

Dissertation

Heiner Kolp

27. Januar 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Historischer Überblick der medikamentösen Epilepsitherapie	2
1.2	Synaptische Plastizität	4
2	Material und Methoden	6
2.1	Chemikalien und Lösungen	6
2.1.1	Verwendete Chemikalien	6
2.1.2	Herstellen der Lösungen	6
2.2	Geräte	6
2.3	Versuchstiere	6
2.4	Methoden	6
2.4.1	Pilokarpininjektion	6
2.4.2	Präparation der Hirnschnitte	7
2.4.3	Elektrophysiologische Messungen	8
3	Ergebnisse	10
3.1	Einfluss von Bromid auf die Langzeitpotenzierung	10
3.2	Charakterisierung der Membraneigenschaften	13
3.3	Stimulations-Antwort-Verhalten hippocampaler Pyramidenzellen	15
3.4	Umkehrpotentiale	17

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Historischer Überblick der medikamentösen Epilepsitherapie

Epilepsie ist eine Erkrankung des Gehirns die durch eine anhaltende Prädisposition gegenüber epileptischen Anfällen ausgezeichnet ist und die mit neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen einher geht. Ein epileptischer Anfall ist definiert als vorübergehendes Auftreten von Zeichen und/oder Symptomen aufgrund abnormer exzessiver oder synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn[1].

Eine der ersten dokumentierten medikamentösen Therapien im 19. Jahrhundert war die mit Natriumbromid [2][3]. Als offizieller Begründer der medikamentösen Therapie wird Charles Locock genannt[4]. Als damaliger Präsident der Royal Medical and Chirurgical Society kommentierte er 1857 den Artikel seines Kollegen E.H. Sieveking [5] und verwies auf seine eigenen Erfolge mit Bromid [6].

Der Erste Durchbruch gelang dem deutschen Neurologen Alfred Hauptmann 1912 mit der Verwendung von Phenobarbital [7]. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass Phenobarbital bis heute zu den gängigen Medikamenten bei Epilepsien sowohl im Kindes-, als auch Erwachsenenalter zählt [8]. Für die nächsten 30 Jahre dominierten Bromid und Phenobarbital die Therapieregime. Bromid behielt vor allem wegen der langjährigen Erfahrung die Position als Mittel der Wahl, auch wenn Phenobarbital immer mehr durch die Reduktion der psychomotorischen Verlangsamung und anderer neurologischer Nebenwirkungen von Bromid an Bedeutung gewann [9].

Ein Rückgang der Therapie mit Bromid kündigte sich erst 1938 mit der Entdeckung von Phenytoin [10] an. Es hat bis heute einen Stellenwert in der Therapie der Epilepsie im Erwachsenenalter [8].

Die folgenden Jahre waren von immer mehr systematisierten Herangehensweisen geprägt. So erfolgte 1958 die Zulassung von Ethosuximid [11] nach systematischen Versuchen einer einzelnen Substanzgruppe. Die Entdeckung

von Carbamazepin gelang durch den Auftrag an ein schweizer Chemieunternehmen einen Konkurrenten für das kurze Zeit vorher entwickelte Chlorpromazin herzustellen. Die Synthese und Nutzung als Antikonvulsivum gelang den Chemikern Schindler und Blattner [12]. Valproat wiederum war ein zufälliger Erfolg. Französische Wissenschaftler verwendeten es als Trägersubstanz um die antikonvulsive Wirkung anderer Wirkstoffe zu erproben. Da alle Mittel eine Wirkung zeigten, überprüften sie ihre Trägersubstanz und konnten diese als wahren Wirkstoff identifizieren [13]. Zur gleichen Zeit gelang Leo Sternbach die Entwicklung des ersten Benzodiazepins Librium [14]. Innerhalb weniger Jahre erlangte die große Gruppe der Benzodiazepine immer mehr an Bedeutung [15], von der sie bis heute wenn überhaupt nur wenig eingebüßt hat.

Ab dieser Zeit ist die Entwicklung neuer Antiepileptika jedoch kein Ergebnis von Zufallsbefunden mehr. Großangelegte Forschungsaufträge wie zum Beispiel das Anticonvulsant Drug Development Programme des National Institute of Neurological Disorders and Stroke in the United States [16] sind seitdem damit beauftragt die anhaltend unzufriedenstellende medikamentöse Situation zu verbessern. Wichtige Gründe für den Erfolg dieser Forschungsvorhaben waren letztlich auch die neuro- und pathophysiologischen Erkenntnisse über einige der Epilepsie zugrundeliegenden hirnorganischen Veränderungen [17].

Heute stehen den behandelnden Ärztinnen und Ärzten eine Vielzahl von Medikamenten zur Auswahl. Dabei können die verschiedenen Wirkstoffe über ganz unterschiedliche Mechanismen zu einer Reduktion der Symptome führen.

Das Ziel der Therapie ist die Reduktion der Symptome. Hierbei ist das Symptom an dem dieses Ziel gemessen wird häufig die Anfallsfreiheit. 2012 zeigte eine Studie, dass bei 59 % aller Epilepsiepatienten früher oder später Anfallsfreiheit erreicht werden kann. Bei 16 % können eine Anfallsreduktion und/oder anfallsfreie Phasen erreicht werden. Jedoch erreichen 25 % aller Patienten trotz multimodaler Therapien keine Anfallsfreiheit [18].

Bromid hat wegen seiner eingeschränkten Wirksamkeit und seines Nebenwirkungsprofils seine Rolle als Mittel der ersten Wahl verloren. Doch auch heute findet es noch Anwendung in der Behandlung von Kindern und Jugendlichen. Die 2007 von Korinthenberg veröffentlichte Studie stellt ganz klar den Wert von Bromid als Reservemittel dar [19]. Damit wurden unter anderem die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Steinhoff bestätigt, die eine Wirkung von Bromid gerade bei generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (gemäß der damaligen Klassifikation epileptischer Anfälle) in einer klinischen Studie nachwies [20].

In den 1980er und 90er Jahren wurden unterschiedliche Ansätze zur Klärung des Wirkmechanismus von Bromid als Antiepileptikum verfolgt. Balcar veröffentlichte 1987 seine Ergebnisse, dass sich die Vermutung, Bromid würde über eine Beeinflussung des GABA-Metabolismus wirken, nicht be-

stätigt werden konnte [21]. An diesen Gedanken anknüpfend untersuchte Suzuki 1994 Zellkulturen in Hinblick auf das Verhalten der GABA-aktivierten Ströme in kortikalen Neuronen. Es konnten unterschiedliche Effekte nachgewiesen werden [22]. Das Umkehrpotential GABA_A -Rezeptor-vermittelte Chloridkanäle [23] lässt sich durch Substitution von NaCl durch äquimolare Mengen NaBr zu negativeren Werten verschieben. Weiterhin führt die Substitution zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials, die mit steigender Bromidkonzentration zunimmt. Hartmut Meierkord konnte in einem 2000 veröffentlichten Artikel weitere Eigenschaften ergänzen. Unter Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle für Epilepsie, welche durch unterschiedlich veränderte Zell- und Zellmembraneigenschaften charakterisiert sind, lässt sich postulieren, dass Bromid über eine Beeinflussung dieser Eigenschaften wirkt. Weiterhin konnte er eine zuvor postulierte Wirkung über eine Regulierung des zellulären pH-Haushaltes nicht nachweisen. In Hinblick auf die GABA-vermittelte Inhibition konnte er jedoch einen Anstieg der inhibitorischen postsynaptischen Stromamplituden nachweisen [24]. Seit diesen Erkenntnissen gab es keine Fortschritte in der Ergründung der antikonvulsiven Wirkung Bromids. Ziel dieser Arbeit soll es sein, die bisherigen Kenntnisse berücksichtigend, den Wirkmechanismus weiter zu ergründen um mit dem gewonnen Verständnis einen zielgerichteten klinischen Einsatz zu ermöglichen und so die medizinische Versorgung von Patienten mit medikamentenresistenten Anfallsleiden weiter zu verbessern.

1.2 Synaptische Plastizität

Synaptische Plastizität ist eine der wichtigsten Eigenschaften des neuronalen Systems um zu Lernen. Diese Erkenntnis geht bereits auf das Jahr 1949 zurück. Donald Hebb veröffentlichte sein Buch *The organization of behavior* und formulierte, was später als die *Hebb'sche Regel* bekannt wurde: „Wenn ein Axon der Zelle A [...] Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotentialen in Zelle B beiträgt, so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder in beiden Zellen, die bewirken, dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotentials in B größer wird.“ [25]. Bis heute sind die zur synaptischen Plastizität beitragenden Wirkmechanismen Gegenstand der Forschung. 1973 gelang den Forschern Bliss und Lømo der Nachweis der Langzeitpotenzierung. Sie untersuchten das Reiz-Antwort-Verhalten hippocampaler Zellverbände und zeigten, dass auch Stunden nach einer Hochfrequenzstimulation die Amplituden der Antwortpotenziale potenziert waren. Zu den wichtigsten Erkenntnissen dieser Arbeit gehörten zwei vor allen anderen. Erstens führen präsynaptische Impulse zu einer dauerhaften Steigerung der synaptischen Transmission. Zweitens kann diese Steigerung durch Mehrfachstimulation erhöht werden, erreicht jedoch einen Grenzwert.[26] Seitdem

wurden weitere fundamentale Eigenschaften der Langzeitpotenzierung festgestellt. Es existiert ein unterer Grenzwert der überschritten werden muss, um Langzeitpotenzierung auszulösen. Dieser liegt über jenem Grenzwert der für eine einfache synaptische Antwort nötig ist. Ebenso ist ein kooperativer Effekt nachgewiesen. Die Konditionierung mehrerer Synapsen führt zu einem stärkeren Effekt [27]. Die Effekte der Langzeitpotenzierung sind spezifisch für jene Synapsen, die durch die Konditionierung aktiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Langzeitpotenzierung keine generelle Antwort aller Zellen eines Verbandes wie beispielsweise die Reduktion des Ruhemembranpotentials ist.[28].

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Verwendete Chemikalien

2.1.2 Herstellen der Lösungen

2.2 Geräte

2.3 Versuchstiere

Alle Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland; XXXXXXXXXXXXXXXX) durchgeführt. Die Tiere wurden vor dem achten Lebenstag in Gruppen von 12 bis 15 Jungtieren und einer Mutter geliefert. Dann erfolgte die Haltung bei stabilen klimatischen Bedingungen und einem festgelegten Hell-Dunkel-Zyklus mit 12 Stunden Belichtung und Nahrung und Wasser ad libitum. Die Trennung der Tiere von der Mutter erfolgte an Tag XX zu Paaren. Ab Tag XX erfolgte die Einzelhaltung.

2.4 Methoden

Alle angewandten experimentellen Verfahren entsprachen nationalen und internationalen Richtlinien bzgl. der ethischen Verwendung von Tieren (European Council Directive 86/609/EEC).

2.4.1 Pilokarpininjektion

Am Tag der Injektion wurden alle Jungtiere gegen 9 Uhr aus dem Stall in den Tierversuchsraum gebracht und dort von der Mutter getrennt. Anschließend wurden die Tiere gewogen. Die leichtesten zwei Tiere wurden zurück zur Mutter gesetzt. Die Mutter mit den beiden Jungtieren wurde für die

Dauer der Injektion zurück in den Tierstall gebracht. Für die übrigen Tiere erfolgte eine zufällige Aufteilung entweder zur Versuchsgruppe oder zur Kontrollgruppe. Für die Dauer der Injektion befanden sich alle Tiere in einem Sammelkäfig. Dieser wurde mit einer Heizmatte und einer Rotlichtlampe beheizt. Die beiden Gruppen wurden für die eindeutige Zuordnung während der Injektionen farblich unterschiedlich nummeriert.

Um die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilokarpins zu reduzieren wurden alle Tiere mit N-Methylscopolamin-Lösung $100\mu\text{l}$ pro 20g Körpergewicht i.p. injiziert. 30 Minuten später erfolgte für die Versuchstiere die Injektion mit Pilokarpin-Lösung $100\mu\text{l}$ pro 20g Körpergewicht i.p. Kontrolltiere wurden analog mit $100\mu\text{l}$ NaCl-Lösung injiziert.

40 Minuten nachdem das erste Tier einen SE entwickelt hatte, wurde dieser bei allen Versuchstieren mit Diazepam terminiert. Es ist zu bemerken, dass die Entwicklung eines SE bei allen Tieren in einem Zeitraum von fünf bis zehn Minuten nach der Pilokarpininjektion erfolgte. Es wurde allen Tieren $10\text{-}30\mu\text{l}$ Diazepam-Lösung injiziert. Die Dosierung erfolgte abgestimmt auf die Ausprägung des SE und der Anfälle während des SE. Bei Bedarf wurden $10\mu\text{l}$ Diazepam nachgegeben. Direkt nach der Injektion, bevor eine Wirkung eintreten konnte, wurde allen Tieren frisch angesetzte Glukoselösung mit einer Pipette angeboten. Sobald die Tiere schliefen, wurden ihnen zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten $200\mu\text{l}$ NaCl-Lösung s.c. verabreicht. Nach 60 Minuten erfolgte eine zweite Gabe von NaCl-Lösung s.c.

Nach der zweiten Gabe von NaCl-Lösung wurden alle Tiere zurück zur Mutter gegeben. Am ersten Injektionstag wurden alle Tiere während der Schlafphase nach Injektion des Diazepams eindeutig an den Pfoten tätowiert. An den folgenden Tagen wurden die Tätowierungen kontrolliert und gegebenenfalls erneuert.

2.4.2 Präparation der Hirnschnitte

Die Präparation der Hirnschnitte erfolgte immer nach demselben festgelegten Schema um eine gleichbleibende Qualität zu sichern.

Zunächst erfolgte eine tiefe Diethylether-Narkose, welche durch einen Schmerzreiz und die dabei ausbleibende Reaktion des Tieres kontrolliert wurde. Bei ausreichend tiefer Narkose erfolgte die Dekapitation mithilfe einer Guillotine. Der abgetrennte Kopf wurde sofort in einen zuvor bereitgestellten breitbasigen Behälter gelegt, in dem sich mit Carbogen ($95\% \text{CO}_2$, $5\% \text{O}_2$) eiskühlte Succrose-Lösung befand. Die weitere Präparation erfolgte in jenem Gefäß. Der nächste Schritt war eine mediane Inzision der Kopfhaut mit einem Skalpell mit der der Schädelknochen freigelegt wurde. Anschließend erfolgte

mit einer schmalschneidigen Schere die Eröffnung des Schädels vom Foramen magnum aus nach kranial bis hin zum Bregma. Hierbei wurde idealerweise auch die harte Hirnhaut (Dura mater) bereits aufgetrennt. Nach zwei lateralen Schnitten zur Durchtrennung des Os occipitale am Foramen magnum konnte die Schädeldecke mithilfe einer Pinzette vorsichtig zur Seite aufgeklappt werden. Mit einem Skalpell wurde das Kleinhirn (Cerebellum) und Teile des Hirnstamms entfernt. Durch einen gebogenen Spatel konnte nun das verbleibende Gehirn entfernt und in ein sauberes, mit eisgekühlter, durch Carbogen begaster Succrose gefülltes Transportgefäß gegeben werden. Zwischen Dekapitierung und Einfügen in das Transportgefäß sollten nie mehr als 60 Sekunden vergehen.

Im Anschluss wurde das Gehirn mit handelsüblichem Sekundenkleber auf dem Schnittblock der Schnittkammer so fixiert, dass die occipitale Seite des Gehirns zur Schneidklinge und die Unterseite der Temporallappen nach oben wiesen. Sobald das Gehirn aufgebracht war, wurde die Schnittkammer mit eisgekühlter Succrose-Lösung befüllt und mit Carbogen begast. Daraufhin wurden mit dem Vibratom $400\mu\text{m}$ Dicke Schnitte bei einem Vortrieb von $0,6\text{mm}$ pro Sekunde im Bereich des Hippocampus angefertigt. Die Region des Hippocampus wurde dann auf der Klinge liegend abgetrennt und mit einer Transferpipette in die Aufbewahrungskammer überführt.

2.4.3 Elektrophysiologische Messungen

Um möglichst störfreie und adäquate elektrophysiologische Messungen durchzuführen, befand sich der Messplatz in einem faradayschen Käfig auf einem vibrationsgedämpften Tisch. Oberhalb der Messkammer befand sich ein Stereomikroskop mit einer Kaltlichtquelle zur genauen Positionierung der Elektroden.

Bis zu zwei Hirnschnitte ruhte in der Messkammer auf einem Nylonnetz, umspült von mit Carbogen begaster Messlösung und bei durch einen Temperaturregler konstant gehaltener Temperatur von $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Die Flussrate wurde dabei durch eine Rollerpumpe konstant gehalten. Nach Einbringen der Schnitte in die Messkammer wurde immer eine Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten abgewartet, bevor Messungen durchgeführt wurden.

Für Feldpotentialmessungen befanden sich zu beiden Seiten der Messkammer jeweils eine Stimulations- und eine Ableitelektrode, montiert auf einem Mikromanipulator. Die eigentliche Elektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht in einer mit Messlösung gefüllten Borosilikatpipette mit einem Spitzenwiderstand von $2\text{-}3\text{ M}\Omega$. Die Stimulationselektroden waren mit einem Impulsgenerator verbunden, welcher über einen Frequenzregulator kontrolliert wurde. Die Ableitelektroden gaben über einen Vor- und einen Hauptverstärker ihr Signal an einen Stromwandler, welcher die Information weiter

an einen Rechner gab.

Für die Intrazellulären Messungen befand sich auf der einen Seite der Messkammer eine Stimulationselektrode, analog zu den Feldpotentialmessungen. Auf der anderen Seite befand sich die intrazelluläre Elektrode auf einem schrittmotorgetriebenen Mikromanipulator. Sie bestand aus einem dünnem chloriertem Silberdraht, der in eine mit intrazellulärer Lösung befüllte Glasspipette eingebracht war. Die intrazelluläre Elektrode war ebenfalls über einen Vor- und einen Hauptverstärker, und einen Stromwandler mit einem Rechner verbunden.

Am Rechner erfolgte die Darstellung und Bearbeitung der Ableitungen über das Programm Signal 2.16. Ebenso war es uns mithilfe von Signal umgekehrt möglich die Zelle intrazellulär mit verschiedenen Stromprotokollen zu erzeugen.

Die Speicherung der Daten erfolgte am Ende in digitaler Form auf Speichermedien.

Bei der Auswertung der Daten benutze ich den Begriff Baseline. In dieser Arbeit definiere ich ihn als den Zeitraum des Beginns einer Messung in dem sich die Hirnschnitte in relativer Ruhe befinden. Am Beispiel der Feldpotentialmessungen sind es die ersten 20 Minuten vom Beginn der Messung bis zur HFS.

Ziehen von Pipetten

Feldpotentialmessungen

Intrazelluläre Messungen

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Einfluss von Bromid auf die Langzeitpotenzierung

Die Anwendung eines Hochfrequenzstimulationsprotokolls an Zellen der CA1-Region des Hippocampus löst üblicherweise eine Langzeitpotenzierung der synaptischen Antworten aus. Zu Beginn jeder Aufnahme werden bei halbmaximaler Stimulationsstärke stabile fEPSP über einen Zeitraum von 20 min gemessen um das Ausgangsniveau festzustellen. Anschließend wird eine HFS (100 Hz für 1 s) bei maximaler Stimulationsstärke durchgeführt. Die Auswirkung der HFS wird für 60 min bei wiederum halbmaximaler Stimulationsstärke gemessen um eine mögliche LTP zu erfassen.

Für Versuche unter therapeutischen Bedingungen wurden 20 mmol NaCl der Nährlösung ACSF isoosmolar durch NaBr substituiert.

Diese Hochfrequenzstimulation führt bei Hippocampusschnitten von unbehandelten Tieren ohne NaBr zu einer kurzfristig starken Erhöhung der fEPSP-Amplitude, die im Verlauf der nächsten 60 min auf einen stabilen Wert von $110 \pm 5\%$ des Ausgangsniveaus absinkt.

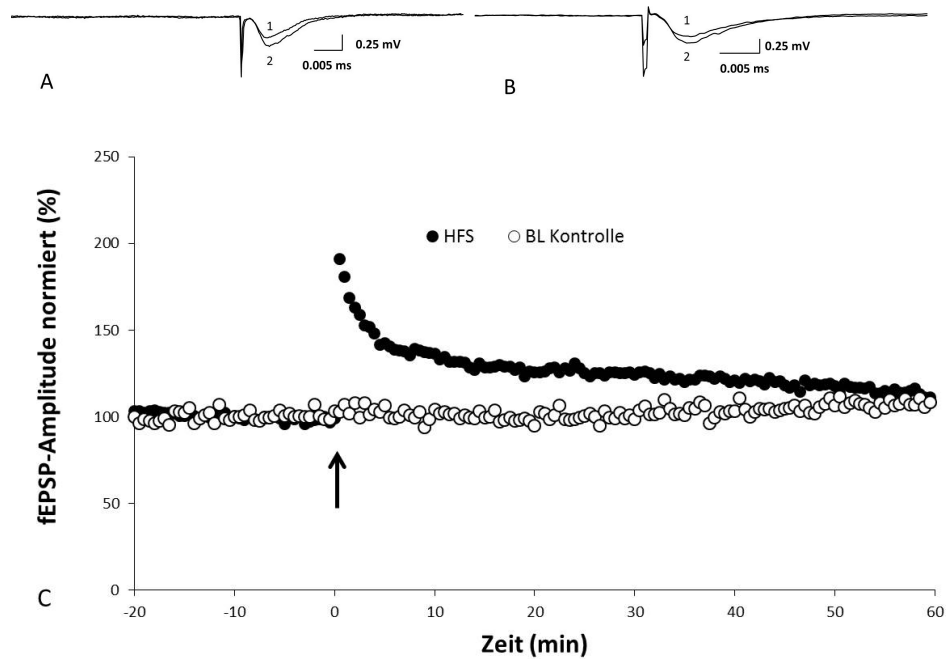


Abbildung 3.1: Repräsentative Originalaufzeichnungen von Feldpotentialmessungen an Hippocampusschnitten von unbehandelten Tieren. **A** zeigt exzitatorische postsynaptische Potentiale für eine Einzelstimulation im Feld (fEPSP) während der Registrierung des Ausgangsniveaus (1) und am Ende der Registrierung nach Hochfrequenzstimulation (2) in ACSF Nährlösung. **B** analog unter Verwendung einer modifizierten Nährlösung. In dieser sind 20 mmol NaCl isoosmolar durch NaBr substituiert. **C** fEPSP-Amplituden normiert auf den Mittelwert der Ausgangsregistrierung. Während der durch die ausgefüllten Symbole dargestellten Messung wird zum Zeitpunkt Null (Pfeil) die Hochfrequenzstimulation durchgeführt. Die geschlossenen Symbole zeigen den Verlauf einer Kontrollmessung ohne Hochfrequenzstimulation.

Die Verwendung der modifizierten Nährlösung ACSF/Br führt zu einer Erhöhung der fEPSP-Amplitude auf $113 \pm 7\%$ der Ausgangswerte. Damit unterscheiden sich diese beiden Gruppen nicht signifikant.

Die HFS an Hippocampusschnitten von mit Pilocarpin behandelten Tieren führt zu einem Anstieg der fEPSP-Amplituden auf $126 \pm 9\%$. Die isoosmolare Substitution von 20 mmol NaCl mit NaBr vermindert diesen Anstieg auf $114 \pm 7\%$. Der Unterschied hierbei ist jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

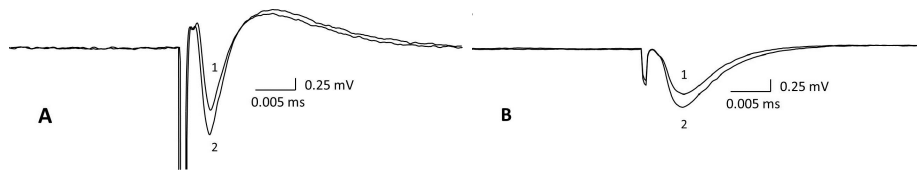


Abbildung 3.2: Repräsentative Originalregistrierungen von Feldpotentialmessungen an Hippocampusschnitten von mit Pilocarpin behandelten Tieren. Zeitpunkt (1) ist während der Registrierung des Ausgangsniveaus, Zeitpunkt (2) am Ende der Registrierung nach Hochfrequenzstimulation. **A** Stellt eine Messung mit ACSF als Nährlösung dar, **B** eine Messung unter Verwendung von ACSF/Br. Diese unterscheiden sich durch die isoosmolare Substitution von 20 *mmol* NaCl durch NaBr.

Für beide Versuche wurde durch Kontrollen ohne HFS gezeigt, dass die fEPSP-Amplitude das Ausgangsniveau beibehält.

In den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind beispielhaft fEPSPs für die verschiedenen Gruppen dargestellt. Abbildung 3.3 vergleicht die LTP-Werte der einzelnen Gruppen grafisch.

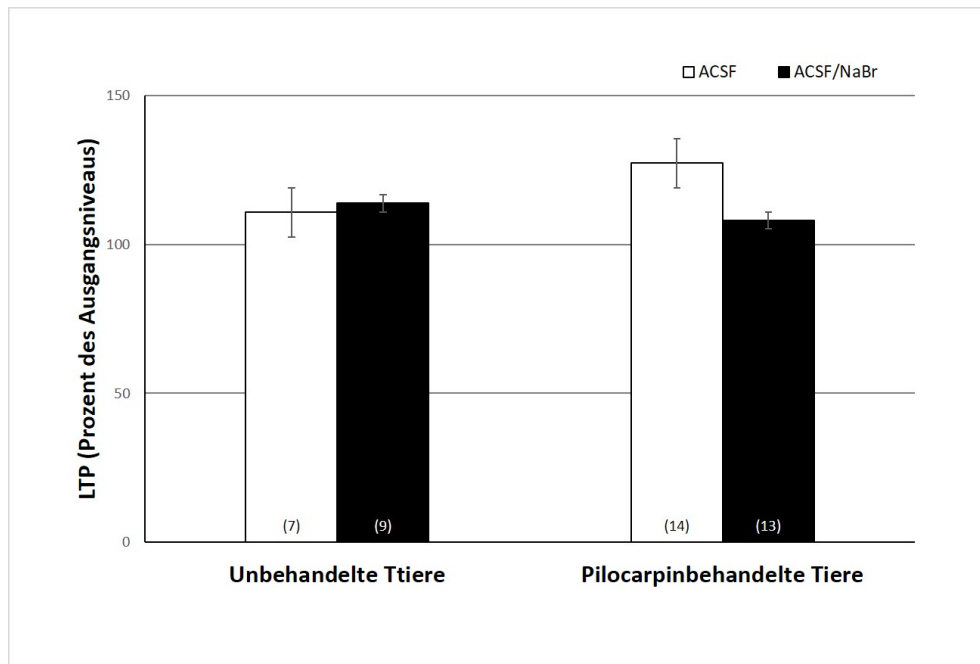


Abbildung 3.3: Vergleich der Langzeitpotenzierung (Prozent des Ausgangsniveaus) 60 min nach Hochfrequenzstimulation mit Darstellung des Standardfehlers und Angabe der Anzahl der verwendeten Präparate (Zahlen in Klammern). Bei Präparaten von unbehandelten Tieren gibt es keinen Unterschied zwischen der Verwendung von herkömmlicher Nährlösung ACSF und der modifizierten Nährlösung ACSF/NaBr, welche NaBr enthält. Wenngleich die Langzeitpotenzierung bei mit Pilocarpin behandelten Tieren unter Verwendung von ACSF im Mittel erhöht ist, unterscheiden sich auch diese Werte nicht signifikant von den anderen Gruppen. In der mit NaBr behandelten Gruppe der mit Pilocarpin behandelten Tiere liegt die Langzeitpotenzierung auf dem Niveau der unbehandelten Tiere. Insgesamt wurden Messungen an Hippocampuschnitten von sechs unbehandelten Tieren und zwölf mit Pilocarpin behandelten Tieren verwendet.

3.2 Charakterisierung der Membraneigenschaften

Nach Bestimmung der synaptischen Plastizität wurden die Membraneigenschaften einzelner Zellen charakterisiert. Hierzu wurden Pyramidenzellen der CA1-Region mit Hilfe von scharfen Mikroelektroden sogenannten sharp micro electrodes identifiziert und durch einen Haltestrom auf einem Membran-

potential bei -70 mV stabilisiert. Die Zellen zeigten während einer Zeit von 10 min ein stabiles Verhalten, bevor sie gemessen wurden. Ohne den Haltestrom musste jede Zelle ein Ruhemembranpotential von -55 mV oder negativer aufweisen. Durch intrazelluläre Strominjektionen in Höhe von -1.3 nA bis $+1.4\text{ nA}$ (in Schritten von 0.1 nA) wurden Strom-Spannungs-Relationen gemessen und für die Berechnung der Membraneigenschaften genutzt.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Membraneigenschaften sind in Tabelle 3.1 zusammenfassend dargestellt. Im Ganzen ergaben sich zwei signifikante Unterschiede: die Membranzeitkonstante wurde durch die Verwendung der modifizierten Nährlösung ACSF/NaBr in der Gruppe der pilocarpinbehandelten Tiere erhöht; in der Gruppe der unbehandelten Tiere erhöhte sich das Potenzial der Nachhyperpolarisation AHP unter Verwendung der modifizierten Nährlösung ACSF/NaBr.

Membraneigenschaften	Kontrolle		Pilocarpin	
	ACSF (n=11)	ACSF/NaBr (n=12)	ACSF (n=18)	ACSF/NaBr (n=14)
Widerstand (MΩ)	47 ± 7	53 ± 5	36 ± 1	31 ± 3
Membranzeitkonstante (ms)	$9,1 \pm 0,6$	$8,6 \pm 1,1$	$8,4 \pm 0,7^A$	$10,6 \pm 0,6^A$
voltage sag (mV)	$2,5 \pm 0,8$	$3,9 \pm 1,0$	$2,8 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,4$
AHP (mV)	$-6,9 \pm 0,8^B$	$-9,6 \pm 1,0^B$	$-8,9 \pm 1,0$	$-8,2 \pm 0,9$
APs	$11,8 \pm 2,2$	$8,8 \pm 2,9$	$9,1 \pm 1,4$	$6,5 \pm 0,5$

Tabelle 3.1: Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm SEM. Werte, die mit einem gleichen hochgestellten Buchstaben markiert sind, unterscheiden sich voneinander signifikant. Die Werte für den voltage sag, die AHP und die Anzahl der APs sind für eine Stimulation von $+1\text{ nA}$ dargestellt

Für die Zellen der Pilo-Tiere in Standardlösung ergeben die Messungen eine Membranzeitkonstante mit dem Mittelwert von $8,4 \pm 0,7\text{ ms}$. Die Substitution von NaBr erhöht den Mittelwert auf $10,6 \pm 0,6\text{ ms}$.

Der Mittelwert für das AHP von Kontrolltieren in Abwesenheit von NaBr

liegt bei $-6,95 \pm 0,83 \text{ mV}$. Die Substitution von NaBr erniedrigt diesen Wert auf $-9,62 \pm 1,06 \text{ mV}$.

In Abbildung 3.4 sind repräsentative Originalregistrierungen des Membranpotentials von Hirnschnitten aller Versuchsgruppen sowohl unter Kontroll- als auch unter Versuchsbedingungen dargestellt. Die verschiedenen Kurven sind durch hyper- und depolarisierende Strominjektionen ausgelöst.

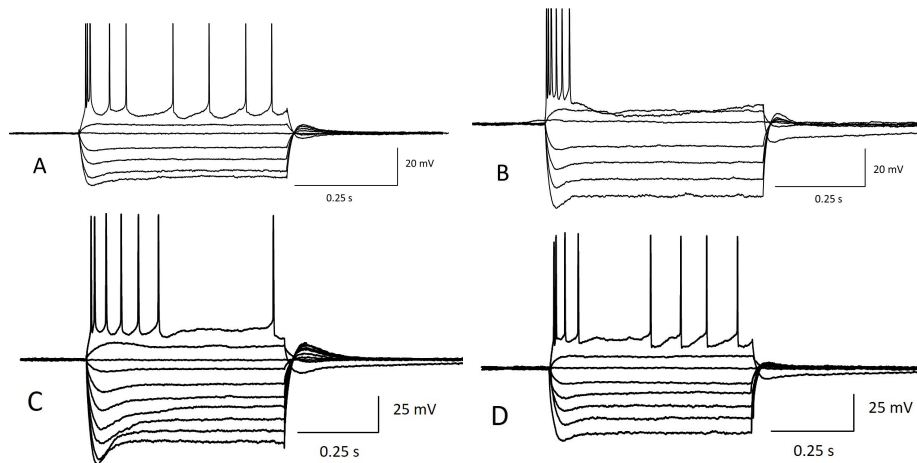


Abbildung 3.4: Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen von Spannungskurven einzelner Zellen aus Hippocampuschnitten. Es erfolgte eine intrazelluläre Strominjektion mit Stromstärken zwischen $-1,3 \text{ nA}$ und $+1,4 \text{ nA}$. Zur besseren Übersicht wurden nicht alle Spannungsverläufe dargestellt. Ausgangsniveau jeder Messung ist ein Ruhemembranpotential von -70 mV . Die Kurven **A** und **B** repräsentieren Schnitte von unbehandelten Tieren, während die Kurven **C** und **D** Schnitte von mit Pilocarpin behandelten Tieren darstellen. Die Schnitte von **A** und **C** wurden in herkömmlicher Nährlösung ACSF gemessen. Die Schnitte **B** und **D** in modifizierter Nährlösung ACSF/NaBr.

3.3 Stimulations-Antwort-Verhalten hippocampaler Pyramidenzellen

Um das Stimulus-Antwort-Verhalten zu charakterisieren, wurden die Amplituden der IPSPs gemessen. Es erfolgte eine extrazelluläre Feldstimulation mit steigender Stromstärke zwischen $0,02 \text{ mA}$ und $0,30 \text{ mA}$. Nach jeder Stimulation wurde die Stromstärke um $0,02 \text{ mA}$ erhöht. Die Ableitung der IPSPs erfolgte intrazellulär über scharfe Mikroelektroden. In Abbildung 3.5

sind Beispielkurven jeweils für Messungen an unbehandelten Tieren und mit Pilocarpin behandelten Tieren dargestellt.

In Abwesenheit von NaBr unterscheiden sich die Amplituden von Kontrolltieren und Pilo-Tieren nicht signifikant (Two-Way-ANOVA). Der Mittelwert liegt bei Kontrolltieren bei $6,15 \pm 0,85 \text{ mV}$ und für Pilo-Tiere bei $5,39 \pm 1,70 \text{ mV}$.

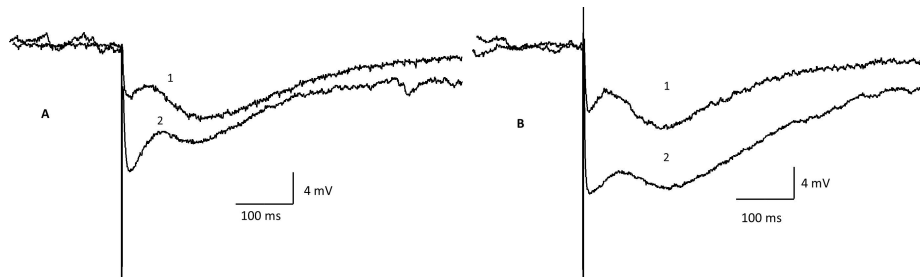


Abbildung 3.5: Dargestellt sind Beispielkurven eines IPSP des Input-Output-Protokolls bei einer Stimulation mit 0.3mA. **A** stellt Kurven eines Kontrolltieres dar. **B** stellt Kurven eines Pilo-Tieres dar. Die mit 1 beschrifteten Verläufe stellen den Versuch in Standardlösung, die mit 2 beschrifteten Verläufe den Versuch unter Substitution mit NaBr dar.

Unter Austausch von 20mmol NaCl durch 20mmol NaBr erfolgt bei beiden Versuchsgruppen eine Steigerung der IPSP-Amplituden. Bei der Kontrollgruppe erhöht sich der Mittelwert auf $9,28 \pm 1,64 \text{ mV}$ (Two-Way-ANOVA). Bei Pilo-Tieren führt die Substitution mit NaBr zu einer Steigerung der Amplituden auf $13,04 \pm 2,23 \text{ mV}$ im Mittelwert (Two-Way-ANOVA). Damit sind unter Versuchsbedingungen die Werte von Zellen von Pilo-Tieren signifikant höher als die Werte der Zellen von Kontrolltieren.

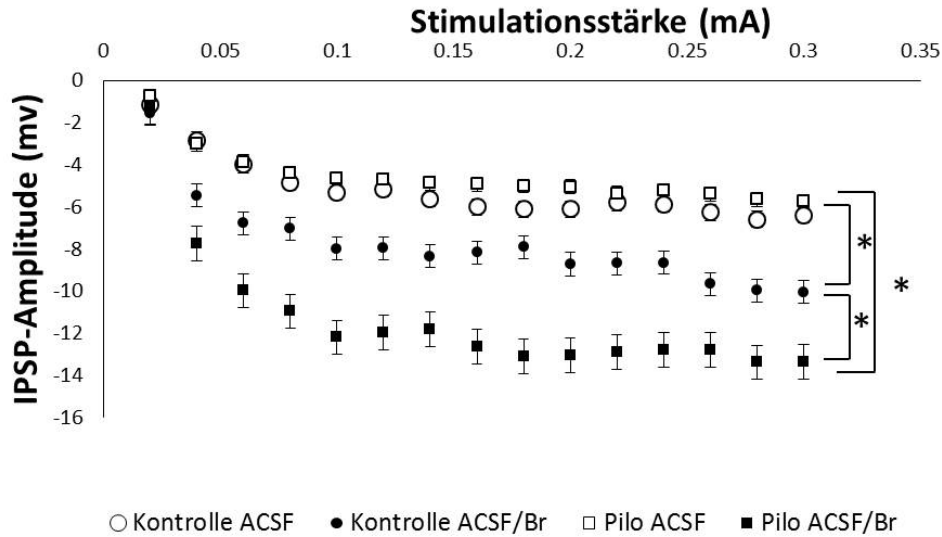


Abbildung 3.6: IPSP-Amplituden in Abhängigkeit der Stimulationsstärke. Um die halbmaximale Stimulationsstärke zu bestimmen wurden Schaffer-Kollateralen in Schritten von 0.02 mA bis maximal 0.3 mA stimuliert und die IPSP-Amplituden gemessen. Mit einem Sternchen $*$ markierte Kurven unterscheiden sich voneinander signifikant.

Der Test auf Signifikanz erfolgte in allen Gruppen erst ab Stimulationsstärken von 0.6 mV da bei niedrigeren Stimulationsstärken nicht alle Werte normalverteilt waren, sodass ein Test mit Two-Way-ANOVA nicht möglich war.

Abbildung 3.6 stellt alle Input-Output-Kurven zusammenfassend dar.

3.4 Umkehrpotentiale

Im Anschluss an die Messung der Input-Output-Potentiale wurden bei halbmaximaler IPSP-Amplitude intrazelluläre Strominjektionen von -0.5 nA bis 0.3 nA durchgeführt und die durch extrazelluläre Feldstimulation ausgelösten IPSPs registriert. Abbildung XX zeigt exemplarische Messungen.

Die lineare Regression der Werte ermöglicht die Schätzung des Umkehrpotentials des aktivierten Kanals in Form des Schnittpunktes der Regressionsgeraden mit der X-Achse. Die Darstellung der Graphen erfolgt in Abbildung XX.

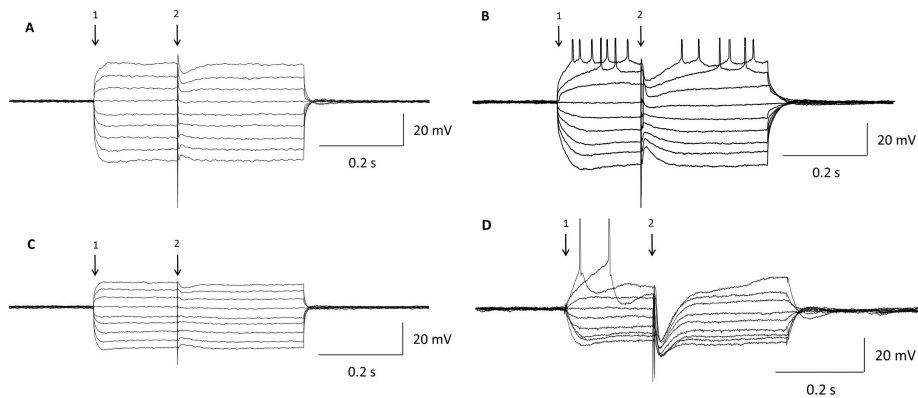


Abbildung 3.7: Intrazellulär abgeleitete Membranpotentiale. Zum Zeitpunkt 1 erfolgte die intrazelluläre Strominjektion in Höhe von -0.5 nA bis 0.3 nA . Zum Zeitpunkt 2 erfolgte die extrazelluläre Stimulation nahe gelegener Interneurone. Je nach Vorpolarisation und Gruppen- bzw. Behandlungszugehörigkeit lassen sich depolarisierende und hyperpolarisierende Effekte beobachten. **A** Kontrolltiere ACSF, **B** Kontrolltiere ACSF/Br, **C** Pilo-Tiere ACSF, **D** Pilo-Tiere ACSF/Br.

Für die Zellen der Hirnschnitte von Kontrolltieren ergibt sich für die Kontrollgruppe ein Umkehrpotential von $-80,8 \pm 2,4 \text{ mV}$, und für ACSF/Br ein Potential von $-89,2 \pm 4,7 \text{ mV}$. Für Schnitte von Pilo-Tieren beträgt das Potential in ACSF $-84,7 \pm 3,9 \text{ mV}$ und in ACSF/Br $-91,0 \pm 6,8 \text{ mV}$. Ein statistisch signifikanter Unterschied lässt sich nicht nachweisen (Mann-Whitney-Test).

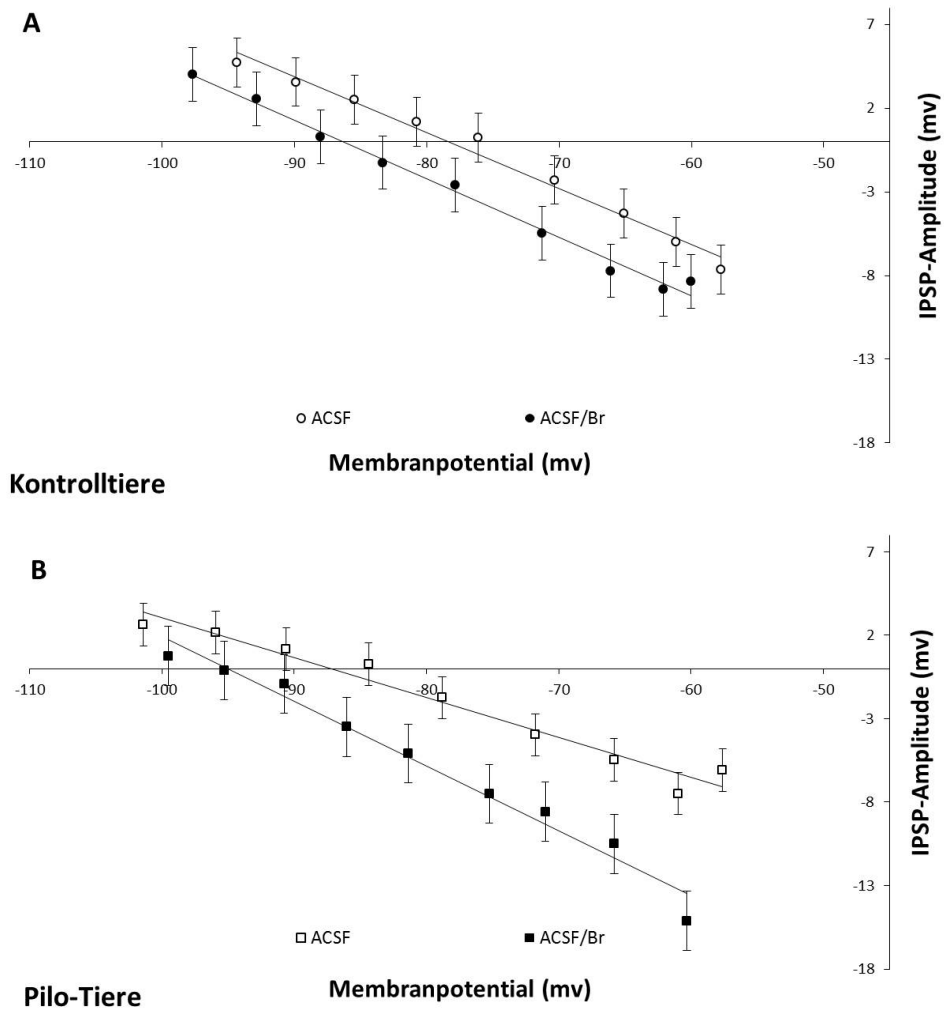


Abbildung 3.8: IPSP-Amplituden in Abhängigkeit vom Membranpotential. Positive Werte bedeuten einen negative Ladungsverschiebung des Zellinneren, negative Werte bedeuten eine positive Ladungsverschiebung. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden ist das geschätzte Umkehrpotential des aktivierten Kanals. **A** zeigt die Werte von Hirnschnitten von Kontrolltieren, **B** die von Pilo-Tieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Robert S. Fisher, Walter Emde van Boas, Warren Blume, Christian Elger, Pierre Genton, Phillip Lee, and Jerome Engel. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the international league against epilepsy (ilae) and the international bureau for epilepsy (ibe). *Epilepsia*, 46(4):470–472, 2005.
- [2] O'Connor. Cases of epilepsy, associated with amenorrhoea and vicarious menstruation, successfully treated with the iodide of potassium. *The Lancet*, 69(1760):525, 1857.
- [3] Robert Bentley Todd. *Clinical lectures on paralysis, disease of the brain, and other affections of the nervous system*. Lindsay & Blakiston, Philadelphia, 1855.
- [4] Martin J. Brodie. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19(10):650–655, 2010.
- [5] Edward H. Sieveking. Analysis of fifty-two cases of epilepsy observed by the author. *Medico-Chirurgical Transactions.*, (40):157–166, 1857.
- [6] M. J. Eadie. Sir charles locock and potassium bromide. *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 42(3):274–279, 2012.
- [7] A. Hauptmann. Luminal bei epilepsie. *Munch Med Wochenschr*, (59):1907–1909, 1912.
- [8] Christian Elger and Ralf Berkenfeld. S1 leitlinie: Erster epileptischer anfall und epilepsien im erwachsenenalter.
- [9] Zeid Yasiry and Simon D. Shorvon. How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. *Epilepsia*, 53 Suppl 8:26–39, 2012.
- [10] H. Houston Merritt and Tracy J. Putnam. Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. *Journal of the American Medical Association*, 111(12):1068–1073, 1938.

- [11] Kenneth W. G. Heathfield and Eric C. O. Jewesbury. Treatment of petit mal with ethosuximide. *British Medical Journal*, 278(7198):565–567, 1961.
- [12] W. Schindler and H. Blattner. Über derivate des iminodibenzyls iminostilben-derivate. *Helvetica Chimica Acta*, 44(3):753–762, 1961.
- [13] H. MEUNIER, G. CARRAZ, Y. NEUNIER, P. EYMARD, and M. AIMARD. Pharmacodynamic properties of n-dipropylacetic acid. *Therapie*, 18:435–438, 1963.
- [14] L. H. Sternbach, G. A. Archer, J. V. Earley, R. I. Fryer, E. Reeder, N. Wasyliv, L. O. Randall, and R. Banziger. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. xxv. structure-activity relationships of aminoalkyl-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones. *Journal of medicinal chemistry*, 8(6):815–821, 1965.
- [15] THOMAS R. BROWNE and J. KIFFIN PENRY. Benzodiazepines in the treatment of epilepsy a review. *Epilepsia*, 14(3):277–310, 1973.
- [16] John H. Kehne, Brian D. Klein, Shamsi Raeissi, and Shalini Sharma. The national institute of neurological disorders and stroke (ninds) epilepsy therapy screening program (etsp). *Neurochemical research*, 42(7):1894–1903, 2017.
- [17] Hansjörg Schneble. Historisches zu epilepsie 009-2013, 2013.
- [18] M. J. Brodie, S. J. E. Barry, G. A. Bamagous, J. D. Norrie, and P. Kwan. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 78(20):1548–1554, 2012.
- [19] Rudolf Korinthenberg, Peter Burkart, Christiane Woelfle, Jürgen Schulte Moenting, and Jan Peter Ernst. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *Journal of child neurology*, 22(4):414–418, 2007.
- [20] Bernhard J. Steinhoff and Rolf Kruse. Bromide treatment of pharmacoresistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: A clinical study. *Brain and Development*, 14(3):144–149, 1992.
- [21] Vladimir J. Balcar, Sandor L. Erdő, Ferenc Joó, Péter Kása, and Joachim R. Wolff. Neurochemistry of gabaergic system in cerebral cortex chronically exposed to bromide in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 48(1):167–169, 1987.
- [22] Setsuo Suzuki, Kaori Kawakami, Fumihiko Nakamura, Shigeko Nishimura, Kazuichi Yagi, and Masakazu Seino. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances gaba-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Research*, 19(2):89–97, 1994.

- [23] G. I. Allen, J. Eccles, R. A. Nicoll, T. Oshima, and F. J. Rubia. The ionic mechanisms concerned in generating the i.p.s.ps of hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 198(1133):363–384, 1977.
- [24] H. Meierkord, F. Grünig, U. Gutschmidt, R. Gutierrez, M. Pfeiffer, A. Draguhn, C. Brückner, and U. Heinemann. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular ph changes and gabaergic inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 361(1):25–32, 2000.
- [25] Donald O. Hebb. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1949.
- [26] T. V. P. Bliss and T. Lømo. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2):331–356, 1973.
- [27] B. L. McNaughton, R. M. Douglas, and G. V. Goddard. Synaptic enhancement in fascia dentata: Cooperativity among coactive afferents. *Brain Research*, 157(2):277–293, 1978.
- [28] William B. Levy and Oswald Steward. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Research*, 175(2):233–245, 1979.