränderung nach Status epilepticus gefunden (Mello et al., 1993). Auch eine verstärkte Neurogenese der Körnerzellen, die vermutlich durch die synaptische Aktivierung von Vorläuferzellen während des Status epilepticus ausgelöst wurde, ist nach Pilocarpin-induziertem Status nachgewiesen worden. Die neu generierten Zellen befanden sich teilweise in ektopen Lokalisationen, z.B. in der inneren Molekularschicht und im Hilusbereich des Gyrus dentatus. Aberrante Projektionsbahnen dieser Körnerzellen endeten im Stratum oriens der CA3-Region und in der inneren Molekularschicht (Parent et al., 1997). Damit wurde gezeigt, dass auch aberrant sprossende Axone neu generierter Körnerzellen zu abnormalen, zum Teil rekurrenten Netzwerkverbindungen im Hippocampus nach Status epilepticus beitragen können.

Die Dispersion der Körnerzellschicht beginnt ebenso wie die Moosfasersprossung bereits ein bis zwei Wochen nach Status epilepticus und erreicht nach ca. 100 Tagen ein Plateau (Mello et al., 1993). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine Progression des Phänomens bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt, 60 Tage nach Status epilepticus, registriert (Parent et al., 1997). Die gesteigerte Vulnerabi-

lität des Gyrus dentatus acht Wochen nach Status epilepticus in der vorliegenden Arbeit könnte darauf beruhen, dass diese progressiven morphologischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt ein Ausmaß erreicht haben, das zum Auftreten epileptischer Aktivität in der Region führt.

5.5.4 Perspektiven

Um zu differenzieren, ob es sich bei der beobachteten Aktivität im Gyrus dentatus tatsächlich um einen unabhängigen Schrittmacher handelt, oder die epileptische Aktivität durch gesteigerte Impulse aus einer anderen Region getriggert wird, bestehen verschiedene Möglichkeiten im Rahmen weiterer *in vitro*-Untersuchungen. Die Analyse von isolierten Gyrus dentatus-Präparaten von Tieren nach Status epilepticus wäre der naheliegendste Ansatz, hier ließe sich jedoch bei Ausbleiben epileptischer Aktivität nicht differenzieren, ob fehlende Impulse aus anderen Regionen hierfür verantwortlich sind oder ob der entsprechende Gyrus dentatus auch im kombinierten Hirnschnitt stumm geblieben wäre. Deshalb erscheint es sinnvoller, kombinierte Hirnschnittpräparate zu verwenden und den Gyrus dentatus erst beim Auftreten eines autonomen Schrittmachers durch gezielte Schnitte von den parahippocampalen Regionen zu isolieren.

Das verbleibende Hirngewebe der in der vorliegenden Studie untersuchten Tiere wurde für spätere Untersuchungen in Paraffin fixiert. Somit besteht die Möglichkeit, morphologische Veränderungen im Gyrus dentatus mittels Färbung und immunhistochemischer Analyse zu detektieren und deren Ausprägung mit dem Auftreten eines autonomen Schrittmachers in Schnittpräparaten des entsprechenden Tieres direkt zu vergleichen. Der Einsatz der Neo-Timm-Färbung ermöglicht beispielsweise die Detektion aberrant sprossender Moosfasern (Babb et al., 1991; Sloviter, 1982), mit Hilfe der Nissl-Färbung kann ein möglicher Neuronenverlust quantifiziert werden (Davenport et al., 1990; Mouritzen, 1979). Der Anteil inhibitorischer GABAerger Interneurone kann immunhistochemisch durch den Nachweis der Glutamat-Decarboxylase (GAD) mittels spezifischer Antikörper bestimmt werden (Davenport et al., 1990). Mit einer ähnlichen Methode können Parvalbuminhaltige Zellen, die eine Subpopulation der Interneurone darstellen, identifiziert werden (Kosaka et al., 1987).

5.6 Zeitlicher Verlauf der funktionellen Änderungen

Ein besonderes Interesse galt möglichen Änderungen des zeitlichen und räumlichen Verhaltens epileptischer Aktivität *in vitro* im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus *in vivo*. Auf diese Weise sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Regionen zu welchen Zeitpunkten im Prozess der Epileptogenese eine besondere Vulnerabilität aufweisen. Solche Einblicke in die Pathogenese erlauben möglicherweise neuroprotektive Ansätze, die gezielt zu bestimmten Zeitpunkten eingesetzt werden können. Die Analyse erfolgte zu drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten: eine Woche, vier Wochen und acht Wochen nach elektrisch induziertem Status epilepticus *in vivo*. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, weil sie jeweils relevante Abschnitte für die Epileptogenese nach Status epilepticus widerspiegeln. So befindet sich der erste Zeitpunkt in der Latenzperiode, also im Zeitraum zwischen Status epilepticus und erstem spontanen Anfall. Der zweite Zeitraum sollte in der aktiven Phase von möglichen Umbauprozessen liegen, die am letzten Untersuchungstermin nach 8 Wochen im Wesentlichen abgeschlossen sind (siehe 5.6.2).

5.6.1 Funktionelle Defizite im zeitlichen Verlauf nach Status epilepticus

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt (Ein-Wochen-Gruppen) ergaben sich für die meisten Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren nach Status epilepticus und den Kontrollen. Die Ausnahme bildet das diskontinuierliche Ausbreitungsmuster, das bereits eine Woche nach Status epilepticus bei 8 % der anfallsartigen Ereignisse registriert wurde. In den Kontrollgruppen wurden zu diesem Zeitpunkt ausschließlich kontinuierliche Ausbreitungsmuster gesehen. Dieses Ergebnis kennzeichnet den Beginn von Prozessen, die nach Status epilepticus zu einer gesteigerten Synchronizität des Hirngewebes führen.

Vier Wochen nach Status epilepticus ergaben sich im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt wesentliche Unterschiede zwischen Status-Gruppe und Kontrollgruppen. So kam es bei den Präparaten der Tiere nach Status epilepticus im Niedrig-Mg²⁺-Modell zu einer signifikanten Verkürzung der Latenz vom Beginn des Mg²⁺-Entzuges bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität. Diese Beobach-

tung deutet auf eine gesteigerte Exzitabilität hin. Der Anteil von Ereignissen mit großflächigem Ursprung als Hinweis für eine gesteigerte Synchronizität stieg im Zeitraum zwischen einer Woche und vier Wochen nach Status epilepticus in hochsignifikantem Maße an.

Die Latenzverkürzung und der prozentuelle Anteil von Ereignissen mit großflächigem Ursprungsort blieben bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt acht Wochen nach Status epilepticus weitgehend unverändert. Für den Anteil der anfallsartigen Ereignisse mit diskontinuierlicher Ausbreitung ergab sich hingegen zwischen vier und acht Wochen nach Status epilepticus eine signifikante Zunahme. Außerdem deutet die erstmalige Beobachtung eines autonomen Schrittmachers im Gyrus dentatus acht Wochen nach Status epilepticus darauf hin, dass im elektrischen Statusmodell die pathologischen Veränderungen zumindest in dieser Region auch über vier Wochen nach Status epilepticus hinaus progredient sind.

5.6.2 Vergleich mit vorangegangenen Studien

Im Vergleich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten war das Ausmaß funktioneller Veränderungen in der vorliegenden Studie eine Woche nach Status epilepticus minimal. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung zahlreicher tierexperimenteller Studien *in vivo*, dass spontane Anfälle als Ausdruck einer gesteigerten Vulnerabilität erst mit einer zeitlichen Verzögerung von Tagen bis Wochen nach stattgehabtem Status epilepticus auftreten. Nach elektrisch induziertem Status epilepticus dauerte es 28 ± 2 Tage bis zum Auftreten spontaner Anfälle (Mazarati et al., 2002). In einer ähnlichen Studie derselben Arbeitsgruppe dauerte die Latenzperiode durchschnittlich zwei Wochen (Wasterlain et al., 1996). In einer weiteren Studie wurden die ersten spontanen Anfälle durchschnittlich 33 Tage nach elektrisch induziertem Status epilepticus beobachtet (Nissinen et al., 2000). Auch unter Verwendung des Pilocarpin-Modells wurden die ersten spontanen Anfälle je nach Studie 14 - 15 Tage (Cavalheiro et al., 1991) bzw. $9,8 \pm 7,4$ Tage (Arida et al., 1999) nach Status epilepticus registriert. Der zeitliche Verlauf des Auftretens spontaner Anfälle in der Mehrzahl der vorangegangenen Studien zeigt, dass in der vorliegenden Arbeit der erste Untersuchungszeitpunkt, eine Woche nach Status epilepticus, bei den meisten Tieren in die Latenzperiode fiel.

Das Auftreten spontaner Anfälle nach elektrisch induziertem Status epilepticus in den erwähnten Studien lässt sich nur dadurch erklären, dass innerhalb der Latenzperiode Prozesse initiiert werden, die schließlich zu der erhöhten Bereitschaft des Hirngewebes für epileptische Aktivität führen. Das vereinzelte Auftreten diskontinuierlicher Ausbreitungsmuster epileptischer Aktivität eine Woche nach Status epilepticus in der vorliegenden Arbeit deutet auf den Beginn entsprechender Prozesse hin, die vereinzelt bereits zu einer gesteigerten Synchronizität des neuronalen Netzwerkes geführt haben. Diverse Autoren haben ebenfalls während der Latenzperiode pathologische Veränderungen beschrieben. So ergab die elektro-physiologische Analyse von Doppelpulsen im Gyrus dentatus *in vitro* nach elektrischer Statusinduktion *in vivo* bereits zwei Wochen vor dem ersten spontanen Anfall eine deutliche Verminderung der GABAergen Inhibition der Körnerzellen (Wasterlain et al., 1996). Andere Autoren, die Doppelpulsmessungen durchgeführt haben, berichten von einem Inhibitionsverlust im Gyrus dentatus im direkten Anschluss an einen elektrisch induzierten Status epilepticus (Shirasaka und Wasterlain, 1994; Sloviter, 1991). Im Pilocarpin-Modell wurde ein signifikanter Inhibitionsverlust 24 Stunden nach Status epilepticus registriert (Doherty und Dingledine, 2001). Im Rahmen neuropathologischer Untersuchungen registrierten Gorter und Mitarbeiter einen Verlust von Neuronen im Hilusbereich des Gyrus dentatus bereits einen Tag nach elektrischer Induktion eines Status epilepticus (Gorter et al., 2002). Auch die aberrante Sprossung von Moosfasern wurde im elektrischen Modell bereits in der Latenzperiode nachgewiesen (Mazarati et al., 2002).

Die beschriebene Messung von Doppelpulsen und die Beurteilung der Moosfaser-sprossung ermöglicht eine Aussage über pathologische Veränderungen in Hippocampus proper und Gyrus dentatus innerhalb der Latenzperiode. Das Ergebnis der optischen Messung zum ersten Untersuchungszeitpunkt deutet daraufhin, dass auch parahippocampale Strukturen wie temporaler und entorhinaler Cortex bereits in der anfallsfreien Periode funktionelle Defizite aufweisen.

Die beiden späten Untersuchungszeitpunkte der vorliegenden Studie liegen innerhalb des Zeitraumes, für den auch in vorangegangenen experimentellen Arbeiten, die sich mit der Kinetik pathologischer Veränderungen nach elektrisch induziertem Status epilepticus befassen, eine Progredienz der pathologischen Veränderungen festgestellt wurde: Hinsichtlich des Auftretens spontaner Anfälle ergab sich bis zur

achten Woche nach elektrisch induziertem Status epilepticus eine progressive Zunahme der Anfallsfrequenz (Gorter et al., 2001). In einer anderen Studie wird eine Steigerung der Anfallsfrequenz bis zur zwölften Woche nach elektrischer Statusinduktion angegeben (Bertram und Cornett, 1994). Auch im Pilocarpin-Modell wurde eine signifikante Zunahme der Anfallsfrequenz innerhalb der ersten zwei Monate nach Status epilepticus beschrieben (Arida et al., 1999).

Die Kinetik des veränderten Verhaltens epileptischer Aktivität nach SSSE wäre auch mit dem zeitliche Verlauf der Moosfasersprossung vereinbar, die ihren Höhepunkt acht bis neun Wochen nach elektrisch induziertem Status epilepticus erreicht (Mazarati et al., 2002). Es fällt auf, dass die maximale Ausprägung dieser morphologischen Veränderung zeitgleich mit dem autonomen Schrittmacher in der betroffenen Region, also dem Gyrus dentatus auftritt, so dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Beobachtungen denkbar ist. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass die funktionelle Bedeutung der Moosfasersprossung für die Epileptogenese umstritten ist (Longo und Mello, 1997; Ribak und Peterson, 1991).

Aus dem zeitlichen Verlauf der registrierten funktionellen Änderungen nach Status epilepticus lassen sich zwei Hauptaussagen ableiten: 1) innerhalb der ersten Woche nach Status epilepticus, die im verwendeten elektrischen Modell der frühen Latenzperiode zuzurechnen ist, werden Prozesse initiiert, die zu einer gesteigerten Synchronizität des neuronalen Netzwerkes führen und 2) die folgenden Wochen sind durch die deutlichen Progredienz dieser funktionellen Auffälligkeiten gekennzeichnet. Während einige Parameter nach vier Wochen ein Plateau erreichen (Latenz bis zum Aktivitätsbeginn und großflächiger Ursprung), spricht die weitere Zunahme der anfallsartigen Ereignisse mit diskontinuierlicher Ausbreitung bzw. das Auftreten eines autonomen Schrittmachers im Gyrus dentatus für die weitere Progredienz der zugrunde liegenden Prozesse.

Insgesamt deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die im Verlauf nach Status epilepticus schnell progrediente Steigerung von Exzitabilität und Synchronizität des neuronalen Netzwerkes in der Latenzperiode beginnt. Diese Erkenntnis legt nahe, einen therapeutischen Ansatz bereits innerhalb dieses Zeitraumes zu wählen, um den pathogenetischen Prozess vor Erreichen der Schwelle zur klinischen Manifestation aufzuhalten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Status epilepticus ist die extremste Manifestation eines epileptischen Anfalls. Die Ergebnisse klinischer und experimenteller Studien weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen einem stattgehabten Status epilepticus und der Entwicklung einer chronischen Epilepsie besteht. Die genauen Mechanismen und die Kinetik der Epileptogenese sind aber weiterhin unklar. Ziel der vorliegenden Studie war es, durch die *in vitro*-Analyse des vitalen Hirngewebes von Ratten nach elektrisch induziertem Status epilepticus *in vivo* neue Erkenntnisse über Lokalisation und Kinetik funktioneller Änderungen im Hirngewebe zu erlangen. Ein besseres Verständnis des Prozesses könnte zu neuen therapeutischen Ansätzen führen, um die Entwicklung einer chronischen Epilepsie nach Status epilepticus zu verzögern oder aufzuhalten.

Ein selbsterhaltender Status epilepticus (SSSE) wurde durch die Applikation elektrischer Impulse über eine im Bereich der Hippocampusformation implantierte Elektrode induziert. Zur Erfassung möglicher Folgen von Operation oder Stimulation wurden entsprechende Elektroden- und Stimulations-Kontrollen gebildet. Eine, vier und acht Wochen nach SSSE erfolgte die Analyse epileptischer Aktivität in kombinierten Hippocampus-entorhinaler Cortex-Präparaten unter Verwendung des Niedrig-Magnesium-Modells. Hierbei führt der Entzug von Magnesium zur Entblockung von Ionenkanälen exzitatorischer NMDA-Rezeptoren und zum Auftreten verschiedener Formen von epileptischer Aktivität. Hier wurde das zeitliche und räumliche Verhalten anfallsartiger Ereignisse analysiert, die als *in vitro*-Modell fokaler Anfälle beim Menschen angesehen werden. Mit ionensensitiven Mikroelektroden wurden Änderungen von extrazellulärem Feldpotenzial und Kaliumkonzentration registriert. Durch die Messung der Änderung des intrinsischen optischen Signals (IOS) konnten Ursprung und Ausbreitung der epileptischen Aktivität im gesamten Hirnschnitt erfasst werden. Intrinsische optische Signale entstehen durch die aktivitätsabhängige Änderung der Lichtdurchlässigkeit des Hirngewebes.

Die Analyse der Stimulations-Kontrollen hat ergeben, dass die alleinige Stimulation geringe funktionelle Folgen nach sich ziehen kann. Die Bildung entsprechender Kontrollen scheint also bei Einsatz eines elektrischen Modells sinnvoll, da nur so

zwischen Folgen des SSSE und Folgen der alleinigen Stimulation differenziert werden kann.

Die elektrophysiologischen Messungen ergaben eine im Verlauf nach SSSE anhaltende Latenzverkürzung bis zum Auftreten anfallsartiger Ereignisse. Dieses Ergebnis weist auf eine gesteigerte Exzitabilität des Hirngewebes nach SSSE hin.

In Bezug auf das räumliche Verhalten ergab die IOS-Messung im Verlauf nach SSSE eine anhaltende Steigerung des Anteils von AEs mit großflächigem Ursprungsort. Dieses Phänomen wurde in vorangegangenen Studien mit naiven Tieren nicht beobachtet und deutet auf eine gesteigerte Synchronizität des neuronalen Netzwerks hin. Für eine derartige Hypersynchronizität spricht auch das zunehmende Auftreten diskontinuierlicher Ausbreitungsmuster nach SSSE. Hierbei greift die epileptische Aktivität unter Auslassung angrenzender Regionen auf entfernte Areale über. Die spezifischen räumlichen Verhaltensmuster epileptischer Aktivität, die im Verlauf der Epileptogenese detektiert wurden, könnten perspektivisch auch in der Klinik mit Hilfe elektrophysiologischer und bildgebender Verfahren registriert und als Parameter für die Einordnung der Progression eines epileptogenen Prozesses herangezogen werden. Acht Wochen nach SSSE wurde ein weiteres Phänomen registriert, das zuvor in naiven Tieren nicht beschrieben wurde. Im Gyrus dentatus trat epileptische Aktivität mit hoher Frequenz und zeitlich unabhängig von anfallsartigen Ereignissen in hippocampalen und parahippocampalen Strukturen auf. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die strukturellen Änderungen im Gyrus dentatus, die in zahlreichen Studien für diesen Untersuchungszeitpunkt nach SSSE beschrieben wurden, mit einer veränderten Funktionalität einhergehen. Dieser Befund bedarf einer weiteren Charakterisierung, da er für das Verständnis der Entwicklung einer chronischen Epilepsie nach Status epilepticus von Bedeutung sein könnte.

Funktionelle Änderungen wurden bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach SSSE registriert. Dies legt nahe, dass protektive Ansätze frühzeitig relevant sind, um die Entwicklung und Chronifizierung einer Epilepsie zu verzögern oder zu verhindern.

7 ANHANG

Literaturverzeichnis

1. Aitken, P. G., Fayuk, D., Somjen, G. G. und Turner, D. A. (1999). Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* **18**(2):91-103.
2. Albowitz, B., Kuhnt, U., Kohling, R., Lucke, A., Straub, H., Speckmann, E. J., Tuxhorn, I., Wolf, P., Pannek, H. und Oppel, F. (1998). Spatio-temporal distribution of epileptiform activity in slices from human neocortex: recordings with voltage-sensitive dyes. *Epilepsy Res.* **32**(1-2):224-232.
3. Alefeld, M., Sutor, B. und Luhmann, H. J. (1998). Pattern and pharmacology of propagating epileptiform activity in mouse cerebral cortex. *Exp. Neurol.* **153**(1):113-122.
4. Aminoff, M. J. und Simon, R. P. (1980). Status epilepticus. Causes, clinical features and consequences in 98 patients. *Am. J. Med.* **69**(5):657-666.
5. Andre, V., Marescaux, C., Nehlig, A. und Fritschy, J. M. (2001). Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* **11**(4):452-468.
6. Arida, R. M., Scorza, F. A., Peres, C. A. und Cavalheiro, E. A. (1999). The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* **34**(2-3):99-107.
7. Ayala, G. F. (1983). The paroxysmal depolarizing shift. *Prog. Clin. Biol. Res.* **124**:15-21.
8. Babb, T. L., Brown, W. J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J. P. und Crandall, P. H. (1984a). Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **25**(6):729-740.

9. Babb, T. L., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Crandall, P. H. und Levesque, M. F. (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* **42**(2):351-363.
10. Babb, T. L., Lieb, J. P., Brown, W. J., Pretorius, J. und Crandall, P. H. (1984b). Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* **25**(6):721-728.
11. Babb, T. L., Pretorius, J. K., Kupfer, W. R. und Crandall, P. H. (1989). Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* **9**(7):2562-2574.
12. Bear, J., Fountain, N. B. und Lothman, E. W. (1996). Responses of the superficial entorhinal cortex in vitro in slices from naive and chronically epileptic rats. *J. Neurophysiol.* **76**(5):2928-2940.
13. Behr, J., Gloveli, T., Gutierrez, R. und Heinemann, U. (1996). Spread of low Mg²⁺ induced epileptiform activity from the rat entorhinal cortex to the hippocampus after kindling studied in vitro. *Neurosci. Lett.* **216**(1):41-44.
14. Bekenstein, J. W. und Lothman, E. W. (1993). Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* **259**(5091):97-100.
15. Berretta, N. und Jones, R. S. (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* **75**(2):339-344.
16. Bertram, E. H. und Cornett, J. F. (1994). The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. *Brain Res.* **661**(1-2):157-162.
17. Boulton, C. L., von Haebler, D. und Heinemann, U. (1992). Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* **2**(2):99-106.
18. Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Gabriel, H. J., Heinemann,

- U. und Meierkord, H. (1999). Intrinsic optical signal measurements reveal characteristic features during different forms of spontaneous neuronal hyperactivity associated with ECS shrinkage in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **11**(6):1877-1882.
19. Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Weissinger, F., Heine-
mann, U. und Meierkord, H. (2000). Comparison of intrinsic optical signals
associated with low Mg²⁺-and 4-aminopyridine-induced seizure-like
events reveals characteristic features in adult rat limbic system. *Epilepsia*
41(6):635-641.
20. Buchheim, K., Weissinger, F., Siegmund, H., Holtkamp, M., Schuchmann,
S. und Meierkord, H. (2002). Intrinsic optical imaging reveals regionally
different manifestation of spreading depression in hippocampal and
entorhinal structures in vitro. *Exp. Neurol.* **175**(1):76-86.
21. Buckmaster, P. S., Jongen-Relo, A. L., Davari, S. B. und Wong, E. H.
(2000). Testing the disinhibition hypothesis of epileptogenesis in vivo and
during spontaneous seizures. *J Neurosci* **20**(16):6232-6240.
22. Buckmaster, P. S. und Schwartzkroin, P. A. (1995). Interneurons and
inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J. Neurosci.* **15**(1 Pt
2):774-789.
23. Buckmaster, P. S., Zhang, G. F. und Yamawaki, R. (2002). Axon
sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly
excitatory feedback circuit. *J. Neurosci.* **22**(15):6650-6658.
24. Burgess, N., Maguire, E. A. und O'Keefe, J. (2002). The human
hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* **35**(4):625-641.
25. Carlen, P. L., Skinner, F., Zhang, L., Naus, C., Kushnir, M. und Perez Ve-
lazquez, J. L. (2000). The role of gap junctions in seizures. *Brain Res.*
Brain Res. Rev. **32**(1):235-241.
26. Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou,

- C. und Turski, L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* **32**(6):778-782.
27. Cavalheiro, E. A., Riche, D. A. und Le Gal, L. S. (1982). Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **53**(6):581-589.
28. Celesia, G. G. (1983). Prognosis in convulsive status epilepticus. *Adv. Neurol.* **34**:55-59.
29. Chesi, A. J., Rucker, F., Tretter, Y., ten Bruggencate, G. und Alzheimer, C. (1998). Spread of excitation in chronically lesioned mouse hippocampus determined by laser scanning microscopy. *Exp. Neurol.* **152**(2):177-187.
30. Claassen, J., Lokin, J. K., Fitzsimmons, B. F., Mendelsohn, F. A. und Mayer, S. A. (2002). Predictors of functional disability and mortality after status epilepticus. *Neurology* **58**(1):139-142.
31. Clusmann, H., Schramm, J., Kral, T., Helmstaedter, C., Ostertun, B., Fimmers, R., Haun, D. und Elger, C. E. (2002). Prognostic factors and outcome after different types of resection for temporal lobe epilepsy. *J. Neurosurg.* **97**(5):1131-1141.
32. Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O. und Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* **378**(6552):75-78.
33. Coeytaux, A., Jallon, P., Galobardes, B. und Morabia, A. (2000). Incidence of status epilepticus in French-speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* **55**(5):693-697.
34. Commission on Classification and Terminology of the ILAE (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **30**(4):389-399.

35. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* **22**(4):489-501.
36. Connors, B. W. (1984). Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* **310**(5979):685-687.
37. Coulter, D. A., McIntyre, D. C. und Loscher, W. (2002). Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Pathol.* **12**(2):240-256.
38. D'Antuono, M., Benini, R., Biagini, G., D'Arcangelo, G., Barbarosie, M., Tancredi, V. und Avoli, M. (2002). Limbic network interactions leading to hyperexcitability in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.* **87**(1):634-639.
39. Davenport, C. J., Brown, W. J. und Babb, T. L. (1990). GABAergic neurons are spared after intrahippocampal kainate in the rat. *Epilepsy Res.* **5**(1):28-42.
40. DeLorenzo, R. J., Hauser, W. A., Towne, A. R., Boggs, J. G., Pellock, J. M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C. A. und Ko, D. (1996). A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* **46**(4):1029-1035.
41. DeLorenzo, R. J., Pellock, J. M., Towne, A. R. und Boggs, J. G. (1995). Epidemiology of status epilepticus. *J. Clin. Neurophysiol.* **12**(4):316-325.
42. Dichter, M. A. (1998). The Neurobiology of Epilepsy. *In*: Engel, J., Jr. & Pedley, T. A. (Hrsg.): *Epilepsy - A Comprehensive Textbook*. Lippincott - Raven, pp. 233-499.
43. Doherty, J. und Dingledine, R. (2001). Reduced excitatory drive onto

- interneurons in the dentate gyrus after status epilepticus. *J Neurosci* **21**(6):2048-2057.
44. Duncan, J. S. (1997). Imaging and epilepsy. *Brain* **120** (Pt 2):339-377.
 45. Eichenbaum, H., Otto, T. und Cohen, N. J. (1992). The hippocampus-- what does it do? *Behav. Neural Biol.* **57**(1):2-36.
 46. Elisevich, K., Rempel, S. A., Smith, B. J. und Edvardsen, K. (1997). Hippocampal connexin 43 expression in human complex partial seizure disorder. *Exp. Neurol.* **145**(1):154-164.
 47. Empson, R. M. und Heinemann, U. (1995). Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation. *Hippocampus* **5**(2):104-107.
 48. Engel, J., Jr. (1993). Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* **6**(2):240-249.
 49. Falconer, M. A. und Taylor, D. C. (1968). Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *Arch. Neurol.* **19**(4):353-361.
 50. Ferkany, J. W., Zaczek, R. und Coyle, J. T. (1984). The mechanism of kainic acid neurotoxicity. *Nature* **308**(5959):561-562.
 51. Fountain, N. B., Bear, J., Bertram, E. H., III und Lothman, E. W. (1998). Responses of deep entorhinal cortex are epileptiform in an electrogenic rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.* **80**(1):230-240.
 52. Fritschy, J. M., Kiener, T., Bouilleret, V. und Loup, F. (1999). GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem. Int.* **34**(5):435-445.

53. Garzon, E., Fernandes, R. M. und Sakamoto, A. C. (2003). Analysis of clinical characteristics and risk factors for mortality in human status epilepticus. *Seizure*. **12**(6):337-345.
54. Goddard, G. V., McIntyre, D. C. und Leech, C. K. (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* **25**(3):295-330.
55. Gorter, J. A., Goncalves Pereira, P. M., van Vliet, E. A., Aronica, E., Lopes da Silva, F. H. und Lucassen, P. J. (2003). Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia* **44**(5):647-658.
56. Gorter, J. A., van Vliet, E. A., Aronica, E. und Lopes da Silva, F. H. (2001). Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur. J. Neurosci.* **13**(4):657-669.
57. Gorter, J. A., van Vliet, E. A., Aronica, E. und Lopes da Silva, F. H. (2002). Long-lasting increased excitability differs in dentate gyrus vs. CA1 in freely moving chronic epileptic rats after electrically induced status epilepticus. *Hippocampus* **12**(3):311-324.
58. Green, J. D. (1964). THE HIPPOCAMPUS. *Physiol Rev.* **44**:561-608.
59. Grinvald, A., Frostig, R. D., Lieke, E. und Hildesheim, R. (1988). Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.* **68**:1285-1366.
60. Hauser, W. A. (1990). Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology* **40**(5 Suppl 2):9-13.
61. 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* **7**:273-280.

62. Heinemann, U., Lux, H. D. und Gutnick, M. J. (1977). Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res.* **27**(3-4):237-243.
63. Hesdorffer, D. C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J. F. und Hauser, W. A. (1998). Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann. Neurol.* **44**(6):908-912.
64. Hill, D. K. und Keynes, R. D. (1949). Opacity changes in stimulated nerve. *J. Physiol. (Lond.)* **108**:278-281.
65. Hochman, D. W., Baraban, S. C., Owens, J. W. und Schwartzkroin, P. A. (1995). Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockade of epileptiform activity. *Science* **270**(5233):99-102.
66. Hoff, S. F. (1986). Lesion-induced transneuronal plasticity in the adult rat hippocampus. *Neuroscience* **19**(4):1227-1233.
67. Holsheimer, J. und Lopes da Silva, F. H. (1989). Propagation velocity of epileptiform activity in the hippocampus. *Exp. Brain Res.* **77**(1):69-78.
68. Holtkamp, M., Buchheim, K., Siegmund, H. und Meierkord, H. (2003). Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro. *Neurobiol. Aging* **24**(2):345-353.
69. Hsieh, P. F. (1999). Neuropathology of limbic status epilepticus induced by electrical stimulation of naive rats. *Neurol. Res.* **21**(4):399-403.
70. Isokawa, M. (1997). Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* **744**(2):339-343.
71. Janz, D. (1983). Etiology of convulsive status epilepticus. *Adv. Neurol.* **34**:47-54.

72. Jarvis, C. R., Lilge, L., Vipond, G. J. und Andrew, R. D. (1999). Interpretation of intrinsic optical signals and calcein fluorescence during acute excitotoxic insult in the hippocampal slice. *Neuroimage*. **10**(4):357-372.
73. Jefferys, J. G. (1995). Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol Rev*. **75**(4):689-723.
74. Johnston, D. und Amaral, D. G. (1998). Hippocampus. *In*: Shepherd, G. M. (Hrsg.): *The Synaptic Organisation of the Brain*. 4. Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 417-458.
75. Jones, R. S. & Buhl, E. H. Basket-like interneurons in layer II of the entorhinal cortex exhibit a powerful NMDA-mediated synaptic excitation. *Neurosci. Lett*. 149:35-39, 1993.
76. Jones, R. S. und Heinemann, U. (1988). Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J. Neurophysiol*. **59**(5):1476-1496.
77. Jung, W. Y., Pacia, S. V. und Devinsky, R. (1999). Neocortical temporal lobe epilepsy: intracranial EEG features and surgical outcome. *J Clin. Neurophysiol*. **16**(5):419-425.
78. Kandel, E. R. und Siegelbaum, S. (1996). Einführung in die synaptische Übertragung. *In*: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessel, T. M. (Hrsg.): *Neurowissenschaften*. Spektrum-Akademischer Verlag, pp. 189-202.
79. Knake, S., Rosenow, F., Vescovi, M., Oertel, W. H., Mueller, H. H., Wirbatz, A., Katsarou, N. und Hamer, H. M. (2001). Incidence of status epilepticus in adults in Germany: a prospective, population-based study. *Epilepsia* **42**(6):714-718.
80. Kobayashi, M. und Buckmaster, P. S. (2003). Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci*. **23**(6):2440-2452.

81. Kobayashi, M., Wen, X. und Buckmaster, P. S. (2003). Reduced inhibition and increased output of layer II neurons in the medial entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **23**(24):8471-8479.
82. Kohling, R., Lucke, A., Nagao, T., Speckmann, E. J. und Avoli, M. (1995). Extracellular potassium elevations in the hippocampus of rats with long-term pilocarpine seizures. *Neurosci. Lett.* **201**(1):87-91.
83. Kohn, A., Metz, C., Quibrera, M., Tommerdahl, M. A. und Whitsel, B. L. (2000). Functional neocortical microcircuitry demonstrated with intrinsic signal optical imaging in vitro. *Neuroscience* **95**(1):51-62.
84. Konnerth, A., Heinemann, U. und Yaari, Y. (1986). Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium. *J. Neurophysiol.* **56**(2):409-423.
85. Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J. Y. und Heizmann, C. W. (1987). GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* **419**(1-2):119-130.
86. Krumholz, A. (1999). Epidemiology and evidence for morbidity of nonconvulsive status epilepticus. *J. Clin. Neurophysiol.* **16**(4):314-322.
87. Kutsy, R. L., Farrell, D. F. und Ojemann, G. A. (1999). Ictal patterns of neocortical seizures monitored with intracranial electrodes: correlation with surgical outcome. *Epilepsia* **40**(3):257-266.
88. Lee, S. A., Spencer, D. D. und Spencer, S. S. (2000). Intracranial EEG seizure-onset patterns in neocortical epilepsy. *Epilepsia* **41**(3):297-307.
89. Leppik, I. E. (1992). Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Res. Suppl* **5**:7-11.
90. Li, X. G., Somogyi, P., Tepper, J. M. & Buzsaki, G. Axonal and dendritic

- arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 90:519-525, 1992.
91. Lian, J., Bikson, M., Shuai, J. und Durand, D. M. (2001). Propagation of non-synaptic epileptiform activity across a lesion in rat hippocampal slices. *J. Physiol* **537**(Pt 1):191-199.
 92. Longo, B. M. und Mello, L. E. (1997). Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. *Neurosci. Lett.* **226**(3):163-166.
 93. Lopes da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H. und Lohman, A. H. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* **70**(2):453-511.
 94. Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**:113-177.
 95. Lothman, E. W., Bertram, E. H., Kapur, J. und Stringer, J. L. (1990). Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. *Epilepsy Res.* **6**(2):110-118.
 96. Lothman, E. W., Stringer, J. L. und Bertram, E. H. (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res. Suppl* **7**:301-313.
 97. Lux, H. D. (1974). Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the CNS. *Neuropharmacology* **13**(6):509-517.
 98. Lux, H. D. und Neher, E. (1973). The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Exp. Brain Res.* **17**(2):190-205.
 99. Margineanu, D. G. und Klitgaard, H. (2001). Can gap-junction blockade preferentially inhibit neuronal hypersynchrony vs. excitability? *Neuropharmacology* **41**(3):377-383.

100. Mathern, G. W., Babb, T. L., Pretorius, J. K. und Leite, J. P. (1995a). Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J. Neurosci.* **15**(5 Pt 2):3990-4004.
101. Mathern, G. W., Bertram, E. H., Babb, T. L., Pretorius, J. K., Kuhlman, P. A., Spradlin, S. und Mendoza, D. (1997). In contrast to kindled seizures, the frequency of spontaneous epilepsy in the limbic status model correlates with greater aberrant fascia dentata excitatory and inhibitory axon sprouting, and increased staining for N-methyl-D-aspartate, AMPA and GABA(A) receptors. *Neuroscience* **77**(4):1003-1019.
102. Mathern, G. W., Pretorius, J. K. und Babb, T. L. (1995b). Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J. Neurosurg.* **82**(2):220-227.
103. Maytal, J., Shinnar, S., Moshe, S. L. und Alvarez, L. A. (1989). Low morbidity and mortality of status epilepticus in children. *Pediatrics* **83**(3):323-331.
104. Mazarati, A., Bragin, A., Baldwin, R., Shin, D., Wilson, C., Sankar, R., Naylor, D., Engel, J. und Wasterlain, C. G. (2002). Epileptogenesis after self-sustaining status epilepticus. *Epilepsia* **43 Suppl 5**:74-80.
105. McIntyre, D. C., Poulter, M. O. und Gilby, K. (2002). Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* **50**(1-2):79-92.
106. Meierkord, H., Schuchmann, S., Buchheim, K. und Heinemann, U. (1997). Optical imaging of low Mg(2+)-induced spontaneous epileptiform activity in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices. *Neuroreport* **8**(8):1857-1861.
107. Meldrum, B. S. und Brierley, J. B. (1973). Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. *Arch. Neurol.* **28**(1):10-17.

108. Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Babb, T. L. und Finch, D. M. (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* **34**(6):985-995.
109. Miles, R. und Wong, R. K. (1986). Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J. Physiol* **373**:397-418.
110. Mody, I., Lambert, J. D. und Heinemann, U. (1987). Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **57**(3):869-888.
111. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. und Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**(3):529-540.
112. Mouritzen, D. A. (1979). The density of neurons in the human hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **5**(4):249-264.
113. Naus, C. C., Bechberger, J. F. und Paul, D. L. (1991). Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Exp. Neurol.* **111**(2):198-203.
114. Nissinen, J., Halonen, T., Koivisto, E. und Pitkanen, A. (2000). A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res.* **38**(2-3):177-205.
115. Oka, H., Shimono, K., Ogawa, R., Sugihara, H. und Taketani, M. (1999). A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J. Neurosci. Methods* **93**(1):61-67.
116. Okazaki, M. M., Evenson, D. A. und Nadler, J. V. (1995). Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *J. Comp Neurol.* **352**(4):515-534.

117. Okazaki, M. M., Molnar, P. und Nadler, J. V. (1999). Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *J. Neurophysiol.* **81**(4):1645-1660.
118. Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S. und Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**(10):3727-3738.
119. Park, Y. D., Murro, A. M., King, D. W., Gallagher, B. B., Smith, J. R. und Yaghmai, F. (1996). The significance of ictal depth EEG patterns in patients with temporal lobe epilepsy. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **99**(5):412-415.
120. Perreault, P. und Avoli, M. (1991). Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **65**(4):771-785.
121. Peterson, G. M. und Ribak, C. E. (1987). Hippocampus of the seizure-sensitive gerbil is a specific site for anatomical changes in the GABAergic system. *J. Comp Neurol.* **261**(3):405-422.
122. Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Squire, L. R. und Amaral, D. G. (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J. Neurosci.* **16**(16):5233-5255.
123. Ribak, C. E. und Peterson, G. M. (1991). Intragranular mossy fibers in rats and gerbils form synapses with the somata and proximal dendrites of basket cells in the dentate gyrus. *Hippocampus* **1**(4):355-364.
124. Rowan, A. J. und Scott, D. F. (1970). Major status epilepticus. A series of 42 patients. *Acta Neurol. Scand.* **46**(4):573-584.
125. Sato, M., Racine, R. J. und McIntyre, D. C. (1990). Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*

76(5):459-472.

126. Scharfman, H. E., Goodman, J. H., Du, F. und Schwarcz, R. (1998). Chronic changes in synaptic responses of entorhinal and hippocampal neurons after amino-oxyacetic acid (AOAA)-induced entorhinal cortical neuron loss. *J. Neurophysiol.* **80(6):3031-3046.**
127. Schmitz, D., Empson, R. M., Gloveli, T. und Heinemann, U. (1997). Serotonin blocks different patterns of low Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex, but not hippocampus. *Neuroscience* **76(2):449-458.**
128. Schuchmann, S., Meierkord, H., Stenkamp, K., Breustedt, J., Windmuller, O., Heinemann, U. und Buchheim, K. (2002). Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J. Neurophysiol.* **87(6):2929-2935.**
129. Scotti, A. L., Kalt, G., Bollag, O. und Nitsch, C. (1997). Parvalbumin disappears from GABAergic CA1 neurons of the gerbil hippocampus with seizure onset while its presence persists in the perforant path. *Brain Res.* **760(1-2):109-117.**
130. Scoville, W. B. und Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem.* **20(1):11-21.**
131. Shirasaka, Y. und Wasterlain, C. G. (1994). Chronic epileptogenicity following focal status epilepticus. *Brain Res.* **655(1-2):33-44.**
132. Shneker, B. F. und Fountain, N. B. (2003). Assessment of acute morbidity and mortality in nonconvulsive status epilepticus. *Neurology* **61(8):1066-1073.**
133. Siemes, H. und Bourgeois, B. F. D. (2001). Lokalisationsbezogene (fokale, partielle) Epilepsien und Syndrome. Anfälle und Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp. 94-119.

134. Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A. & Buzsaki, G. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J. Neurosci.* 15:6651-6665, 1995.
135. Sirven, J. I. (2002). Classifying seizures and epilepsy: a synopsis. *Semin. Neurol.* **22**(3):237-246.
136. Sloviter, R. S. (1982). A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res. Bull.* **8**(6):771-774.
137. Sloviter, R. S. (1991). Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* **1**(1):31-40.
138. Sloviter, R. S. (1992). Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci. Lett.* **137**(1):91-96.
139. Sloviter, R. S. und Damiano, B. P. (1981). Sustained electrical stimulation of the perforant path duplicates kainate-induced electrophysiological effects and hippocampal damage in rats. *Neurosci. Lett.* **24**(3):279-284.
140. Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., Bumanglag, A. V., Bender, R. A. und Frotscher, M. (2003). "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J. Comp Neurol.* **459**(1):44-76.
141. Soriano, E., Martinez, A., Farinas, I. & Frotscher, M. Chandelier cells in the hippocampal formation of the rat: the entorhinal area and subicular complex. *J. Comp Neurol.* 337:151-167, 1993.
142. Spencer, S. S., Spencer, D. D., Williamson, P. D. und Mattson, R. (1990). Combined depth and subdural electrode investigation in uncontrolled

epilepsy. *Neurology* **40**(1):74-79.

143. Standley, C. A., Mason, B. A. & Cotton, D. B. Differential regulation of seizure activity in the hippocampus of male and female rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173:1160-1165, 1995.
144. Sun, L., Shipley, M. T. und Lidow, M. S. (2000). Expression of NR1, NR2A-D, and NR3 subunits of the NMDA receptor in the cerebral cortex and olfactory bulb of adult rat. *Synapse* **35**(3):212-221.
145. Thomas, J. Gender difference in susceptibility to picrotoxin-induced seizures is seizure- and stimulation-dependent. *Brain Res. Bull.* 24:7-10, 1990.
146. Treiman, D. M. a. H. U. (1998). Experimental Models of Status epilepticus. *In: Engel, J., Jr. & Pedley, T. A. (Hrsg.): Epilepsy - A Comprehensive Textbook.* Lippincott - Raven, pp. 443-456.
147. Verity, C. M., Ross, E. M. und Golding, J. (1993). Outcome of childhood status epilepticus and lengthy febrile convulsions: findings of national cohort study. *BMJ* **307**(6898):225-228.
148. Vicedomini, J. P. und Nadler, J. V. (1987). A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp. Neurol.* **96**(3):681-691.
149. Wadman, W. J. und Gutnick, M. J. (1993). Non-uniform propagation of epileptiform discharge in brain slices of rat neocortex. *Neuroscience* **52**(2):255-262.
150. Walther, H., Lambert, J. D., Jones, R. S., Heinemann, U. und Hamon, B. (1986). Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci. Lett.* **69**(2):156-161.
151. Wasterlain, C. G., Fujikawa, D. G., Penix, L. und Sankar, R. (1993).

Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus.
Epilepsia **34 Suppl 1**:S37-S53.

152. Wasterlain, C. G., Shirasaka, Y., Mazarati, A. M. und Spigelman, I. (1996). Chronic epilepsy with damage restricted to the hippocampus: possible mechanisms. *Epilepsy Res.* **26**(1):255-265.
153. Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Heinemann, U. und Meierkord, H. (2000). Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiol. Dis.* **7**(4):286-298.
154. Williamson, A., Patrylo, P. R. und Spencer, D. D. (1999). Decrease in inhibition in dentate granule cells from patients with medial temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* **45**(1):92-99.
155. Williamson, P. D., French, J. A., Thadani, V. M., Kim, J. H., Novelly, R. A., Spencer, S. S., Spencer, D. D. und Mattson, R. H. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann. Neurol.* **34**(6):781-787.
156. Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A. und van Haeften, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**:1-24.
157. Wong, B. Y. und Prince, D. A. (1990). The lateral spread of ictal discharges in neocortical brain slices. *Epilepsy Res.* **7**(1):29-39.
158. Wouterlood, F. G., Hartig, W., Bruckner, G. und Witter, M. P. (1995). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the entorhinal cortex of the rat: localization, morphology, connectivity and ultrastructure. *J. Neurocytol.* **24**(2):135-153.
159. Wu, H. Q., Lee, S. C., Scharfman, H. E. und Schwarcz, R. (2002). L-4-chlorokynurenine attenuates kainate-induced seizures and lesions in the

rat. *Exp. Neurol.* **177**(1):222-232.

160. Yaari, Y., Konnerth, A. und Heinemann, U. (1986). Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. II. Role of extracellular potassium. *J. Neurophysiol.* **56**(2):424-438.
161. Zola-Morgan, S., Squire, L. R. und Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6**(10):2950-2967.
162. Zschocke, S. (2002). Ableitung des EEG. *In*: Zschocke, S. (Hrsg.): Klinische Enzephalographie. Springer, Berlin, pp. 47-97.

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AE	anfallsartiges Ereignis
APV	Aminophosphomonovalerat
CA	Cornu ammonis
DG	Gyrus dentatus (<i>dentate gyrus</i>)
EC	entorhinaler Cortex
EEG	Elektroenzephalogramm
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
EZR	Extrazellulärraum
Fp	Feldpotenzial
GABA	γ -Aminobuttersäure
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
IOS	intrinsisches optisches Signal
$[K^+]_o$	extrazelluläre Kaliumkonzentration
LED	Leuchtdiode (<i>light-emitting diode</i>)
MR	multiregional
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PER	perirhinaler Cortex
SSSE	<i>self-sustaining status epilepticus</i>
SUB	Subiculum
TE	temporaler Cortex
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Hartmut Meierkord für die Überlassung des Themas, seine kritischen Anmerkungen zum theoretischen Teil der Arbeit und die bewiesene Geduld.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Katharina Buchheim für die Einweisung in die experimentelle Methode und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit.

Herrn Dr. Martin Holtkamp und Herrn Dr. Florian Weissinger danke ich für Anregungen zur Gestaltung der Dissertation und die Beratung in klinischen Fragen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Herbert Siegmund für die Unterstützung in allen Fragen der Computertechnik und Herrn Dr. Hans-Jürgen Gabriel für seine Hilfe bei technischen Problemen. Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann für die Möglichkeit, sämtliche Ressourcen des Johannes-Müller-Instituts für Physiologie nutzen zu können.

Meiner lieben Kollegin und besten Freundin Julia Matzen danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Tiere, die sie im Rahmen ihres Dissertationsprojektes mit großem Geschick und dementsprechend großem Erfolg operiert und stimuliert hat. Außerdem danke ich ihr für viele gemeinsame Stunden im Institut, in denen wir uns immer wieder gegenseitig ermutigt haben, durchzuhalten, bis auch die letzten Puzzleteile zusammengefügt waren.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir ermöglicht haben, nach Abschluss des Medizinstudiums eine fast zweijährige Auszeit zu nehmen, um mich ausschließlich der Promotion und der Mitarbeit in einer wissenschaftlichen Arbeitsgruppe widmen zu können. Nicht nur die großzügige finanzielle Unterstützung, sondern auch der ermutigende Zuspruch und die liebevolle Zuwendung in schwierigen Zeiten haben mir die Gewissheit und Sicherheit gegeben, dass meine Eltern immer zu mir halten.

Lebenslauf

Mark Michael Elsner

20. März 1975 geboren in Berlin-Charlottenburg
als drittes Kind von
Christa Elsner, geb. Mischke, Statistikerin
Prof. Dr. Eckart Elsner, Statistiker

Schulbildung

1981 - 1987 Grundschule am Ritterfeld, Berlin
1987 - 1994 Lily-Braun-Oberschule (Gymnasium), Berlin
Juni 1994 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1994 - 2001 Studium der Humanmedizin:
1994 - 1997 Vorklinik an der Freien Universität Berlin
1997 - 2001 Klinischer Abschnitt an der Humboldt-Universität
zu Berlin
März 1997 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
August 1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Sonstiges

April 2002 - März 2003 Promotionsstipendium der Charité (studentische
Forschungsförderung)

Wissenschaftliche Beiträge

M. Elsner, J. Matzen, M. Holtkamp, H. Siegmund, H. Meierkord, K. Buchheim

Limbic status epilepticus *in vivo* induces duration-dependent

functional Impairment *in vitro*

13th European Students Conference 2002

Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

29. Oktober- 2. November 2002, Vortrag

M. Elsner, J. Matzen, M. Holtkamp, H. Siegmund, H. Meierkord, K. Buchheim

Gesteigerte Exzitabilität *in vitro* nach limbischem Status epilepticus *in vivo*

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen

und Schweizerischen Sektion der Internationalen Liga gegen Epilepsie

Berlin 3.- 5. April 2003, Vortrag

Z Epileptol 2003 **16** (1): 86

K. Buchheim, M. Elsner, J. Matzen, M. Holtkamp, H. Siegmund, H. Meierkord

Increased vulnerability *in vitro* after limbic status epilepticus *in vivo*

25th International Epilepsy Congress

Lissabon 12.- 16. Oktober 2003, Vortrag.

Epilepsia 2003 **44** (Suppl. 8): 45

Erklärung an Eides statt

Der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin entsprechend erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und hierfür ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin, den

Mark Elsner