

Dissertation

Heiner Kolp

19. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Epilepsie	2
2	Material und Methoden	3
2.1	Chemikalien und Lösungen	3
2.1.1	Verwendete Chemikalien	3
2.1.2	Herstellen der Lösungen	3
2.2	Geräte	3
2.3	Versuchstiere	3
2.4	Methoden	3
2.4.1	Pilokarpininjektion	3
2.4.2	Präparation der Hirnschnitte	4
2.4.3	Elektrophysiologisches Messungen	5
3	Ergebnisse	7
3.1	Einfluss von Bromid auf die Langzeitpotenzierung	7
3.2	Charakterisierung der Membraneigenschaften	9
3.3	Input-Output Potentiale	11
3.4	Umkehrpotentiale	13

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Epilepsie

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.[4]

dringend korrekte Zitierweise hinterfragen

Eine der ersten dokumentierten medikamentösen Therapien im 19. Jahrhundert war die mit Natriumbromid [7][9]. Als offizieller Begründer der medikamentösen Therapie wird Charles Locock betitelt [1]. Als damaliger Präsident der Royal Medical and Chirurgical Society kommentierte er 1857 den Artikel seines Kollegen E.H. Sieveking [8] und verwies auf seine Erfolge mit Bromid [2].

Der Erste Durchbruch gelang 1912 dem deutschen Neurologen Alfred Hauptmann mit der Verwendung von Phenobarbital. [5]. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass Phenobarbital bis heute zu den gängigen Medikamenten bei Epilepsien sowohl im Kindes-, als auch Erwachsenenalter zählt.[3] Für die nächsten 30 Jahre dominierten Bromid und PB die Therapieregime. Bromid behielt vor allem wegen der langjährigen Erfahrung die Position als Mittel der Wahl, auch wenn PB immer mehr durch die Reduktion der psychomotorischen Verlangsamung und anderer neurologischer Nebenwirkungen von Bromid an Bedeutung gewann. [10]

Ein Rückgang der Therapie mit Bromid kündigte sich erst 1940 mit der Entdeckung von Phenytoin [6]an.

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 LTP-Protokolls an Schaffer-Kollateralen löst Langzeitpotenzierung aus. Nach der Aufnahme einer Baseline bei halbmaximaler Stimulationsstärke wird eine HFS (100 *Hz* für 1 *s*) bei maximaler Stimulationsstärke durchgeführt. Die Aufnahme der LTP erfolgt wiederum bei halbmaximaler Stimulationsstärke.

Die Zugabe von NaBr erfolgt durch isomolare Substitution von 20 *mmol* NaCl der Nährlösung.

Diese Hochfrequenzstimulation führt bei Hirnschnitten von Kontrolltieren 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 BL-Niveaus absinkt. Die Zugabe von NaBr führt zu einer Erhöhung der fEPSP-Amplitude auf $113 \pm 7\%$ der BL-Werte. Damit unterscheiden sich diese beiden Gruppen nicht.

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

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

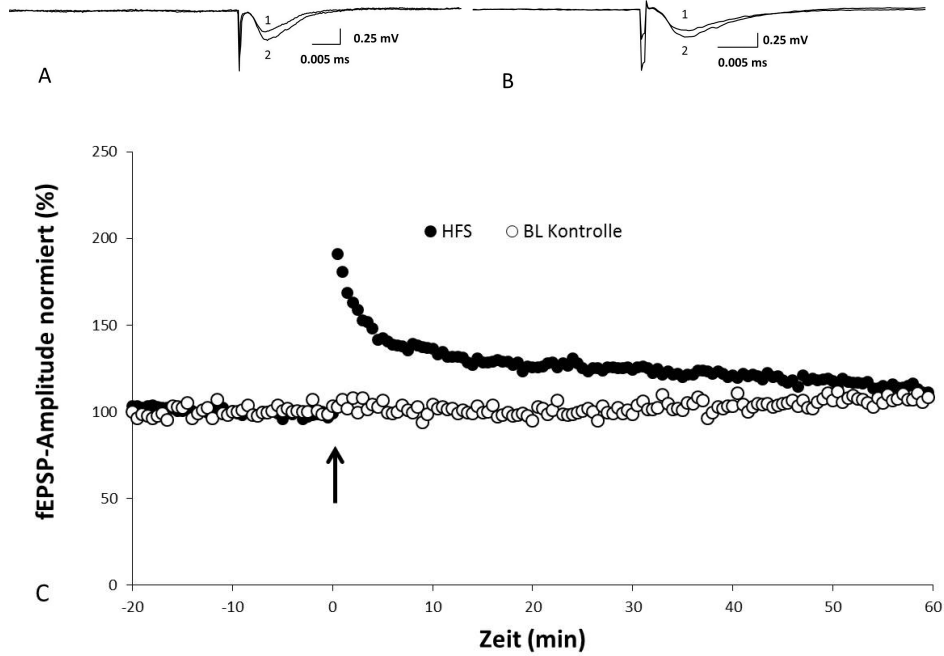


Abbildung 3.1: Beispielhafte Originalaufzeichnungen von Messungen an Schnitten von Kontrolltieren. **A** zeigt EPSPs für eine Einzelstimulation im Feld während der BL (1) und zum Zeitpunkt der LTP (2) ohne NaBr. **B** analog mit NaBr. **C** fEPSP-Amplituden normiert auf 100 % für den Mittelwert der BL. Die ausgefüllten Symbole zeigen den Verlauf, wenn zum Zeitpunkt Null (Pfeil) die HFS durchgeführt wird. Die geschlossenen Symbole zeigen den Verlauf einer Kontrollmessung ohne HFS.

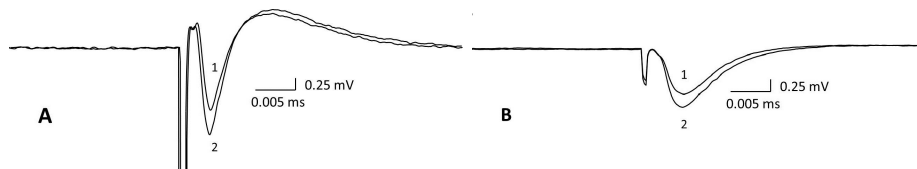


Abbildung 3.2: Beispielmessungen von fEPSPs an Hirnschnitten von Pilo-Tieren. Zeitpunkt (1) ist während der BL, Zeitpunkt (2) während der LTP. **A** ist die Darstellung für ACSF, **B** die Darstellung für ACSF/Br.

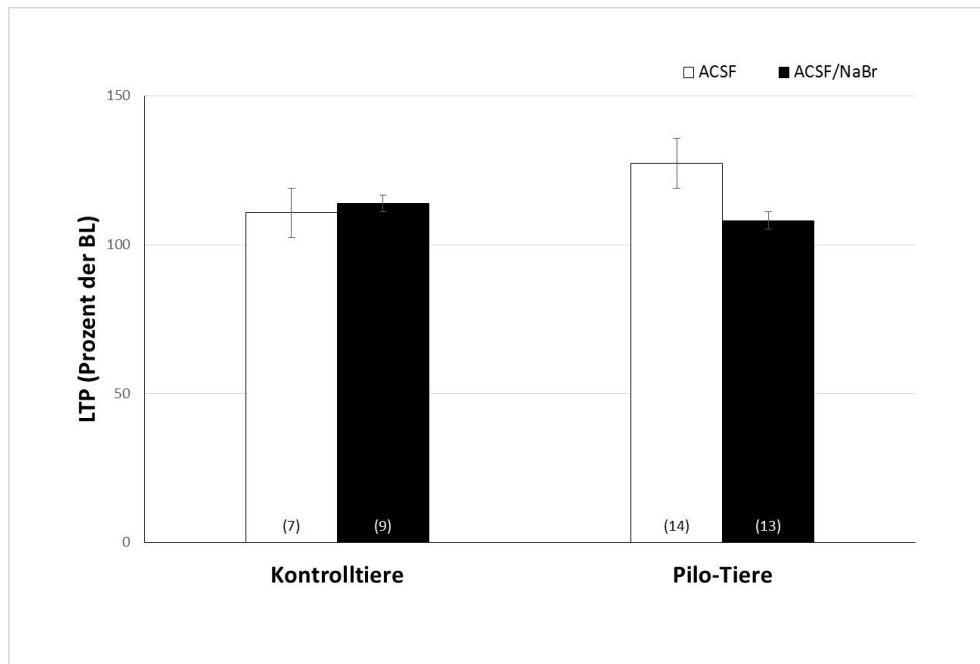


Abbildung 3.3: Vergleich der LTP (Prozent der BL) 60 *min* nach Hochfrequenzstimulation. Bei Kontrolltieren gibt es keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Der graphische Anstieg der LTP bei Pilo-Tieren ohne NaBr ist statistisch nicht signifikant. In der mit NaBr behandelten Gruppe der Pilo-Tiere ist die LTP auf dem Niveau der Kontrolltiere. Insgesamt wurden Schnitte von sechs Kontrolltieren und zwölf Pilo-Tieren verwendet

3.2 Charakterisierung der Membraneigenschaften

Vor der Bestimmung der Umkehrpotentiale wurden die Membraneigenschaften jeder Zelle charakterisiert. Hierzu wurden Pyramidenzellen der CA1-Region mit Hilfe von sharp micro electrodes identifiziert und durch einen Haltestrom auf einem Membranpotential bei -70 mV stabilisiert. 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. Zwei Ergebnisse sind besonders hervorzuheben, da sie einen signifikanten Unterschied für eine Behandlung mit NaBr aufzeigen. Dies sind die Charakterisierung des Membranwiderstandes

bei Zellen von Pilo-Tieren und die Nachhypolarisation bei Zellen von Kontrolltieren.

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 ± 0,6	8,6 ± 1,1	8,4 ± 0,7 ^A	10,6 ± 0,6 ^A
voltage sag (mV)	2,5 ± 0,8	3,9 ± 1,0	2,8 ± 0,8	2,9 ± 0,4
AHP (mV)	-6,9 ± 0,8 ^B	-9,6 ± 1,0 ^B	-8,9 ± 1,0	-8,2 ± 0,9
APs	11,8 ± 2,2	8,8 ± 2,9	9,1 ± 1,4	6,5 ± 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 nA dargestellt

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

Der Mittelwert für das AHP von Kontrolltieren in Abwesenheit von NaBr liegt bei $-6,95 \pm 0,83$ mV. Die Substitution von NaBr erniedrigt diesen Wert auf $-9,62 \pm 1,06$ 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.

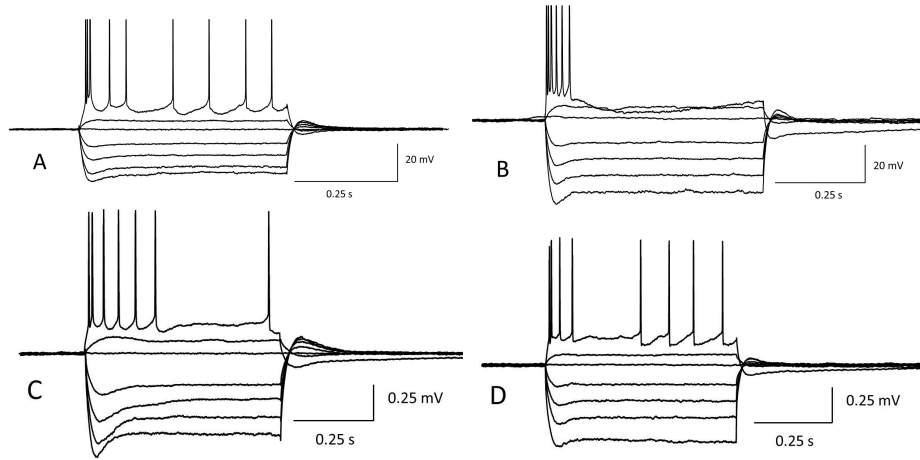


Abbildung 3.4: Dargestellt sind Originalregistrierungen von Spannungskurven von Zellen aus Hirnschnitten die mit Strömen zwischen $-1,3 \text{ nA}$ und $+1,4 \text{ nA}$ intrazellulär stimuliert wurden. Zur besseren Übersicht wurden nicht alle Spannungsverläufe dargestellt. Die Kurven **A** und **B** repräsentieren Schnitte von Kontrolltieren, während die Kurven **C** und **D** Schnitte von Pilo-Tieren repräsentieren. Die Schnitte von **A** und **C** wurden in ACSF gemessen. Die Schnitte **B** und **D** in ACSF/Br.

3.3 Input-Output Potentiale

Um die maximale Stimulus-Antwort-Relation festzustellen wurden bei verschiedenen Stimulationsstärken die Amplituden der IPSPs gemessen. In Abbildung 3.5 sind Beispielkurven jeweils für Versuche an Kontrolltieren und Pilo-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 $5,39 \pm 1,70 \text{ mV}$.

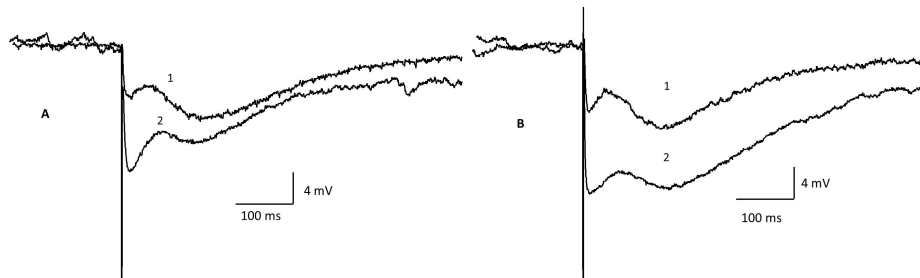


Abbildung 3.5: Dargestellt sind Beispielkurven eines IPSP des Input-Output-Protokolls bei einer Stimulation mit 0.3mA. **A** stellt Kurven eines Kontrolltieres dar. **B** stellt Kurven eines Pilo-Tieres dar. Die mit 1 beschrifteten Verläufe stellen den Versuch in Standardlösung, die mit 2 beschrifteten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

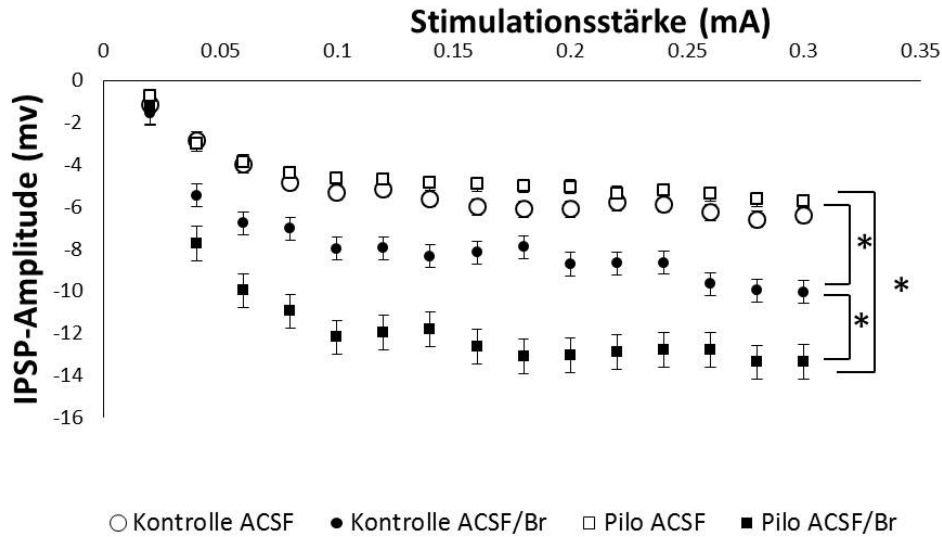


Abbildung 3.6: IPSP-Amplituden in Abhängigkeit der Stimulationsstärke. Um die halbmaximale Stimulationsstärke zu bestimmen wurden Schaffer-Kollaterale in Schritten von 0.02 mA bis maximal 0.3 mA stimuliert und die IPSP-Amplituden gemessen. Mit einem Sternchen * markierte Kurven unterscheiden sich voneinander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

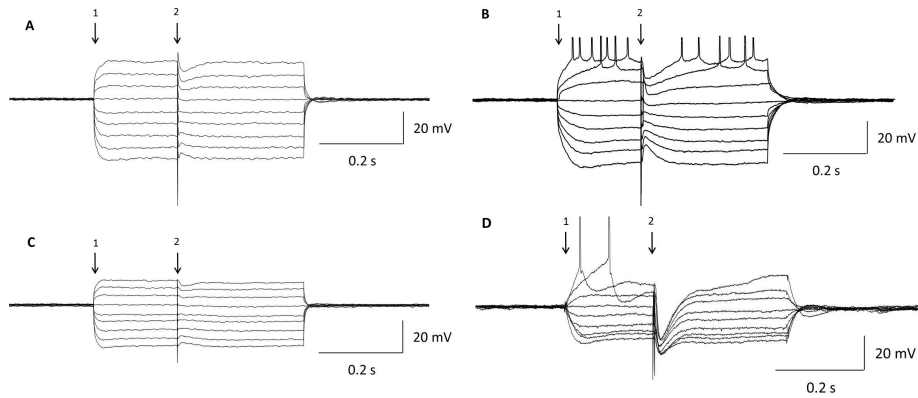


Abbildung 3.7: Intrazellulär abgeleitete Membranpotentiale. Zum Zeitpunkt 1 erfolgte die intrazelluläre Strominjektion in Höhe von -0.5 nA bis 0.3 nA . Zum Zeitpunkt 2 erfolgte die extrazelluläre Stimulation nahe gelegener Interneurone. Je nach Vorpolarisation und Gruppen- bzw. Behandlungszugehörigkeit 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).

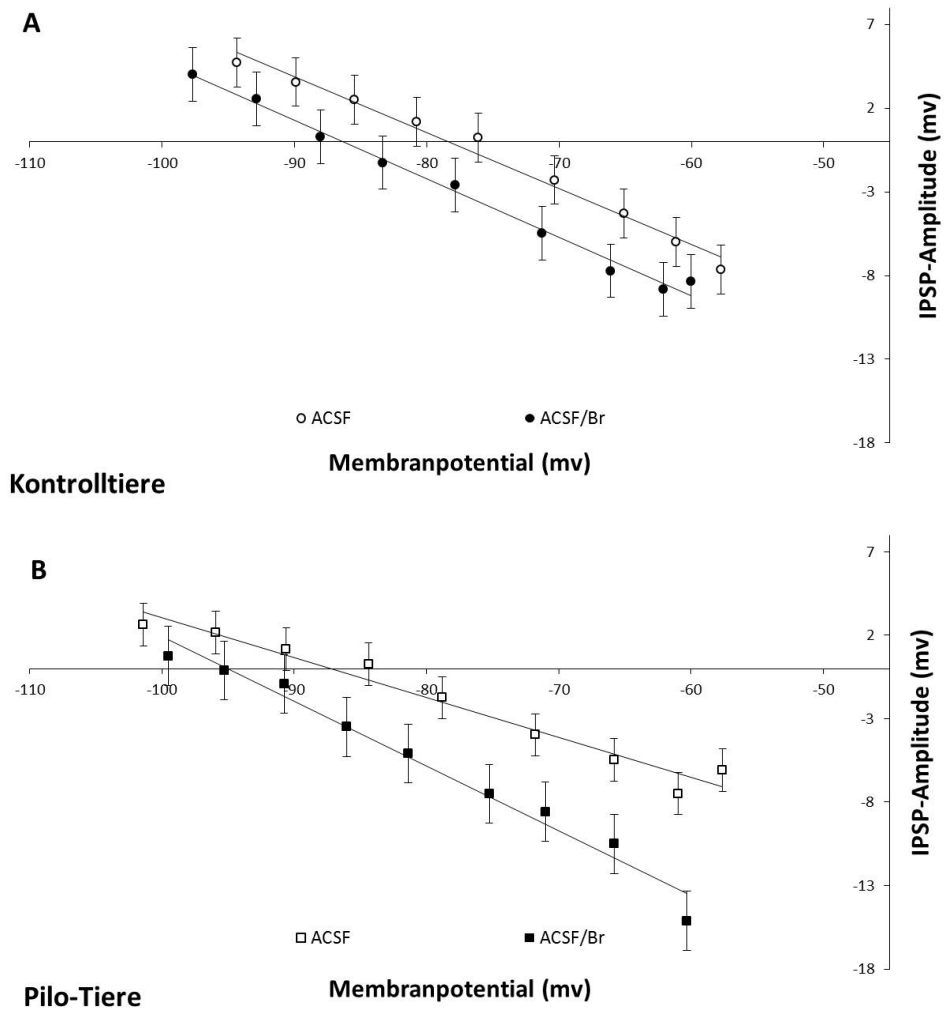


Abbildung 3.8: IPSP-Amplituden in Abhängigkeit vom Membranpotential. Positive Werte bedeuten einen negative Ladungsverschiebung des Zellinneren, negative Werte bedeuten eine positive Ladungsverschiebung. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden ist das geschätzte Umkehrpotential des aktivierten Kanals.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

Literaturverzeichnis

- [1] Martin J. Brodie. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19(10):650–655, 2010.
- [2] M. J. Eadie. Sir charles locock and potassium bromide. *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 42(3):274–279, 2012.
- [3] Christian Elger and Ralf Berkenfeld. S1 leitlinie: Erster epileptischer anfall und epilepsien im erwachsenenalter.
- [4] 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.
- [5] A. Hauptmann. Luminal bei epilepsie. *Munch Med Wochenschr*, (59):1907–1909, 1912.
- [6] 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.
- [7] O’Connor. Cases of epilepsy, associated with amenorrhoea and vicarious menstruation, successfully treated with the iodide of potassium. *The Lancet*, 69(1760):525, 1857.
- [8] Edward H. Sieveking. Analysis of fifty-two cases of epilepsy observed by the author. *Medico-Chirurgical Transactions.*, (40):157–166, 1857.
- [9] Robert Bentley Todd. *Clinical lectures on paralysis, disease of the brain, and other affections of the nervous system*. Lindsay & Blakiston, Philadelphia, 1855.
- [10] 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.