

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum humanarum
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Institut für Physiologie
Professor Dr. Rüdiger Köhling

Dissertationsthema

Funktionelle Veränderung der glutamatergen Übertragung im chronisch-
epileptischen menschlichen Hirnrindengewebe

vorgelegt von
Uwe Robert Koch, geb. 05.10.1962
aus Aachen

Rostock, 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0132-8

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

- 1.1 Epilepsien 1
- 1.2 Entstehung epileptischer Entladungen 2
- 1.3 Ausbreitung epileptischer Entladungen 4
- 1.4 Stand der Forschung 6
 - 1.4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen 6
 - 1.4.2 Untersuchungen am Menschen 8
- 1.5 Zielsetzung 11

2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1 Versuchsgewebe 13
 - 2.1.1 Menschliches Hirngewebe 13
 - 2.1.2 Versuchstiere und Präparationstechnik 14
- 2.2 Erfassung bioelektrischer Aktivität 15
 - 2.2.1 Versuchskammer 15
 - 2.2.2 Feldpotentialableitungen 16
 - 2.2.3 Membranpotentialableitungen 17
- 2.3 Bestimmung des Erregungsniveaus und elektrophysiologische Untersuchungen 17
 - 2.3.1 Epileptogene Bedingungen 18
 - 2.3.2 Versuchsprotokoll 19
- 2.4 Versuchsauswertung 20

3. ERGEBNISSE

- 3.1 Untersuchung der synaptischen Übertragung 21
 - 3.1.1 Spontanaktivität 24
- 3.2 Intrazelluläre Ableitungen 25
 - 3.2.1 Synaptisches Verhalten 25
 - 3.2.2 Intrazelluläre Besonderheiten bei Blockierung der GABA_A-Rezeptoren durch Bicuculin 31
 - 3.2.3 Intrinsische neuronale Entladungseigenschaften 33
- 3.3 Untersuchung der evozierten Potentiale 36
 - 3.3.1 Ableitungen von Feldpotentialen bei Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche bei Schnittpräparaten unter nicht epileptogenen Bedingungen 36
 - 3.3.2 Feldpotentialableitungen bei Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche bei Schnittpräparaten unter epileptogenen Bedingungen 44
- 3.4 Doppelreizexperimente 49
 - 3.4.1 Doppelreizfeldpotentialableitungen unter nicht epileptogenen Bedingungen 49
 - 3.4.2 Doppelreizfeldpotentialableitungen unter epileptogenen Bedingungen 55

4. DISKUSSION

4.1 Neuronale Entladungseigenschaften 61

4.2 Neuronale synaptische Antworten 61

4.3 Synaptische Netzwerkaktivität 63

4.4 Erhöhung der Epileptogenität durch erhöhte Kaliumkonzentration 64

4.5 Kurzzeitplastizität 65

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung 66

6. LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis 68

7. DANKSAGUNG

Danksagung 76

Einleitung

1.1 Epilepsien

Epilepsien sind häufige Erkrankungen des Nervensystems des Menschen. Weltweit sind 0,5% bis 1% aller Menschen von Epilepsien betroffen (Zielinski 1974; Hauser und Kurland, 1975). Etwa 5% aller Menschen erleiden einmal in ihrem Leben, in der Regel im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, einen epileptischen Anfall (Sander und Shorvon 1987). Bei ca. 10% aller Menschen besteht eine latente Krampfbereitschaft. Hauptsymptome epileptischer Anfälle sind Funktionsstörungen des Organismus, die durch abnorme Aktivität des Gehirnes bedingt sind, plötzlich auftreten und vorübergehend sind (Speckmann et al., 1986).

Epileptische Anfälle können sehr unterschiedliche Funktionen des Organismus erfassen. So kann das motorische System betroffen sein, wobei dann oft Muskelzuckungen und Stürze im Vordergrund des Anfalls stehen. Die Funktionsstörungen können aber auch in anderen Bereichen des Gehirns auftreten, so dass sensorische, vegetative oder psychische Symptome den Anfall ausmachen. In diesen Fällen äussern sich epileptische Anfälle durch Gesichtsfeldausfälle, Missempfindungen, Geruchswahrnehmungen, Schwindel, Hautrötungen oder affektive Symptome (Niedermeyer 1990).

Die Unterdrückung epileptischer Anfälle durch eine medikamentöse Therapie ist häufig nicht zu erreichen. Bei 20% bis 30% aller Epilepsiekranken lassen sich die Anfälle nur unvollständig unterdrücken (Elger et al. 1988) und 15% bis 20 % aller Epilepsiekranken sprechen auf antiepileptische Medikamente überhaupt nicht an (Speckmann et al. 1986).

Epileptische Anfälle werden ausgelöst aufgrund exzessiver neuronaler Entladungen des Gehirns. Eine allgemein vertretene Vorstellung stützt sich auf die Annahme, dass epileptische Aktivität durch ein Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung zustande kommt. Nach dieser Hypothese steigert eine vermehrte glutamatvermittelte synaptische Übertragung bzw. gedämpfte γ -Aminobuttersäure (GABA)-abhängige synaptische Hemmung das Erregungsniveau und schliesslich die Synchronisation neuronaler Aktivität derart, dass epileptische Entladungen des Neuronenverbandes entstehen. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen unter Einsatz verschiedener Epilepsiemodelle stützen diese Vermutung.

Epileptische Anfälle lassen sich im EEG charakteristischen Potentialmustern, wie spitzen Wellen

(spikes), steilen Wellen (sharp waves) sowie Spitze-Welle-Komplexen (spike-waves, polyspike-waves) zuordnen. Diese epileptischen EEG-Potentiale entsprechen einem charakteristischen Entladungsmuster der in das epileptische Geschehen einbezogenen Neurone. Ein gemeinsames Merkmal epileptischer Anfälle ist eine plötzlich auftretende, synchrone Entladung von Neuronengruppen des Gehirns. Die Entladung der Neurone beginnt mit einer steilen Depolarisation, die von einer hochfrequenten Serie von Aktionspotentialen überlagert wird. Daran schließt sich eine lang anhaltende plateauförmige Verminderung des Membranpotentials an. Beendet wird dieses Entladungsmuster mit einer steilen Repolarisation, an die sich häufig eine Nachhyperpolarisation anschließt. Diese Sequenz von Membranpotentialänderungen wurden von Goldensohn und Purpura (1963) erstmals beschrieben und von Matsumoto und Marsan (1964) als "paroxysmal depolarisation shift" (PDS) bezeichnet. Diese PDS stellen das für epileptische Aktivität charakteristische Entladungsmuster einzelner Neurone dar.

1.2 Entstehung epileptischer Entladungen

Ausgehend von den oben skizzierten Befunden wurde folgende Erklärung zur Generierung paroxysmaler Depolarisationen entwickelt (Speckmann et al. 1986). Wie aus dem einer Originalregistrierung zugeordnetem Flussdiagramm in Abbildung 1 zu entnehmen ist, liegt der steilen Depolarisation der paroxysmalen Entladung ein Einwärtsstrom von Kalziumionen zugrunde, der potentialabhängig ist und durch exzitatorische postsynaptische Potentiale ausgelöst wird. Dieser transmembranöse Kalziumionenfluss öffnet nichtselektive Kanäle und induziert einen unspezifischen Kationeneinstrom, der die Ausbildung der neuronalen Depolarisation noch verstärkt. Überlagert wird die Depolarisation durch hochfrequente, natriumgesteuerte Aktionspotentiale, die jedoch mit fortschreitender Depolarisation an Amplitude abnehmen. Die Ausbildung der darauffolgenden plateauförmigen Verminderung des Membranpotentials ist auf die Gleichrichtercharakteristik des neuronalen Membranwiderstandes zurückzuführen. Das Neuron befindet sich nun im Kathodenblock und kann keine Aktionspotentiale mehr generieren (Gola 1974).

Die Repolarisation, die die paroxysmale Depolarisation beendet, wird durch spannungs- und kalziumgesteuerte Kaliumionenauswärts- und Chloridioneneinwärtsströme ausgelöst. Es läuft somit eine Folge von Prozessen ab, bei denen ein Einstrom von Kalziumionen und eine Gruppe kalziumabhängiger Ionenströme im Vordergrund stehen.

Aufgrund der zentralen Bedeutung der PDS als charakteristisches Merkmal epileptischer Anfälle sind die Mechanismen, die der PDS zugrunde liegen, intensiv untersucht worden (Prince, 1981; Ayala 1983; Speckmann 1986). Dabei wurden zwei Hypothesen zur Entstehung der PDS entwickelt. Nach der ersten Hypothese entstehen die PDS aufgrund von Änderungen der Membraneigenschaften der einzelnen Neurone. Nach der zweiten Hypothese stellen die PDS vergrößerte exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) dar. So geht unter anderem in Neuronen der Hirnrinde häufig einer PDS ein EPSP voraus. Für die erste Hypothese spricht vor allem, dass PDS vereinzelt, aber auch ohne vorangehendes EPSP auftreten (Ayala 1983) und, dass PDS auch in Neuronen entstehen können, die keinen synaptischen Kontakt zu anderen Nervenzellen besitzen (Speckmann und Caspers 1973). Für die zweite Hypothese spricht, dass PDS in der Hirnrinde von Säugetieren durch Reizung erregender Fasern auslösbar sind, dass bei einer Hemmung der EPSP die PDS verschwinden und, dass die PDS ebenso wie die EPSP in ihrer Amplitude verändert und in ihrer Polarität umgekehrt werden können. Es ist zu vermuten, dass bei der Ausbildung epileptischer Anfälle beide Mechanismen zur Entstehung der PDS zusammenwirken. Die aufgeführten Befunde unterstützen die Bedeutung der synaptischen Prozesse bei der Entstehung epileptischer Aktivität (Schwartzkroin und Prince 1976). Die enge zeitliche Kopplung zwischen EPSP und PDS und das Ausfallen der PDS bei Unterdrückung der EPSP gibt den Mechanismen, die die Grösse der EPSP bestimmen, eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung epileptischer Aktivität (Speckmann et al. 1988).

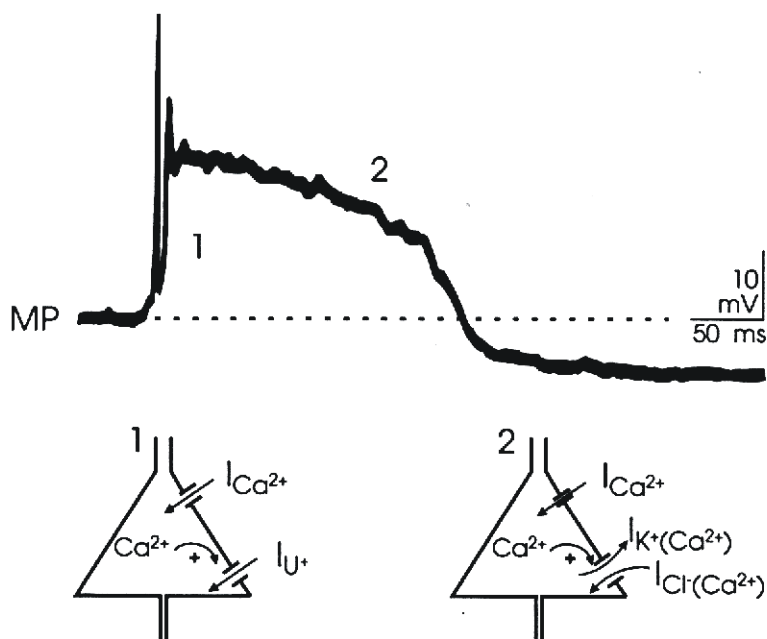


Abbildung 1: Hypothese zur Entstehung epileptischer Depolarisationen in Neuronen:
 Oberer Bildteil: Original-Registrierung; Pyramidenzelle, motorischer Kortex, Katze.
 MP = Membranpotential.

Unterer Bildteil: Flussdiagramm zur Erklärung der Elementarmechanismen, die der neuronalen Depolarisation zugrunde liegen. Depolarisation (1): Durch einen Einstrom von Kalziumionen ($I_{\text{Ca}^{2+}}$) wird ein un spezifizierter Kationeneinstrom (I_{U^+}) ausgelöst. Re- und Hyperpolarisation (2): Intrazelluläre Kalziumionen lösen einen Ca^{2+} -abhängigen Kalium- und Chloridionenstrom aus ($I_{K^+}(\text{Ca}^{2+})$; $I_{Cl^-}(\text{Ca}^{2+})$). (Entnommen aus Speckmann und Walden 1993)

1.3 Ausbreitung epileptischer Entladungen

Glutamat ist an der Entstehung und Ausbreitung von epileptischer Aktivität entscheidend beteiligt (Hwa et al. 1991; McNamara 1992; Meldrum 1992). Die Ausbreitung der PDS innerhalb des Neuronenverbandes ist hauptsächlich auf exzitatorische synaptische Transmission zwischen Nervenzellen zurückzuführen (Heinemann et al. 1991; Speckmann 1986). Die durch den Neurotransmitter Glutamat gesteuerten Rezeptorkanäle fasst man heute in einer Familie von genetisch und strukturell verwandten Ionenkanälen zusammen. Sie lassen sich aufgrund pharmakologischer Eigenschaften und molekularbiologischer Untersuchungen im wesentlichen in 4 Subtypen unterteilen, die durch die Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainat (KA), n-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat (AMPA) und Quisqualat (QUIS) aktiviert

werden (Henneberry 1992; Sommer und Seeburg 1992). Der Neurotransmitter Glutamat bindet dabei an spezifische Transmembranproteinkomplexe, die die Eigenschaften von Rezeptoren und Ionophoren besitzen. Dabei erkennt er spezifische Ligandenbindungsstellen am Rezeptor. Nach Bindung des Liganden tritt eine Konformationsänderung des Transmembranproteins ein, so dass die Ionophore den selektiven Durchtritt von Natrium- und Kaliumionen erlaubt.

Für die schnelle synaptische Übertragung der bioelektrischen Signale sind hauptsächlich AMPA und Kainat aktivierte Glutamat-Rezeptorkanäle verantwortlich (Jonas 1993; Randle et al. 1988). Durch Applikation der Agonisten Kainat und AMPA lässt sich epileptische Aktivität im Nervensystem auslösen und diese wiederum durch den Einsatz selektiver Antagonisten (z.B. CNQX für die Kainat- und AMPA-Rezeptorkanäle) unterdrücken (Lee und Hablitz 1991; Maggio et al. 1990; Segal 1991; Simpson et al. 1991).

Die Leitfähigkeit der langsameren NMDA-Rezeptorkanäle wird sowohl durch Bindung des Agonisten als auch durch das aktuelle Membranpotential beeinflusst. Beim Ruhemembranpotential der Zelle ist der NMDA-Rezeptorkanal nicht vollständig durchgängig, da Magnesiumionen eine spannungsabhängige Blockierung des Membrankanals bewirken (Nowak et al. 1984). Die Depolarisierung der Membran hebt die Magnesiumblockade auf und der Rezeptorkanal wird mit Bindung des Agonisten für Natrium-, Kalium- und für Kalziumionen permeabel. Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass mit fortschreitender Excitation die Übertragung an den Synapsen durch die potentialabhängige Aktivierung noch zusätzlich verstärkt wird (Meldrum 1992; Rogawski 1992; Wilson et al. 1998).

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch der metabotrope QUIS-Rezeptorkanal (mGluR) an der Genese epileptischer Aktivität beteiligt sein kann (Saccan und Schoepp 1992; Schoepp und Conn 1993). Die QUIS-Rezeptoren unterscheiden sich von den anderen Subtypen der Glutamat-Rezeptorkanäle dadurch, dass durch Bindung des Agonisten QUIS keine direkte Erregungssteigerung eines Ionenkanals erfolgt. Es erfolgt hier eine indirekte Erregungssteigerung, die über intrazelluläre Reaktionskaskaden vermittelt wird. Sie benötigen somit den Stoffwechsel der Zellen und man spricht daher von metabotroper Modulation von Ionenkanälen (Houamed et al. 1991; Masu et al. 1991; Schoepp und Conn 1993). Charakteristisch für die Signalübertragung über metabotrope Rezeptoren ist eine längere Dauer der synaptischen Prozesse. Darin liegt ihre besondere Bedeutung für plastische Veränderungen synaptischer Eigenschaften (Baskys 1992; Schoepp und Conn 1993). Auch hemmende Synapsen spielen bei der Ausbreitung und vor allem bei der schon oben erwähnten Synchronisation eine

wesentliche Rolle. So lässt sich die durch GABA ausgelöste synaptische Hemmung durch eine Blockade des GABA_A-Rezeptors mit z.B. Bicucullin unterdrücken. Durch disinhibitorisch wirksame Substanzen können epileptische Aktivitäten ausgelöst (Köhling et al. 2003), oder vorhandene epileptische Aktivität verstärkt werden (Köhling et al. 2003; Koch et al. 2005).

Die pharmakologischen Eigenschaften und der molekulare Aufbau der oben erwähnten Ionenkanäle sind unter anderem im Hippokampus und intensiv im Neokortex der Ratte untersucht worden und zeigen eine prinzipielle Übereinstimmung in ihrer Funktionsweise mit den entsprechenden Rezeptorkanälen aus menschlichen Nervenzellen (Avoli und Olivier 1989; Puckett et al. 1991).

1.4 Stand der Forschung

1.4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Aus ethischen Gründen lassen sich Untersuchungen nur begrenzt am Menschen durchführen, daher müssen Untersuchungen an Versuchstieren vorgenommen werden. Zur Erforschung neurophysiologischer Grundlagen der Epileptogenese und um bessere Therapiestrategien entwickeln zu können, wurden Epilepsiemodelle entwickelt, die - wenn auch nicht genau den Erscheinungsformen der menschlichen Epilepsie entsprechend - den beim Menschen auftretenden Epilepsien vergleichbar sind. Die Analyse der neuronalen Abläufe, die während einer an in vitro oder in vivo Präparaten induzierten Epilepsie auftreten, helfen, die Entstehung epileptischer Aktivität beim Menschen nachzuvollziehen. Es besteht dabei die Frage, ob die Abläufe, die zur Ausbildung von PDS führen, primär synaptisch oder nichtsynaptisch ausgelöst werden.

Als in vitro-Epilepsiemodelle werden häufig Dünnschnitte des Gehirns, insbesondere des Hippokampus und des Neokortex von Mäusen, Ratten, Hamstern und Meerschweinchen, sowie neuronale Zellkulturen herangezogen, die unterschiedlichen epileptogenen Manipulationen ausgesetzt werden. In vivo lassen sich epileptische Anfälle sowohl partiell als auch generalisiert auslösen (Purpura et al. 1972). Partialanfälle können durch die topische Applikation von Metallen auf die Hirnoberfläche, durch eine Erzeugung von Gefrierläsionen im Kortex, durch eine begrenzte elektrische Reizung und durch die lokale Anwendung von Wirkstoffen auf die Kortexoberfläche hervorgerufen werden. Generalisierte Anfälle lassen sich durch eine elektrische Reizung des gesamten Gehirnes, durch Veränderungen des Ionenmilieus und durch die

systemische Applikation epileptogener Substanzen auslösen (Speckmann, 1986).

Tierexperimentelle Arbeiten zeigten, dass die erregenden synaptischen Prozesse, hervorgerufen durch die Aktivität von Glutamat-Rezeptoren, bei der Entstehung epileptischer Aktivität eine Schlüsselrolle spielen. Bei wiederholt eintretender epileptischer Aktivität treten im betroffenen Hirngewebe deutliche Veränderungen in der Menge, der Verteilung und der Funktion von Glutamat-Rezeptoren auf. So konnte nachgewiesen werden, dass der Rezeptorbesatz und die Genexpression für bestimmte AMPA-Rezeptoren verstärkt wird. Andererseits wurde in einem anderen Tiermodell eine Abnahme von mRNA für AMPA-Rezeptoren beobachtet (Lason et al. 1997). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten dabei, dass die Funktion dieser Rezeptoren durch die Zusammensetzung ihrer verschiedenen Untereinheiten sowie durch verschiedene "splice"-Varianten bestimmt wird.

Bei den NMDA-Rezeptoren konnte in chronisch-epileptischen Tieren sowohl eine veränderte Verteilung gefunden werden (Yeh et al. 1989), als auch eine Änderung in der Expression bestimmter splice-Varianten (Vezzani et al. 1995). Neben den beschriebenen quantitativen Veränderungen lassen sich auch funktionelle Veränderungen nachweisen. An den Nervenzellen chronisch-epileptischer Tiere war die spannungsabhängige Blockade des NMDA-Rezeptors vermindert (Kuhr et al. 1993). Auf funktionelle Veränderungen des NMDA Rezeptors bei epileptischer Aktivität deuten weiterhin Befunde, wonach Antagonisten dieses Rezeptors in chronisch epileptischen Tieren eine schwächere antiepileptische Wirksamkeit aufweisen als in gesunden Tieren (Dziki et al. 1992; Löscher und Hönack 1991).

Die meisten Untersuchungen an den Epilepsie-Modellen stellten jedoch fest, dass die quantitativen und funktionellen Veränderungen nur transient auftraten und häufig 72 Stunden nach der zuletzt ausgelösten epileptischen Aktivität auf Normalwerte zurückgingen (Kamphuis et al. 1995; Prince et al. 1995; Vezzani et al. 1995). Diese transienten Veränderungen scheinen daher eher für den Prozess der Entstehung, aber nicht für die Chronifizierung von epileptischer Aktivität von Bedeutung zu sein.

Insgesamt lassen die genannten tierexperimentellen Untersuchungen darauf schliessen, dass bei epileptischer Aktivität Veränderungen exzitatorischer Prozesse stattfinden, die über eine verstärkte erregende synaptische Übertragung ihrerseits die Entstehung epileptischer Aktivität begünstigen. Eine Übertragung der tierexperimentell erhobenen Befunde auf den Menschen ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. So finden sich bei vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Spezies Unterschiede z.B. in der Verteilung von mRNA für AMPA-Rezeptoren im

Zentralnervensystem (Eastwood et al. 1994; Musshoff et al. 1998), die gegebenenfalls auch eine speziesabhängig unterschiedliche Rolle der Rezeptorsymptome bedingen.

1.4.2 Untersuchungen am Menschen

Epilepsiechirurgische Eingriffe eröffnen die Möglichkeit, die Pathogenese von Epilepsien am chronisch epileptischen menschlichen Hirngewebe zu analysieren. Elektrophysiologische Untersuchungen an menschlichem Hirngewebe in vitro werden seit 1992 durchgeführt. Hierbei werden als Untersuchungsmethoden Feld- und Membranpotentialableitungen, Multikanalregistriersysteme, "Current-source-density"-Analysen, „Patch-clamp“-Untersuchungen, Analysen mit ionensensitiven Elektroden, optische Registrierungstechniken mit spannungssensitiven Farbstoffen und auch rezeptorautoradiographische und molekularbiologische Ansätze verwendet. Dieses menschliche Hirngewebe entstammt Resektaten, die im Rahmen tumorchirurgischer bzw. epilepsiechirurgischer Eingriffe entfernt werden müssen. Die operative Therapie bietet Patienten mit einer medikamentös therapierfraktären Epilepsie eine wesentliche Chance, Anfallsreduktion oder gar Anfallsfreiheit zu erreichen. Die Konstruktion einer speziellen Gewebekammer ermöglicht dabei den Transport der Resektate vom Operationssaal an den Messplatz (Köhling et al. 1996). Die menschlichen Präparate generieren nach Behandlung mit epileptogenen Substanzen oder nach gezielten Änderungen des ionalen Mikromilieus Entladungsmuster, die für epileptische Aktivität charakteristisch sind.

Erste Untersuchungen zur Funktion glutamaterger synaptischer Prozesse in menschlichem epileptischem Gewebe deuten darauf hin, dass Störungen dieses Systems für die Epileptogenese beim Menschen mitverantwortlich sind. Dabei bezieht sich die Mehrzahl der Beobachtungen auf hippocampales Gewebe. So finden sich in einem grossen Anteil von Körnerzellen aus Hippokampusgewebe exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP), die gegenüber den EPSP der restlichen Zellen auffallend verlängert sind (Isokawa et al. 1991). Diese werden offenbar über NMDA-Rezeptoren vermittelt (Isokawa et al. 1991, Urban et al. 1990). Entsprechend können in den Körnerzellen auch NMDA-vermittelte transmembranöse Ströme ausgelöst werden, deren Amplituden und Dauer erheblich variieren, während AMPA-vermittelte Ströme in allen Zellen gleichförmig ausgebildet sind (Isokawa et al. 1997). Solcherart verlängerte EPSP wirken sich auf die Aktivität der gesamten Neuronenpopulation aus, so dass bei repetitiver Stimulation afferenter

Bahnen wachsende Feldpotentialantworten zu beobachten sind (Isokawa und Fried 1996).

Untersuchungen an neokortikalem menschlichem epileptischem Gewebe sind bisher kaum durchgeführt worden und liefern uneinheitliche Befunde. So kommt es bei lokaler Applikation von NMDA in allen Hirnschichten zu Abnahmen der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, während dies in nicht-epileptischem Gewebe, z.B. bei Proben aus Tumoroperationen, nur in den oberen Hirnschichten zu beobachten ist (Louvel et al. 1992; Lücke et al. 1995).

In menschlichen neokortikalen Schnittpräparaten aus epilepsiechirurgischen Temporallappenresektionen werden regelmässig spontane steile Feldpotentiale beobachtet, die in Präparaten aus tumorchirurgischen Eingriffen oder bei Tierexperimenten nicht auftreten und als Zeichen der Übererregung und erhöhten Synchronisationsneigung gedeutet werden (Abb.2). An ihrer Entstehung sind vor allem nicht-NMDA-Rezeptoren beteiligt (Köhling et al. 1998). Dementsprechend ist in neokortikalen epilepsiechirurgischen Resektaten eine erhöhte Dichte von AMPA-Rezeptoren zu beobachten.

Die steilen Potentiale sind seltener über die gesamte Ausdehnung der Präparate aber häufiger in kleinen "Foci" von ca. 200 µm Durchmesser zu registrieren. Bei Applikation von Antagonisten hemmender Synapsen wurde festgestellt, dass die Entstehung epileptischer Aktivität nicht ausschliesslich auf eine Unterdrückung der Hemmung zurückzuführen ist (Köhling et al. 1998). An der Entstehung dieser epileptiformen Aktivität sind sowohl inhibitorische (GABA_A -Rezeptoren) wie exzitatorische Transmittersysteme (AMPA/Kainat-Rezeptoren) beteiligt (Köhling et al. 1998). Current-Source-Density-Analysen und rezeptorautoradiographische Analysen weisen darauf hin, dass vor allem supragranuläre Schichten des Kortex für die Generierung der spontanen steilen Potentiale verantwortlich sind (Köhling et al. 1999, Köhling et al. 2000). Bei molekularbiologischen Untersuchungen von Glutamat-Rezeptoren in epilepsiechirurgischen Resektaten konnten ionotrope Glutamat-Rezeptoren in signifikant erhöhter Anzahl nachgewiesen werden (McDonald et al. 1991; Urban et al. 1990), während keine Veränderungen hinsichtlich der NMDA, Kainat und GABA_A -Rezeptoren auftraten. Dagegen zeigte sich im Hippokampus bzw. Temporallappen bei pharmakoresistenten Epilepsie-Patienten eine Abnahme von AMPA-Rezeptoren (DeFelipe et al. 1994; Grigorenko et al. 1997). Auch die posttranskriptionelle Veränderung von mRNA für Untereinheiten der AMPA- und Kainat-Rezeptoren ist in epileptischen Resektaten deutlich verändert gegenüber autoptischen Kontrollen (Musshoff et al. 1998).

Im tumorchirurgisch gewonnenen menschlichen Gewebe sind durch lokale Applikation entsprechender Agonisten sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren aktivierbar (Lücke et al. 1995). Die hierbei ausgelösten Reaktionen entsprechen den im Tierexperiment beobachteten, so dass sich auch unter diesem Gesichtspunkt tumorchirurgische Resektate als Vergleichsmassstab einsetzen lassen. In experimentellen Epilepsiemodellen (Mg^{2+} -Entzug, Applikation von Bicucullin) lässt sich auch in primär nicht-epileptischem menschlichen Hirnschnittpräparaten epileptiforme Aktivität auslösen. Allerdings entstehen unter diesen Bedingungen Aktivitätsmuster, die iktualen Ereignissen entsprechen (Köhling et al. 1998). In den übrigen Schnitten treten in der Mehrzahl der Fälle lediglich interiktuale Aktivitätsmuster auf.

Zusammenfassend finden sich bei Untersuchungen an menschlichem epileptischem Hirngewebe Hinweise auf Veränderungen glutamat-gesteuerter Prozesse. Diese sind jedoch zum Teil widersprüchlich oder unvollständig und erlauben daher noch keine schlüssige Interpretation. Es erscheint daher notwendig, die funktionellen Eigenschaften von Glutamat-Rezeptoren im chronisch-epileptischen Hirngewebe des Menschen eingehender zu untersuchen.

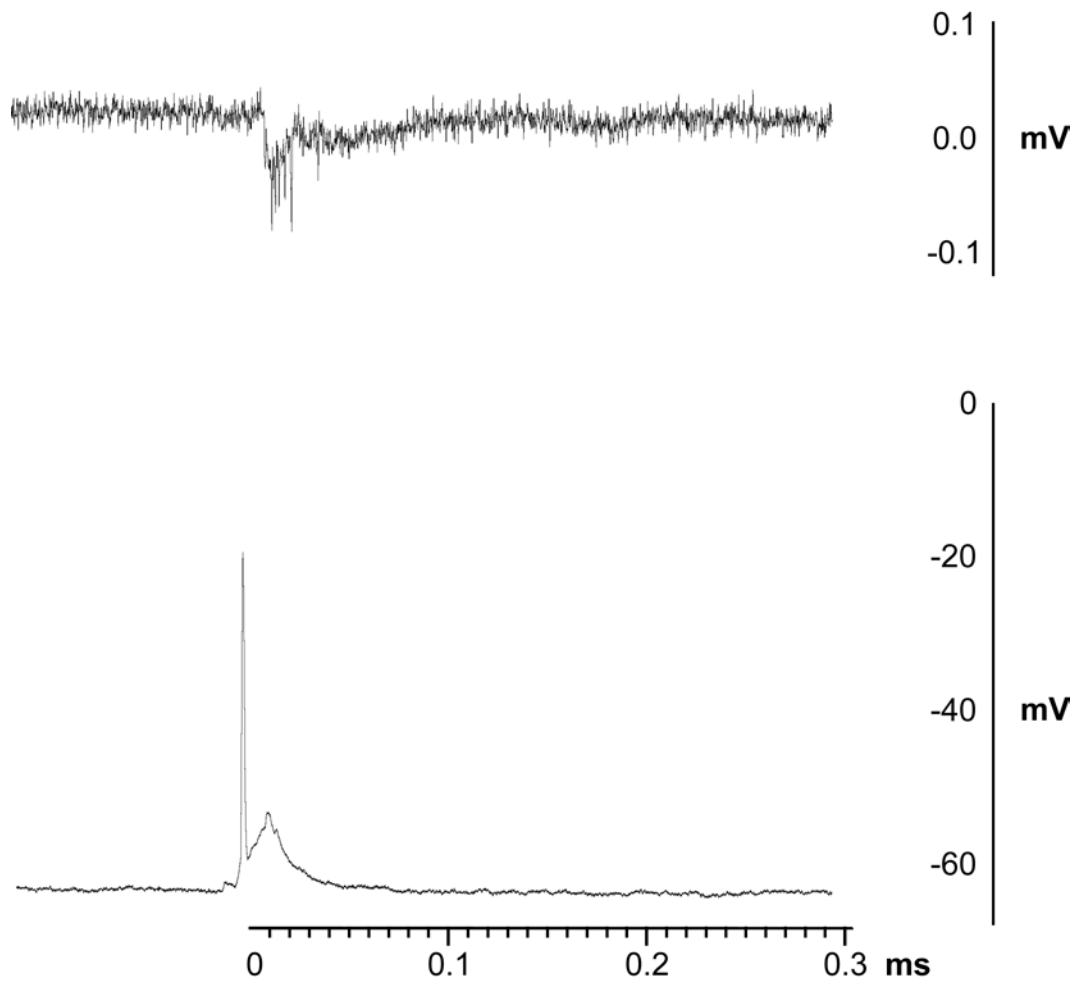


Abbildung 2: Spontane Entladungen:

Oberer Bildteil: Originalableitung spontaner Feldpotentiale im menschlichen epileptischen supragranulären Neokortex.

Unterer Bildteil: Simultane intrazelluläre Membranpotentialableitung eines Neurons im selben Hirnareal. (Abstand von Feldpotentialelektrode: 300 μm)

1.5 Zielsetzung

Bei der Entstehung epileptischer Aktivität im Hirngewebe kommt den synaptischen Prozessen eine Schlüsselrolle zu. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Hemmung und Erregung zur epileptischen Aktivität führen kann (s.o.). In Untersuchungen an verschiedenen tierexperimentellen Modellepilepsien konnte gezeigt werden, dass durch Glutamat-Rezeptoren vermittelte erregende synaptische Prozesse bei epileptischer Aktivität verändert sind. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowie ihre Bedeutung für die Entstehung chronisch-epileptischer Aktivität sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Ziel der experimentellen Epilepsieforschung ist es, die Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität im Gehirn zu verstehen, um so letztendlich neue Therapieansätze entwickeln zu können. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse auf diesem Forschungsgebiet wurden überwiegend im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen gewonnen, bei denen epileptische Aktivitäten künstlich, z.B. durch Gabe epileptogener Substanzen oder durch elektrische Reizung ausgelöst wurden. Diese tierexperimentellen Untersuchungen haben wesentlich zum Verständnis der Pathogenese epileptiformer Aktivität im Nervengewebe beigetragen. Jedoch sind Untersuchungen an neokortikalem menschlichem epileptischem Gewebe bisher kaum durchgeführt worden und sie liefern uneinheitliche Befunde. Spezielles Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine aberrante Funktion von Glutamat-Rezeptoren zur Übererregbarkeit im chronisch-epileptischen Hirnrindengewebe beiträgt. Dazu werden extrazellulär und intrazellulär elektrophysiologische Untersuchungen an menschlichem Hirngewebe durchgeführt, das bei epilepsiechirurgischen Eingriffen gewonnen wird, um das neuronale Erregungsniveau, die Aktivität der Glutamat-Rezeptoren und die neuronalen Übertragungsmöglichkeiten in-vitro zu untersuchen.

Als Kontrollgewebe werden akute neokortikale Gewebeschnitte der Ratte und tumorchirurgisches Hirngewebe aus homologen Arealen verwandt. Epileptische Aktivität wird hierbei durch Erhöhung des K^+ -Anteils und durch Zugabe von Bicucullin ausgelöst. Im Besonderen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Funktionelle Eigenschaften des Gewebeverbandes:

Unterscheiden sich evozierte, synaptisch vermittelte Potentiale von chronisch-epileptischem menschlichem Gewebe von jenen im normalen Gewebe? Welche Transmittersysteme sind beteiligt? Treten Unterschiede der synaptischen Mechanismen unter Verschiebungen des ionalen Milieus hervor, die epileptogenen Bedingungen ähneln?

2. Funktionelle Eigenschaften einzelner Neuronen:

Unterscheiden sich die intrinsischen neuronalen Entladungseigenschaften? Kommt es bei chronischer Epilepsie zu Veränderungen der synaptischen Prozesse auf zellulärer Ebene?

3. Kurzzeitplastizität:

Sind Phänomene der Kurzzeitplastizität auf der Ebene des Gewebeverbandes bei chronischer Epilepsie verändert? Tragen hierzu epileptogene Veränderungen des extrazellulären Mikromilieus bei?

Material und Methoden

2.1 Versuchsgewebe

2.1.1 Menschliches Hirngewebe

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an menschlichem Hirngewebe beschrieben, das im Rahmen epilepsie- und tumorchirurgischer Eingriffe gewonnen wurde. Die Epilepsieformen der Patienten liessen sich klinisch-neuropathologischen Kriterien folgend in Temporallappen-Syndrome und extratemporale Syndrome einteilen. Der Anteil der epilepsiechirurgisch behandelten Patienten mit Temporallappen-Syndromen betrug generell 60%-70%. Die epileptische Aktivität kann dabei ihren Ursprung im mesiotemporalen Hippokampus, Archie- und Neokortex oder im laterotemporalen Neokortex haben.

Das erhaltene menschliche Gewebe bestand aus einem kleinem Gewebeblock, der zur Behandlung von pharmakoresistenter fokaler Epilepsie, im Rahmen einer partiellen Temporallappen-Resektion entfernt wurde (n=51 Patienten). In jeweils einem Fall wurde eine partielle okzipitale oder frontale Lobektomie durchgeführt. Sämtliches in dieser Studie eingesetztes Temporallappengewebe stammte vom vorderen Teil des Gyrus temporalis inferior. Die 25 weiblichen und 27 männlichen Patienten im Alter von 2 bis 54 Jahren (Mittelwert 31,1 +/- 2,5 Jahre) wurden mit einer Reihe antiepileptischer Substanzen behandelt, wobei hauptsächlich Carbamazepin, Phenytoin, Valproat, Lamatrogen und seltener Vigabatrin, Gabapentin, Levetiracetam verabreicht wurden. In vielen Fällen offenbarte die histopathologische Analyse einen leichten Grad von Gliose (n=19) und /oder Astrocytose (n=23). In drei Fällen wurde eine strukturelle Schädigung (Gangiogliom) diagnostiziert und in vier Fällen wurden fokal-dysplastische Veränderungen vorgefunden. Keinerlei pathologische Veränderungen traten nur in einem Fall zu Tage. Eine Ammonshornsklerose lag in 11 Fällen vor.

Die neurochirurgischen Operationen wurden am Epilepsiezentrum Bethel/Bielefeld (Direktor: Prof. Dr. P. Wolf) in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurochirurgie der Krankenanstalten Gilead Bethel/Bielefeld (Direktor: Prof. Dr. F. Oppel) bzw. der Klinik Mara (Leiter Dr. H.-W. Pannek) durchgeführt.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden bereits im Operationssaal dünne Gewebeschnitte angefertigt, die die direkte Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion erlaubten. Die Methoden für die Schnittpräparation, Transport- und Instandhaltung sind von Köhling et al. (1998) detailliert beschrieben worden: Aus dem Resektat wurde ein annähernd ein Kubikzentimeter grosser Gewebeblock entnommen und das so gewonnene Gewebe nach seiner Entnahme in eine eisgekühlte Nährlösung gelegt. Koronale 500 μm dicke Schnitte wurden senkrecht zur pialen Oberfläche in eisgekühltem künstlichem Liquor (aCSF) hergestellt. Diese Schnitte wurden in eine tragbare Inkubationskammer (Köhling et al 1996) in künstlichem Liquor bei 28° C und einem pH von 7,4 verbracht. Die übrigen Teile des Resektats wurden zur neuropathologischen Untersuchung herangezogen. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen der Rattenpräparate (s.u.).

Die Verwendung der Gewebeschnitte wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt. Die Patienten wurden über den Einsatz des unabdingbar zu entnehmenden Gewebes in experimentellen Untersuchungen ausführlich aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag in allen Fällen vor.

2.1.2 Versuchstiere und Präparationstechnik

Da gesundes betroffenes humanes Gewebe nicht verfügbar war, wurden für Kontrollexperimente 500 μm dicke koronale neokortikale Schnitte, die laterale temporale Areale erwachsener Ratten ($n= 67$ von 40 Tieren) beinhalten, benutzt. Zu diesem Zweck wurden männliche Wistar-Ratten (ca. 250 bis 350 g) durch eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml einer 5%-igen Methohexital-Natrium Lösung (Lilly) oder durch Ätherexposition narkotisiert. Unter der Narkose wurde der Schädel abgetrennt und das Gehirn entnommen. Danach wurde das Gehirn in eiskaltem künstlichem Liquor geschnitten. Die Behandlung der menschlichen Schnitte und der Rattenschnitte war in den folgenden Arbeitsschritten identisch. Das Gehirn wurde in eisgekühlte, mit Carbogen (5% CO_2 in 95% O_2) begasten künstlichem Liquor (aCSF; Zusammensetzung: 124 mM NaCl; 4 mM KCl; 1,24 mM NaH_2PO_4 ; 1,3 mM MgSO_4 ; 26 mM NaHCO_3 ; 10 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 1 mM CaCl_2), gegeben. Mit Hilfe eines Mc-Illwain-Tissue-Choppers oder eines Vibratoms (TSE) wurden frontale Schnitte mit einer Dicke von 500 μm hergestellt. Dann folgte eine Präinkubation der Schnittpräparate für mindestens eine Stunde bei 29° C in mit Carbogen begastem aCSF. Nach 30 Minuten erfolgte eine Anhebung der Kalziumionenkonzentration dieser Lösung von 1 mM auf 2 mM.

Im Anschluss daran konnten die Schnitte mit einer Kunststoffsaugpipette in die so genannte „Interface“-Ableitkammer (Abb. 3) überführt werden. In der „Interface“-Kammer lag die Temperatur bei 34° C; der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die aCSF-Flussrate wurde auf 1,5 ml/min justiert.

Für die tierexperimentellen Untersuchungen lag eine Genehmigung des Regierungspräsidenten Münster vor.

In manchen Experimenten wurde die Konzentration von CaCl_2 auf 1 mM und auf 0,5 mM verringert (bei equimolarer Substitution von Mg^{2+}) oder die KCl-Konzentration wurde auf 8 mM angehoben, um epiletogene Bedingungen zu imitieren, da hierbei vergleichbare Veränderungen der Ca^{+} - und K^{+} -Konzentrationen vorkommen, (Lux et al. 1986, Lux, Heinemann 2000). Hierbei wurden die Effekte sowohl auf intrinsische Entladung der Neurone als auch auf synaptische Antworten getestet.

2.2 Erfassung bioelektrischer Aktivität

2.2.1 Versuchskammer

Zum Versuch wurde der Schnitt aus dem Präinkubationsbad in eine so genannte „Interface“-Kammer gebracht. Dort befand er sich an der Grenzfläche zwischen flüssiger und gasförmiger Phase und wurde mit Badlösung umspült (Durchflussgeschwindigkeit 1,5 ml/min). Direkt an der Kammer konnte mit Dreiwegehähnen simultan die Badlösung und die Badbegasung reguliert werden. Die Versuchslösungen gelangten über Teflonschläuche aus den Vorratsgefäßen in die Kammer. Kontinuierliche Begasung der Versuchslösungen mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) gewährleistete einen pH-Wert der Lösung von 7,35 – 7,5, welcher durchgehend kontrolliert wurde. Die Badtemperatur wurde mit Hilfe eines Temperaturfühlers im Bad gemessen und auf 34 ° C eingestellt.

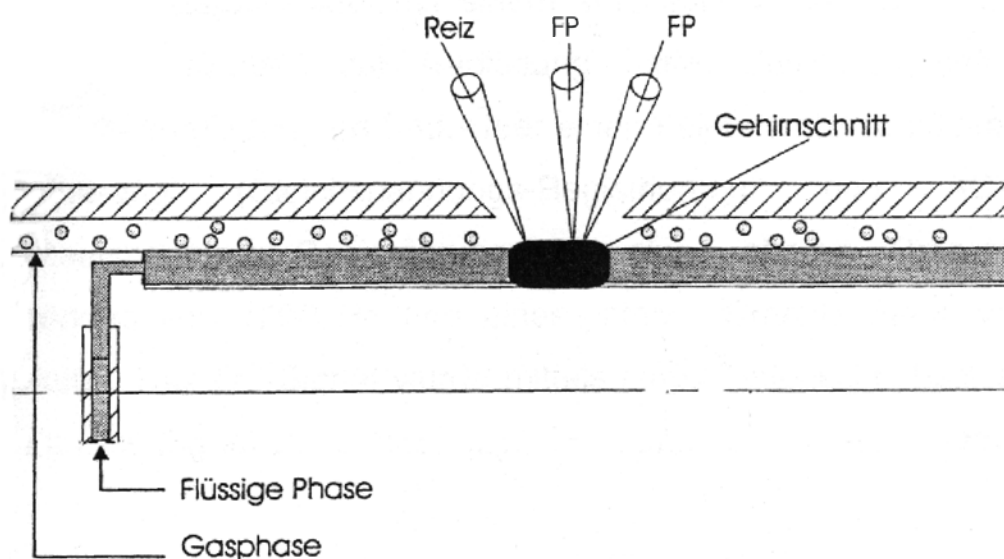


Abbildung 3: Versuchsanordnung zur Messung der bioelektrischen Aktivität in einem Hirnschnittpräparat: Hirnschnitt mit Elektroden zur Reizung (Reiz) und zur Messung der Feldpotentiale (FP). Über Zuläufe werden die Versuchslösung und Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) eingeleitet (entnommen aus Straub 1992).

2.2.2 Feldpotentialableitungen

Zur Registrierung von Feldpotentialen wurde eine Mikroelektrode mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes aus Filamentborosilikatglas der Firma Hilgenberg (Aussendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 0,87 mm) hergestellt. Die Elektrodenspitze wurde so weit zurück gebrochen, dass die Elektrode einen Widerstand von ca. 0,5-1 MOhm besaß. Die Elektrode wurde mit Badlösung gefüllt und war über eine 2 molare KCl-Brücke an einem konventionellen Feldpotentialverstärker angeschlossen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden zwei Elektroden jeweils in der infra- und supragranulären Schicht des Kortexpräparates platziert.

Als Referenzelektrode diente ein in die Kammer eingebauter, mit 2 molarer KCl gefüllter Kunststoffschlauch mit einer Keramikfritte, der über diese Kontakt zur Badlösung hatte. Zusätzlich befand sich ein chlorierter Silberdraht zur Erdung im Bad. Über einen Feldpotentialverstärker wurden AC-Registrierungen (Wechselspannungs-Registrierungen mit einer oberen Grenzfrequenz des Verstärkers von 1000 Hz und einer unteren Grenzfrequenz von 0,016 Hz) abgeleitet. Das AC-Signal wurde mittels eines Tintenschreibers (obere Grenzfrequenz 2 Hz) aufgezeichnet und durch einen digitalen Oszillographen (obere Grenzfrequenz 20 kHz)

abgespeichert.

Die Stimulierung der Neurone erfolgte durch Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche mit einer bipolaren Platinelektrode. Der Reiz war biphasisch und wurde zu Versuchsbeginn so eingestellt, dass eine maximale Amplitude der Summenaktionspotentiale daraus resultierte. Stimuliert wurde mit einer Repetitionsrate von 1 Reiz/10 s.

2.2.3 Membranpotentialableitungen

Membranpotentiale wurden unter Verwendung von Mikroelektroden aus Filamentborosilikatglas von Neuronen des Kortex-Schnittpräparats intrazellulär abgeleitet. Hierbei wurden Kapillaren mit einem Aussendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,87 mm zu Mikroelektroden ausgezogen, die einen Spitzendurchmesser von weniger als 1 μm aufwiesen. Die Mikroelektroden wurden mit einer 2 molaren Kaliummethysulfatlösung (Biomedicals) gefüllt und hatten einen Widerstand von 50-70 MOhm. Die Platzierung der Mikroelektrode im Gewebeschnitt und der Vorschub der Elektrode erfolgten mit Hilfe eines Mikromanipulators. Die elektrische Ankopplung der Mikroelektrode an die Messgeräte erfolgte über einen chlorierten Silberdraht. Als Referenzelektrode diente ein Silberdraht zur Erdung im Bad. Die Registrierung des Membranpotentials erfolgte über einen konventionellen Verstärker (SEC 10, npi, untere Grenzfrequenz: 0 Hz, obere Grenzfrequenz: 20 kHz). Mit Hilfe einer im Mikroelektrodenverstärker eingebauten Brückenschaltung konnten intrazelluläre Strominjektionen vorgenommen werden. Die bioelektrischen Signale wurden mit „Signal“ (Cambridge Electronic Design Ltd.) aufgezeichnet.

2.3 Bestimmung des Erregungsniveaus und elektrophysiologische Untersuchungen

In ca. 60% der überlebenden menschlichen Hirnschnitte aus epilepsiechirurgischen Eingriffen traten spontan steile Feldpotentiale auf, die auf ein erhöhtes Erregungsniveau deuteten und durch glutamaterge synaptische Transmission vermittelt wurden. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die menschlichen Schnittpräparate mit Feldpotentialelektroden abgetastet, um zu bestimmen, welche kortikalen Schichten an der Generierung spontaner Erregung beteiligt waren.

Im weiteren Verlauf wurden über Reizelektroden, die zum einen in der weissen Substanz und

zum anderen an der pialen Oberfläche platziert waren, erst Einzelreize appliziert und dann mit doppelter und fünffacher Stromstärke der Reizschwelle, sowie mit Doppelreizen bei Reizintervallen von 20 ms, 30 ms, 50 ms und 100 ms gereizt. Als Reizschwelle wurde die Stromstärke festgelegt, bei der gerade eine neuronale Antwort oberhalb des Rauschens sichtbar wurde.

Die Differenzierung der beteiligten exzitatorischen Synapsen an den durch Stimulation ausgelösten Potentialen erfolgte durch Superfusion von Antagonisten von NMDA und nicht-NMDA-Rezeptoren. Die zur pharmakologischen Identifizierung synaptischer Aktivität verwendeten Substanzen wurden in aCSF aufgelöst und dem Medium zugesetzt. Die angewandten Substanzen waren die NMDA (N-methyl-D-aspartat)- und AMPA (+/-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat)/Kainat Rezeptor-Antagonisten DL-2-amino-5-phosphyl-valerat (APV, 100 μ M) und 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20 μ M) sowie der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin-Methiodid (5 μ M), (Sigma, München).

Zur Charakterisierung der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) wurden extrazellulär ausgelöste Einzelreize und spontan auftretende EPSP in den Schnittpräparaten nach den oben genannten Kriterien analysiert. Für die intrazellulären kortikalen spannungsabhängigen Natriumkanäle einerseits und zur histologischen Identifizierung von Neuronen andererseits wurden QX 314 sowie Neurobiotin der Pipettenlösung beigelegt, (Labs Burlingame, USA, Tocris Cookson, Biotrend Chemicals, Deutschland).

Die Identifizierung einzelner Neurone erfolgte mittels DAB-Nachweis (Biotin-NHS Kit der Firma Calbiochem).

Die Untersuchung der EPSP wurde in folgenden Schritten durchgeführt: 1. Bestimmung der Dauer und Amplitude der EPSP bei verschiedenen Membranpotentialen. 2. Beteiligung von NMDA- und nicht-NMDA Rezeptoren durch Applikation der oben genannten Rezeptorantagonisten APV und CNQX.

2.3.1 Epileptogene Bedingungen

Bei Feldpotentialableitungen wurde der extrazelluläre Kaliumanteil von 4 mM auf 8 mM erhöht. Bei intrazellulären Ableitungen wurde (als Antagonist der GABA-Hemmung) der GABA-Rezeptor-Antagonist Bicucullin der Firma Serva in einer Konzentration von 5 μ M verwendet. Epileptische Aktivität wurde durch Bicucullin spontan ausgelöst oder durch elektrische

Einzelreizung angestossen.

Um epileptogene Bedingungen zu imitieren, wurde das intrazelluläre Entladungsmuster der Neuronen bei Zugabe von 5 μ M Bicucullin, bei Erhöhung des K^+ -Anteils auf 8 mM und bei Absenkung des Ca^{2+} -Anteils auf 1 mM und 0,5 mM analysiert (Su et al. 2001).

2.3.2 Versuchsprotokoll

Intrazelluläre Registrierungen des Membranpotentials neokortikaler Neurone wurden mittels scharfer Pipetten (60-120 MOhm) in supragranulären Schichten des Neokortex durchgeführt (s.o.). Literaturbefunde lassen vermuten, dass der Ursprung der epileptogenen Foci hier zu finden sei, (Flint und Connors 1996). Aus diesem Grund wurden für die intrazellulären Ableitungen zunächst die Schichten 2/3 gewählt, da auch in einer Voruntersuchung (Köhling et al. 1999) spontane Entladungen in humanem epileptischem Gewebe primär dort generiert wurden. Intrazelluläre Daten stammten von 35 Neuronen aus menschlichem und 46 Neuronen aus Rattengewebe. Diese wiesen im Mittel ein Ruhepotential von >-60 mV (65 ± 2 mV Menschen-, 63 ± 2 Rattenzellen), überschüssende Aktionspotentiale und einen Eingangswiderstand von >20 MOhm (50 ± 2 MOhm menschliche Neuronen, 35 ± 3 MOhm Rattenzellen) auf. In einigen Fällen wurde 0,5-2% Neurobiotin und /oder das intrazelluläre wirksame Lidocainderivat QX 314 (2 mM) zur Pipettenlösung zugesetzt, um die Neuronen histologisch zu identifizieren, beziehungsweise um spannungsgesteuerte Natriumkanäle zu blockieren.

Extrazelluläre Feld-Potential-Aufnahmen wurden in den Schichten 2/3 und den Schichten 5/6 durchgeführt. Nach Erscheinen spontaner Feldpotentialaktivität wurden die Antworten mit dem Computerprogramm „Signal“ (Cambridge Electronic Design Ltd.) aufgezeichnet (Köhling et al., 1998). Die Schnitte wurden durch eine bipolare Platinelektrode (Durchmesser 15 μ m) elektrisch stimuliert; dies galt sowohl für intra- wie für extrazelluläre Untersuchungen. Die Stimuli erfolgten sowohl an der Grenze zwischen weisser und grauer Substanz, (für afferente Stimulation von aufsteigenden Fasern), als auch an der pialen Oberfläche zur Aktivierung paralleler Fasern. Um vergleichbare Stimulationsbedingungen einzuhalten, wurde die Reizintensität zunächst auf eine Schwellenantwort justiert, um dann auf das 2-fache und das 5-fache dieses Wertes erhöht zu werden. Die übliche Schwellen-Stimulations-Intensität bewegte sich zwischen 0,15 und 0,3 mA. Doppelpuls-Reize in verschiedenen Intervallen (30/50/100 ms) bei 5-facher Schwellenintensität dienten zur Analyse der Kurzzeit-Plastizität.

Nach Abschluss der elektrophysiologischen Experimente wurden die Schnitte zur histologischen Analyse in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung für 24 Stunden fixiert, anschliessend gespült und für 60 Minuten in eine Lösung mit 0,5% H_2O_2 und 0,8% Triton X inkubiert. Nach einer Inkubation mit avidingekoppelter Peroxidase (ABC-Kit, Vectorlab, Burlingame, USA) folgte eine Präinkubation in 0,5 mM Diaminobenzidin und eine anschliessende Reaktion mit Diaminobenzidin und 0,015% H_2O_2 . Die Schnitte wurden gespült und dann langsam durch Alkohol und Propylenoxid dehydriert. Zuletzt erfolgte eine Einbettung der Schnitte in Durcopan (Fluka, Buchs, Schwarz).

2.4 Versuchsauswertung

Die Auswertungen der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführten Messungen erfolgten mit Hilfe des Analyseprogramms „Signal“ (Cambridge Electronic Design Ltd.). Gemessen wurden Amplitude und Dauer der Feldpotentialantworten, wie auch der Membranpotentiale bei Einzelreizen. Die EPSP wurden bei unterschiedlichen Membranpotentialen gemessen und das Umkehrpotential bestimmt. Die statistischen Auswertungen aller Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „Sigma Stat“ (SPSS).

Bei Doppelreizen wurde bestimmt, ob eine Akzentuierung vorher, d.h., ob die zweite Reizantwort eine grössere Amplitude als die erste aufwies, oder ob eine Depression eintrat.

Die experimentell gewonnenen Daten sind als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben, die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Datensätzen mit Hilfe des Student's t-Test überprüft.

Ergebnisse

3.1 Untersuchung der synaptischen Übertragung

Bei der Entstehung von epileptischer Aktivität sind synaptische Prozesse im Hirngewebe von besonderer Bedeutung. Wie schon oben erwähnt, wurde angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Hemmung und Erregung zur Synchronisation der Neuronen und damit zu epileptischen Aktivitäten führen kann. Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit menschliches Hirnrindengewebe und neokortikales Gewebe der Ratte. Dazu haben wir extrazellulär und intrazellulär elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Aktivität der Glutamat-Rezeptoren und die synaptischen Funktionen in-vitro zu untersuchen. Für die schnelle synaptische Übertragung der bioelektrischen Signale sind hauptsächlich AMPA und Kainat aktivierte Glutamat-Rezeptorkanäle verantwortlich. Durch Applikation selektiver Antagonisten wie CNQX für die Kainat- und AMPA-Rezeptorkanäle und APV für NMDA-Rezeptorkanäle lässt sich diese Aktivität unterdrücken (Jonas, 1993; Randle et al., 1988, Lee und Hablitz, 1991; Maggio et al., 1990; Segal, 1991; Simpson et al., 1991).

Die Leitfähigkeit der langsameren NMDA-Rezeptorkanäle wird sowohl durch Bindung des Agonisten als auch durch das aktuelle Membranpotential beeinflusst. Beim Ruhemembranpotential der Zelle ist der NMDA-Rezeptorkanal nicht vollständig durchgängig, da Magnesiumionen eine spannungsabhängige Blockierung des Membrankanals bewirken (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Die Depolarisierung der Membran hebt die Magnesiumblockade auf und der Rezeptorkanal wird mit Bindung des Agonisten für Natriumionen, Kaliumionen und für Kalziumionen permeabel. Auch hemmende Synapsen spielen bei der Ausbreitung und vor allem bei der schon oben erwähnten Synchronisation eine wesentliche Rolle. So lässt sich die durch GABA ausgelöste synaptische Hemmung durch eine Blockade des GABA_A-Rezeptors mit z.B. Bicucullin unterdrücken. Epileptische Aktivität wird somit durch Erhöhung des K⁺-Anteils oder durch Bicucullin ausgelöst.

Bei den vorliegenden Ergebnissen wurden für Untersuchungen der Feldpotentiale, wie für die intrazellulären Untersuchungen, insgesamt Gewebe von 51 Patienten untersucht (Tab.1).

Fallnr.	Alter	Geschl.	Gewebe- typ	Beginn (Jahre)	Anfalls- frequenz	Medikation	Pathologie	MRT	PET	Aktivität	AHS
136	29	m	TL r	1		CBZ	Astrocytose, Spongiose	Tumor			x
137	35	m	TL r	11		CBZ, DPH, PHT, VPA	Astrocytose, Glisoe, Gangliogliom	Tumor, Läsion			
139	3	w	FL r	3	96	PHT, PRM, VPA	Astrocytose, fokale Dysplasie	Dysplasie			
141	53	w	PL r	43	2	BROM, CBZ, DPH, GPT, MSX, VPA	Astrocytose, Gliose, Spongiose	Tumor, Läsion			
143	37	m	TL l	30	2	CBZ, DPH, GPT, LTG, VPA	Gliose	mes. Atrophie		spontan	x
144	48	w	TL r	34	2	CBZ, CZ, DPH, LTG, OCBZ, PRM, VGB	Gliose	mes. Atrophie	lat hypomet		x
145	1	m	TL l	1	90	ACTH, BROM, CBZ, CZ, DPH, ETX, GPT, LTG, MSX, OCBZ, PRM, STM, TGB, VPA	Fasergliose	x		spontan	
147	37	w	TL r	29	3	CBZ, LTG	Gliose	Sklerose		spontan	x
148	22	w	TL r	17	40	CBZ, LTG, PHT, STM, VPA	Spongiose	Dysplasie, Sklerose			x
149	24	m	TL r	2	6	CBZ, DPH, GPT, PHT	Astrocytose, Gliose,	Tumor		spontan	
150	20	w	TL l	7	16	CBZ, DPH, LTG, VPA	Gangliocytom, Spongiose	Tumor, zystische Läsion		spontan	
151	36	w	TL l	18	300	CBZ, ETX,	Astrocytose, Fasergliose	mes. Atrophie		spontan	x
152	28	w	TL r	1	2	CBZ	Astrocytose	Tumor			
155	23	m	TL r	3			Astrocytose, Spongiose	Tumor		spontan	
157	46	w	TL r	36	50	CBZ, LTG, PHB, PHT, PTM, VPA	Astrocytose	Sklerose		spontan	
158	37	m	TL l	17	16	CBZ, LTG, PHT, VPA	Astrocytose, Fasergliose	mes. Athrophie	x	spontan	
160	33	w	TL l	28	15	CBZ, DPH, PRM, VPA	Astrocytose	lat. Athrophie		spontan	x
162	40	w	TL l	26	1	CBZ, OCBZ, VPA	Astrocytose, Gliose	Sklerose			x
163	31	w	TL r	25	3	CBZ, DPH, LTG, PRM, TGB, VPA	Gliose	x			x
164	36	m	TL r	13	2	CBZ	Astrocytose, fokale Dysplasie	zystische Läsion			
165	54	w	TL r	28	4	CBZ, DPH, GPT, LTG	Astrocytose, Gliose	mes. Atrophie		spontan	x
166	37	w	TL l	23	5	CBZ, LTG, PHT, VGB, VPA	Gliose			spontan	x
167	4	m	TL r	0	0		Astrocytose, Gliose, Gangliogliom				
169	40	w	TL r	26	2	CBZ, VPA	Fasergliose	Tumor			
170	2	w	TL l	2	900	CBZ, LTG, MSX, OCBZ, PHT, VGB	Gliose	Lesion		spontan	
171	36	m	TL r	15	2	DPH, VPA	Gliose, Gangliogliom	Tumor		spontan	
172	30	m	TL l	29	2	CBZ, DPH, GPT, PRM, VPA	Astrocytose, Gliose	x			
173	32	m	TL l	26	20	CBZ, DPH, GPT, LTG, PRM	Gliose	Dysplasie	mes,lat hypomet	spontan	x
174	21	m	TL l	18	3	CBZ, DPH, GPT, LTG, VGB, VPA	normales Gewebe	mes. Atrophie		spontan	
175	38	m	TL r	22	6	CBZ, DPH, GPT, LTG, PHB, TGB, VGB	Gliose	mes. Atrophie		spontan	x
176	18	m	TL r	1	30	CBZ, VPA	Gliose Gangliom	Tumor		spontan	
177	54	w	TL r	32	3	CBZ, DPH, LTG, TGB, VPA	Atrophie, Gliose	lat. Atrophie	x	spontan	x
179	22	m	TL r	11	8	CBZ, DPH, GPT, LTG, PRM, VPA		x		spontan	x
180	16	w	TL l	8	40	CBZ, OCBZ, PHT, VPA	Fasergliose, fokale Dysplasie	mes. Atrophie		spontan	
182	21	m	TL l	9	7	CBZ, LTG, OCBZ, PRM, STM, VGB, VPA	Gliose severe	x	lat hypomet	spontan	x
184	50	w	TL r	43	4	CBZ, DPH, LTG, PHB, VPA	Astrocytose, Gliose	mes. Atrophie		spontan	x
187	33	m	TL r	19		CBZ, DPH, GPT, LTG, OCBZ, VGB, VPA	Astrocytose, Gliose	x		spontan	
188	36	m	FL r	31	20	CBZ, DPH, LEV, LTG,	Astrocytose, fokale Dysplasie	Dysplasie			

Fallnr.	Alter	Geschl.	Gewebe- typ	Beginn (Jahre)	Anfalls- frequenz	Medikation	Pathologie	MRT	PET	Aktivität	AHS
191	1	w	TL r	1	4	CBZ, LTG, OCBZ,	Astrocytose, Gliose	lat. Hypomet, Atrophie	lat, med hypomed	spontan	
192	36	m	TL r	9	2	CBZ, GPT, LTG, OCBZ, VPA	Astrocytose, Gangliocytom, Gliose			spontan	
194	24	m	TL r	18	14	CBZ, GPT, LEV, LTG, OCBZ, PHB, PHT PRM, VGB, VPA	Gliose, Gangliogliom	Lesion		spontan	
195	41	m	TL r	8	2	CBZ, LEV, LTG, VPA	Astrocytose	Tumor		spontan	
196	41	w	TL l	34	5	CBZ, DPH, LTG, PRM		mes Atrophie		spontan	x
198	20	w	TL l	16		CBZ, LTG, MSX, PHT, VGB, VPA	Gliose, Laminierungsstörung	Sklerose			
200	42	m	TL l	12	4	CBZ, DPH	Astrocytose	Sklerose		spontan	
201	18	w	TL r	6		OCBZ	Gliose, Gangliogliom	Tumor		spontan	
202	24	m	TL l	22	1	CBZ, PHB	fokale Dysplasie	lat. Atrophie		spontan	
204	34	w	TL r	33	3	CBZ, VPA	fokale Dysplasie, Gangliogliom	Lesion			
208	20	m	TL r	18	7	CBZ, PHB, PRM, VGB, VPA	fokale Dysplasie	Sklerose		spontan	x
209	52	m	TL l	52	10	CBZ, DPH, LTG, VPA	Gliose	mes., lat. Atrophie			x

Tabelle 1:

MRT = Magnet-Resonanztomographie, PET = Positronen-Emissionstomographie, AHS = Ammonshornsklerose

TL = Temporallappen, FL = Frontallappen, PL = Parietallappen, OL = Occipitallappen, r,l = rechts, links

ACTH = Adrenocorticotrophikhormon, BROM = Bromid, CBZ = Carbamazepin, DPH = Diphenylhydantoin, GPT = Gabapentin, LEV = Levetiracetan, LTG = Lamotrigin,

MSX = Mesuximid, OCBZ = Oxcarbamazepin, PHB = Phenobarbital, PHT = Phenotoin, PRM = Primidone, STM = Sultiam, TGB = Tiagabin, VGB = Vigabatrin, VPA = Valproat

Die Untersuchung am Patientengewebe schlüsselt sich folgendermassen auf:

Bei 13 Patienten registrierten wir evozierte Feldpotentiale in den supragranulären wie auch in den infragranulären Schichten, die durch eine Reizelektrode in der weissen Substanz hervorgerufen wurden. Bei Reizung der pialen Oberfläche wurden die evozierten Feldpotentiale in den supragranulären Schichten bei 39 Patienten aufgenommen.

Die intrazellulären Ableitungen in den supragranulären Schichten bei Reizung der weissen Substanz und bei Reizung der pialen Oberfläche wurden bei 39 Patienten durchgeführt.

Die Untersuchungen am Rattengewebe wurden wie folgt durchgeführt:

Bei 30 Ratten wurde, wie im menschlichen Gewebe, die evozierten Feldpotentiale in den supragranulären wie auch in den infragranulären Schichten bei Reizung der weissen Substanz aufgenommen. Bei Reizung der pialen Oberfläche wurden evozierte Feldpotentiale in den supragranulären Schichten in 57 Schnittpräparaten registriert.

Intrazelluläre Ableitungen in den supragranulären Schichten bei Reizung der weissen Substanz wie auch bei Reizung der pialen Oberfläche wurden in 51 Schnittpräparaten durchgeführt.

3.1.1 Spontanaktivität

Wie bereits in anderen Studien berichtet, weist menschliches chronisch epileptisches Gewebe im Gegensatz zu gesundem neokortikalem Gewebe von Nagern spontane Feldpotentiale auf (Köhling et al. 1998), die als Zeichen der Übererregbarkeit und der erhöhten Synchronisationsneigung gedeutet werden. An ihrer Entstehung sind vor allem nicht-NMDA-Rezeptoren sowie inhibitorische Rezeptoren beteiligt (Köhling et al., 1998). Auch in der vorliegenden Untersuchung stellte sich heraus, dass 62,3 % der menschlichen Präparate spontan aktiv waren, wohingegen sie in keinem der Rattenschnitten nachgewiesen werden konnte. Die Datenanalyse zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen spontan aktiven und nicht spontan aktiven Schnittpräparaten hinsichtlich der untersuchten synaptischen Funktion.

3.2 Intrazelluläre Ableitungen

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass in epileptischem juvenilem Nagetiergewebe bei Neuronen des Hippokampus und des Gyrus dentalis abnormale synaptische Antwort vorkommen. Diese bestehen aus verlängerten NMDA-rezeptorvermittelten EPSPs (Isowaka Levesque, Fried und Engel 1997), sowie GABA_A-rezeptorvermittelten IPSPs (Williamson et al. 1995). Ebenso kann ein möglicher Verlust der Mg²⁺-Blockade der NMDA-Rezeptoren in juvenilem Gewebe verantwortlich sein (Isokawa, und Mathern 1999). Eindeutige Veränderungen neokortikaler Entladungsmuster wurden hingegen nicht beobachtet (Schwatzkroin, Turner Knowles und Wyler 1983). So wurden zum einen abnormale Antworten, insbesondere reduzierte IPSP und synaptisch induzierte Entladungen (Deisz 1999), zum anderen aber keine von Normalbefunden abweichenden Ergebnisse berichtet (Avoli. et al. 1996). Um die Frage möglicher aberreter synaptischer Funktion in chronisch epileptischem menschlichem Gewebe weiter zu klären, haben wir synaptisch vermittelte Membranpotentialveränderungen bei a) afferenter kolumnaler und b) fokaler Stimulation untersucht. Die Stimulationsintensität wurde hierbei schwellennah gehalten, um lediglich synaptische Antworten auszulösen. Diese wurden hinsichtlich der beteiligten Leitfähigkeiten (Umkehrpotentiale) und Rezeptoren (pharmakologische Charakterisierung) analysiert. Zudem wurde das intrinsische Entladungsverhalten der Neurone untersucht.

3.2.1 Synaptisches Verhalten

Sowohl bei menschlichen- wie auch bei Rattenpräparaten rief die Stimulation der weissen Substanz bei Schwellenreizstärke oder bei Reizung mit doppelter Schwellenintensität gewöhnlich bei Ruhemembranpotential depolarisierende postsynaptische Potentiale von variabler Latenz hervor. Auf Grund der unterschiedlichen Grösse der Schnittpräparate (Mensch/Ratte) waren die Abstände zwischen stimulierender und ableitender Elektrode bei den menschlichen Präparaten weiter entfernt als bei den Rattenpräparaten. Aus diesem Grunde scheint erklärlich, dass die Potentiale in menschlichen Zellen polyphasisch waren und vermutlich polysynaptisch vermittelt wurden (68% Mensch / 34% Ratte, $p=0,025$, Fisher Exact Test). Bei Stimulation mit Schwellenreizstärke wiesen sie variable Amplituden zwischen 1,5-20 mV (Mensch) bzw. 3,1-16 mV (Ratte) auf. Die relative Häufigkeit der polyphasischen Antworten in menschlichen Zellen (Abb. 20), im Vergleich zu Rattengewebe,

könnte an den bei menschlichen Präparaten grösseren räumlichen Abständen liegen, die von den synaptischen Verbindungen überbrückt werden müssen. Die Stimulation der weissen Substanz ruft hier sehr wahrscheinlich polysynaptische Aktivierung von den subpial gelegenen Zellen hervor.

Während sich Gewebe von Ratten einerseits und Patienten mit Epilepsie andererseits im Auftreten polyphasischer Reizantworten unterscheidet, fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der minimal erforderlichen Reizintensität zur Auflösung synaptischer Antworten ($0,48 \pm 0,08$ mA Mensch gegen $0,74 \pm 0,11$ mA Ratte, jeweils nicht signifikant), wobei ungeachtet der obigen Betrachtungen, menschliches Gewebe in der Umsetzung afferenter Stimuli in erfolgreiche synaptische Transmissionen effektiver erschien.

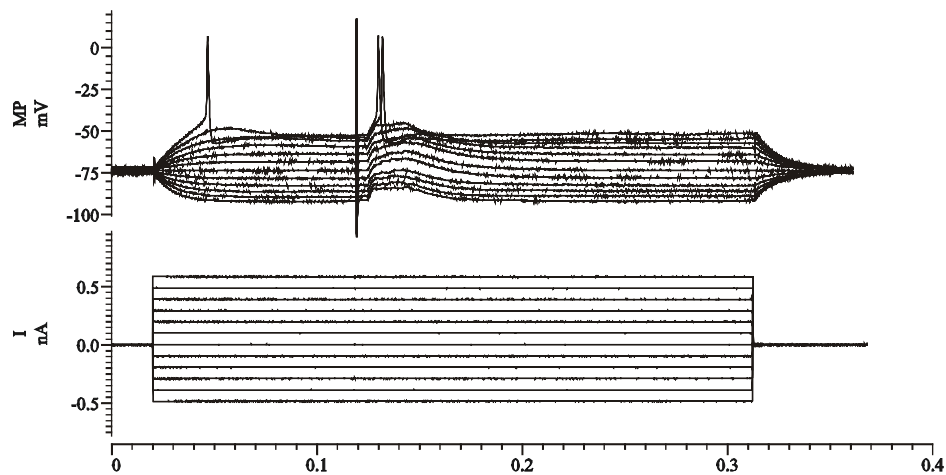
Zusätzlich wurden weitere Analysen mit fokaler Stimulation der pialen Oberfläche durchgeführt. Hier waren die minimalen Stimulationsstärken, die nötig sind, um eine synaptische Reaktion zu erhalten ($0,37 \pm 0,14$ Mensch und $0,16 \pm 0,01$ mA bei der Ratte, nicht signifikant), geringer als bei Stimulation der weissen Substanz in Rattengewebe (signifikant $p=0,002$, t-Test), während kein Unterschied zwischen Reizintensitäten bei fokaler bzw. afferent kolumnaler Stimulation in menschlichem Gewebe zu finden war. Insofern erscheint das Rattengewebe erregbarer. Bei fokaler Stimulation wurde bei epileptischem (Mensch) und bei nicht epileptischem Gewebe (Ratte) eindeutige Sequenzen de- und hyperpolarisierender Membranpotentialveränderungen (EPSP/IPSP) gefunden.

Um zu testen, ob es sich tatsächlich um glutamaterge bzw. GABA-erge Antworten handelt, und, ob es einen Unterschied zwischen chronisch epileptischem und nicht-epileptischem Gewebe gibt, wurden pharmakologisch die synaptischen Potentiale charakterisiert unter Verwendung spezifischer Blocker von GABA_A-, NMDA- und AMPA/Kainat Rezeptoren (Bicucullin, APV und CNQX).

Die folgenden Abbildungen zeigen Entladungsmuster neokortikaler Neurone bei Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche bei einfacher und doppelter Schwellenreizintensität.

Nicht epileptisches Gewebe

A: Kontrolle



B: APV

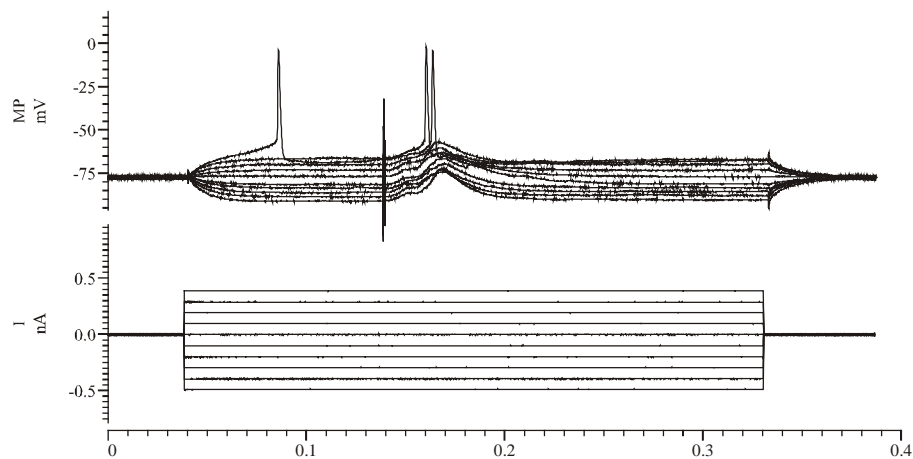
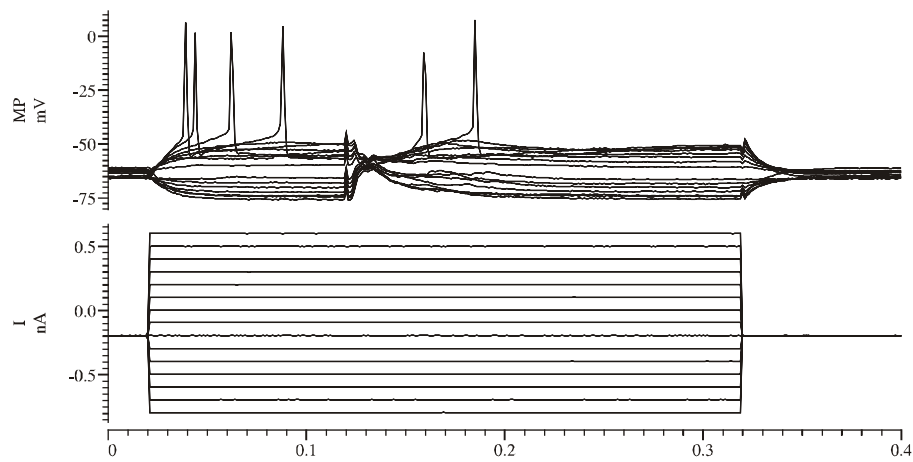


Abbildung 4: A: Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale in nicht epileptischem neokortikalem Gewebe (Ratte) bei afferenter Stimulation der weissen Substanz; Reizung mit Schwellenintensität.

B: Applikation von APV (100 μ M) zur Blockade von NMDA-Rezeptoren. Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale in nicht epileptischem neokortikalem Gewebe (Ratte) bei afferenter Stimulation der weissen Substanz; Reizung mit doppelter Schwellenintensität.

Nicht epileptisches Gewebe

A: Kontrolle



B: CNQX

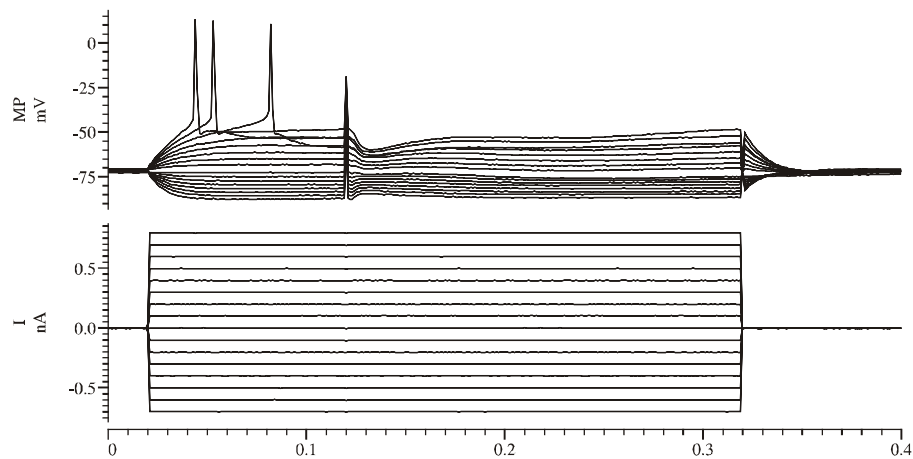


Abbildung 5: A: Kontrolle. Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale in nicht epileptischem neokortikalem Gewebe (Ratte) bei afferenter Stimulation der pialen Oberfläche; Reizung mit Schwellenintensität unter aCSF.

B: Applikation von CNQX. Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale, in nicht epileptischem neokortikalem Gewebe (Ratte) bei afferenter Stimulation der pialen Oberfläche; Reizung mit Schwellenintensität.

Epileptisches Gewebe

A: Kontrolle

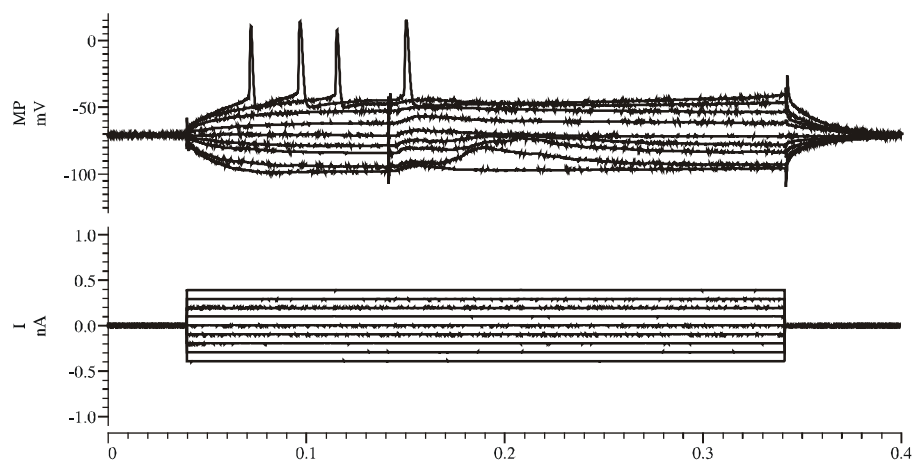


Abbildung 6: Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale in epileptischem neokortikalem Gewebe (Mensch) bei afferenter Stimulation der weissen Substanz; Reizung mit Schwellenintensität unter aCSF. (Hervorgehoben: polyphasische EPSP).

B: Kontrolle

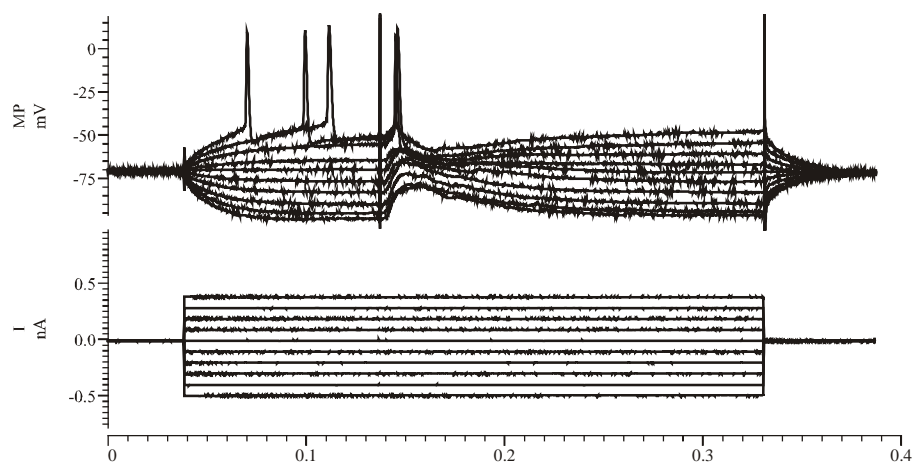


Abbildung 7: Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale in epileptischem neokortikalem Gewebe (Mensch) bei afferenter Stimulation der pialen Oberfläche; Reizung mit Schwellenintensität unter aCSF.

Epileptisches Gewebe

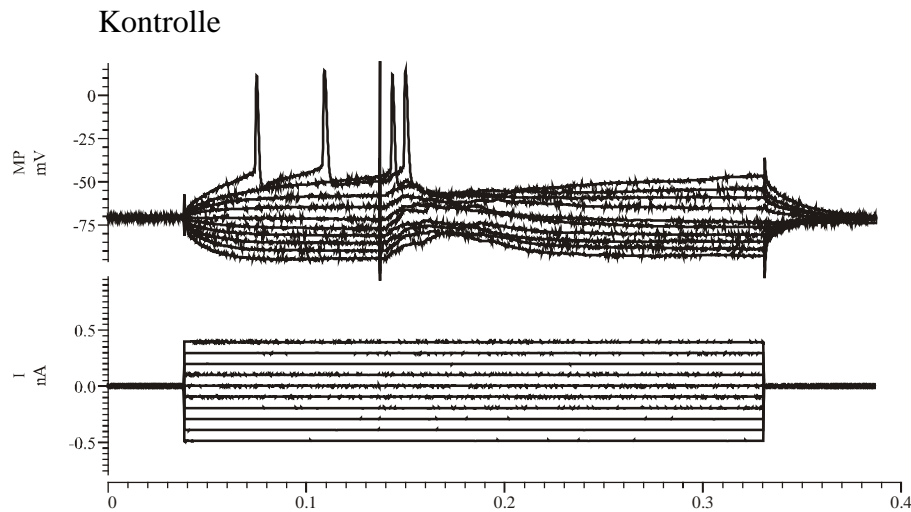


Abbildung 8: Originalregistrierung postsynaptischer potentiale in epileptischem neokortikalem Gewebe (Mensch) bei Reizung mit doppelter Schwellenintensität der weissen Substanz unter aCSF.

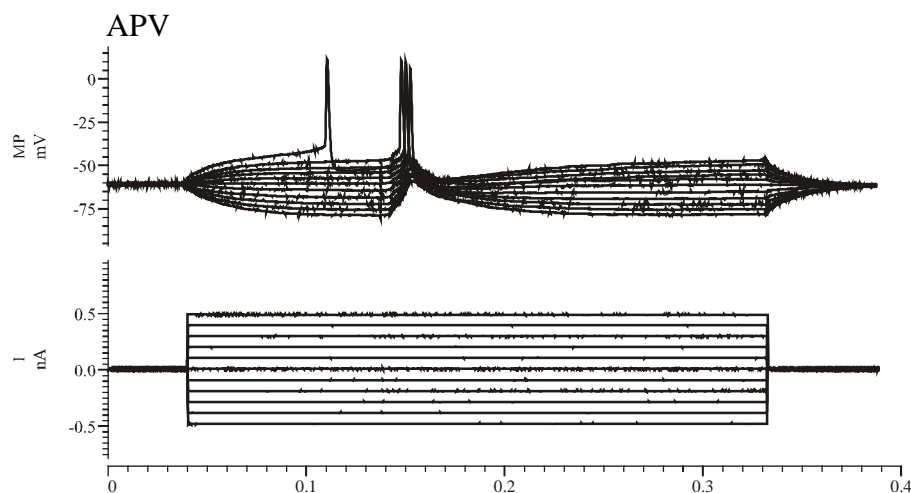


Abbildung 9: Originalregistrierung postsynaptischer potentiale in epileptischem neokortikalem Gewebe (Mensch) bei Reizung mit doppelter Schwellenintensität der weissen Substanz bei Applikation von APV.

Eine zusammenfassende Darstellung der pharmakologischen Charakterisierung postsynaptischer Potentiale in chronisch epileptischem Gewebe und nicht epileptischem Gewebe (Mensch/Ratte) ist in Abb. 10 wiedergegeben. Hier sind die Amplituden, sowie Umkehrpotentiale der unterschiedlichen Komponenten der EPSP/ IPSP/ (GABA_A, NMDA, AMPA/Kainat) dargestellt.

Die Experimente zeigen, dass fokale-induzierte synaptische Ereignisse in sowohl epileptischem menschlichen als auch in nicht epileptischem Rattenneokortex durch glutamaterge und GABA_A-erge Mechanismen vermittelt werden. Dabei werden ca. 20% der glutamatergen EPSP durch NMDA-Rezeptoren vermittelt, (Abb. 10). Signifikante Unterschiede zwischen chronisch epileptischem (Mensch) und nicht epileptischem Gewebe (Ratte) wurden nicht beobachtet.

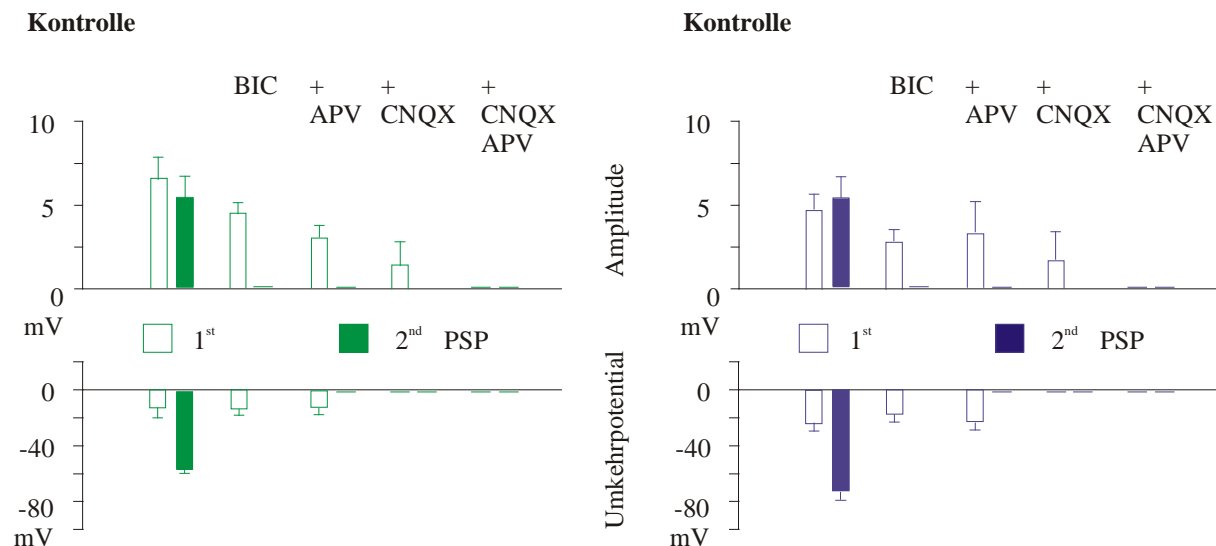


Abbildung 10: Auswertungsdiagramm des Umkehrpotentials (oben) und der durchschnittlichen Amplitudenwerte (unten) bei intrazellulärer Registrierung (links Ratte, rechts Mensch). Es werden durchschnittliche Amplitudenwerte bei Ruhemembranpotential gezeigt im Vergleich zum Umkehrpotential von frühen und späten postsynaptischen Ereignissen als Reaktion auf Antworten bei Schwellenintensitätsstärke, das durch die Analyse der bei verschiedenen Membranpotentialen erhaltenen Antworten ermittelt wurde, die durch Strominjektionen phasenverschoben wurden.

3.2.2 Intrazelluläre Besonderheiten bei Blockierung von GABA_A-Rezeptoren

Im Zuge der Isolation glutamaterger synaptischer Komponenten der evozierten potentialen durch Blockade des GABA_A-Rezeptors zeigte sich in chronisch epileptischem Gewebe eine Besonderheit: Bei einer Zelle war die NMDA-Komponente nach der Blockierung der GABA_A-Rezeptoren grösser als die initial glutamaterg-GABAerg-gemischte Antwort (Abb. 11). Eine solche Reaktion konnte im nicht epileptischen Gewebe nie beobachtet werden. Zudem war ein qualitativer Unterschied zwischen chronisch epileptischem und nicht epileptischem Gewebe zu beobachten. Mit Superfusion von 5 μ M Bicucullin und bei Reizung der weissen Substanz mit doppelter Schwellenintensität (Abb. 12) und bei Reizung der pialen

Oberfläche bei einfacher Schwellenintensität war es das gesunde Rattengewebe und nicht das epileptische menschliche Gewebe, in dem epileptiforme paroxysmale Depolarisationen in einigen Neuronen auftraten (3/13 Zellen von Ratten gegen 0/11 Zellen von Menschen). Solche epileptiformen Entladungen wurden unter Kontrollbedingungen nie beobachtet.

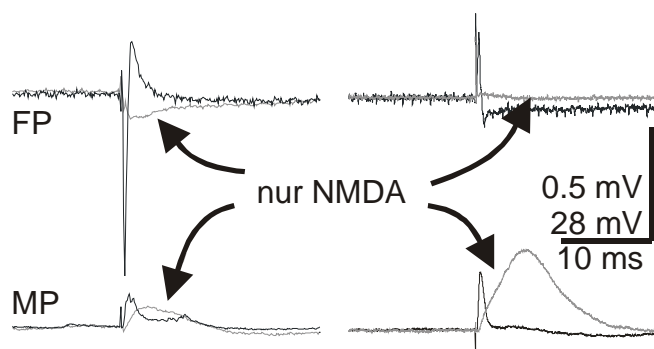


Abbildung 11: Originalregistrierung von Feld (FP)- und Membranpotential-(MP)-Veränderungen bei afferenter Stimulation der weissen Substanz und nach Blockierung von GABA_A und AMPA/Kainat Rezeptoren in chronisch epileptischem neokortikalem Gewebe des Menschen. Die verbleibende NMDA-Komponente vergrößert sich unter GABA_A und AMPA/Kainat-Blockade.

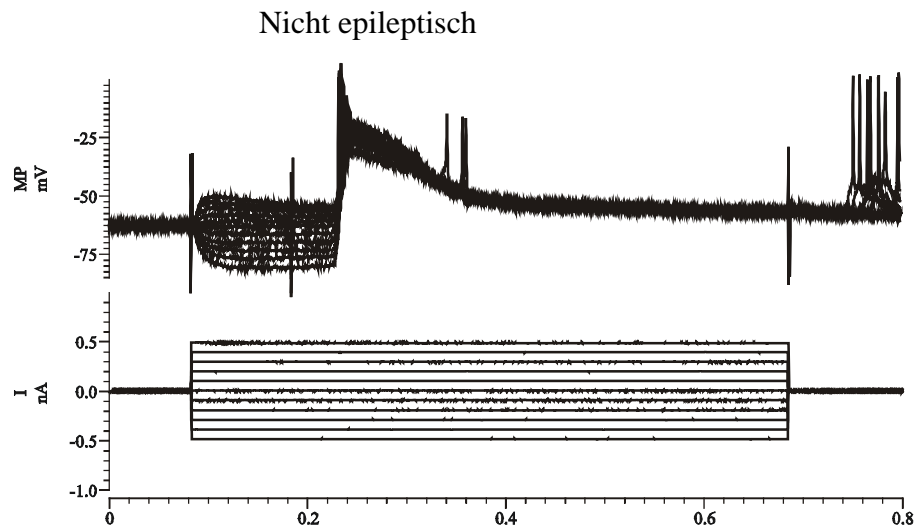


Abbildung 12: Originalregistrierung postsynaptischer Potentiale im nicht epileptischen neokortikalen Gewebe (Ratte) bei afferenter Stimulation der weissen Substanz bei Superfusion mit $5 \mu\text{M}$ Bicucullin mit doppelter Schwellenintensität.

3.2.3 Intrinsische neuronale Entladungseigenschaften

Da angenommen wird, dass intrinsische Entladungsmuster von Neuronen mit der Epileptogenizität des Hirngewebes im Zusammenhang stehen (Chagnac-Amitai und Connors 1989), wurden die intrinsischen Entladungseigenschaften neokortikaler supragranulärer Neurone in sowohl chronisch epileptischem- als auch nicht epileptischem Gewebe getestet und nach Connors und Gutnick (1990) klassifiziert. Abbildung 13 zeigt typische Entladungsmuster der Pyramidalneuronen der Lamina III des Neokortex bei unterschiedlicher Amplitude. Sowohl in chronisch epileptischem wie auch im nicht epileptischen Gewebe fanden sich so genannte „regular firing“ Neurone, d.h., Nervenzellen, die lediglich regelmäßige Abfolgen von einzelnen Aktionspotentialen generieren. So genannte „burst“-Neurone wurden nicht gefunden.

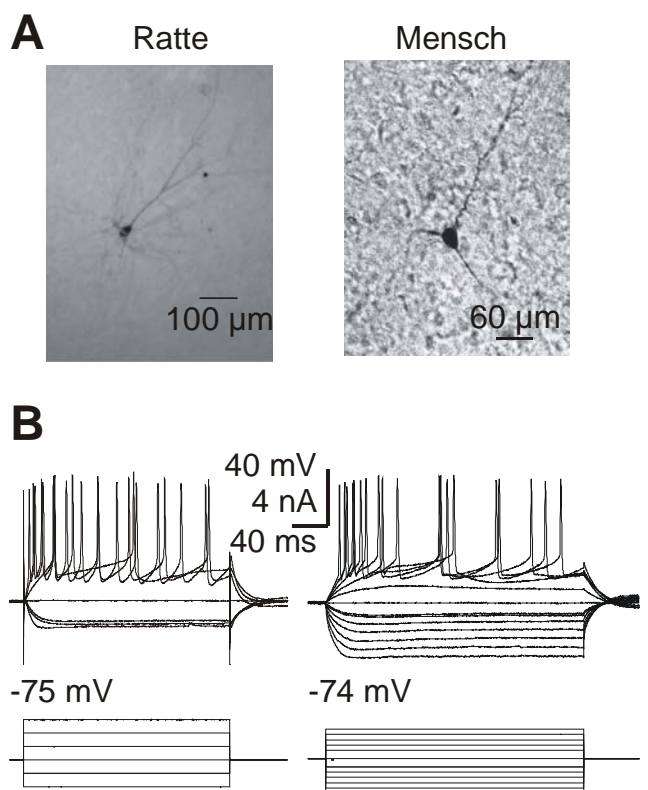
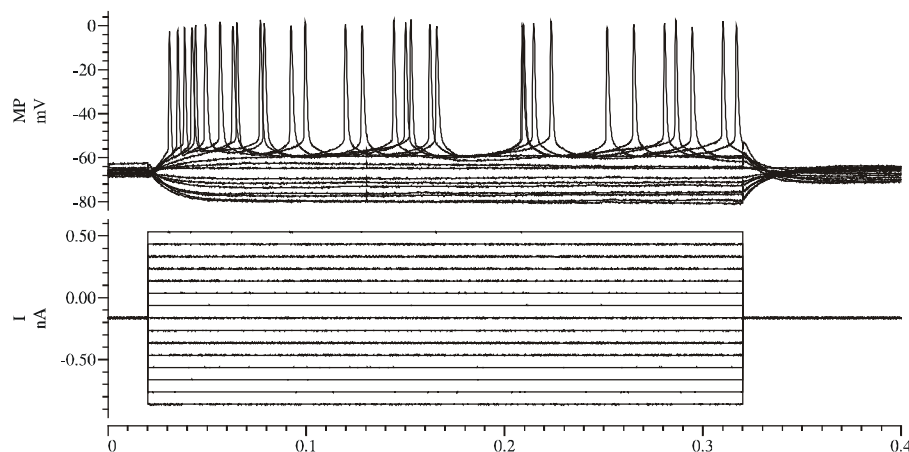


Abbildung 13: A) Pyramidalschicht III-Neuron, links Ratte, rechts Mensch.
B) Entladungsmuster unter Perfusion mit aCSF, links Ratte, rechts Mensch.

Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentration, wie das Absenken der Ca^{2+} -Ionenkonzentration oder der Anstieg der K^+ -Ionenkonzentration, die während epileptischer Aktivität vorkommen, mögen zu entsprechender, d.h., epileptogenen Veränderung im Entladungsverhalten führen. So wurde gezeigt, dass wie die oben erwähnten synaptischen „burst“-Entladungen also Salven von Aktionspotentialen in hippocampalen Neuronen auslösen (Su, Alroy, Kirson und Yaari 2001). In den vorliegenden Experimenten hingegen konnten unter Veränderung des ionalen Mikromilieus keine Aktionspotentialsalven (bursts) beobachtet werden, sei es bei hoch- oder niedrigschwelligem Reizintensitäten, (Reduktion von (Ca^{2+}) auf 1 mM, n=10 chronisch epileptisches Gewebe, n=7 nicht epileptisches Gewebe; Reduktion von (Ca^{2+}) auf 0,5 mM, n=5 nicht epileptisches Gewebe, n=6 chronisch epileptisches Gewebe; Erhöhung von K^+ auf 8mM, n=7 epileptisches Gewebe, n=5 nicht epileptisches Gewebe), (Abb. 14, 15).

A:



B:

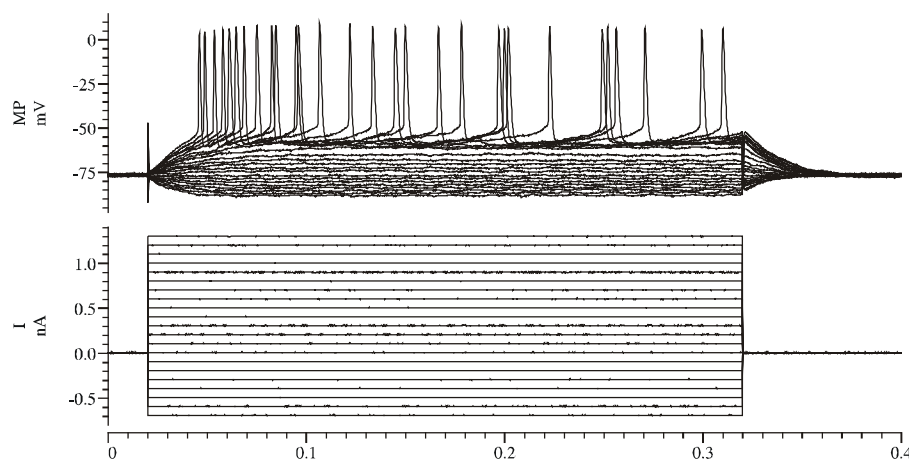


Abbildung 14: A: Reduktion von (Ca^{2+}) auf 1,0 mM im Rattengewebe.
B: Reduktion von (Ca^{2+}) auf 0,5 mM im Rattengewebe.

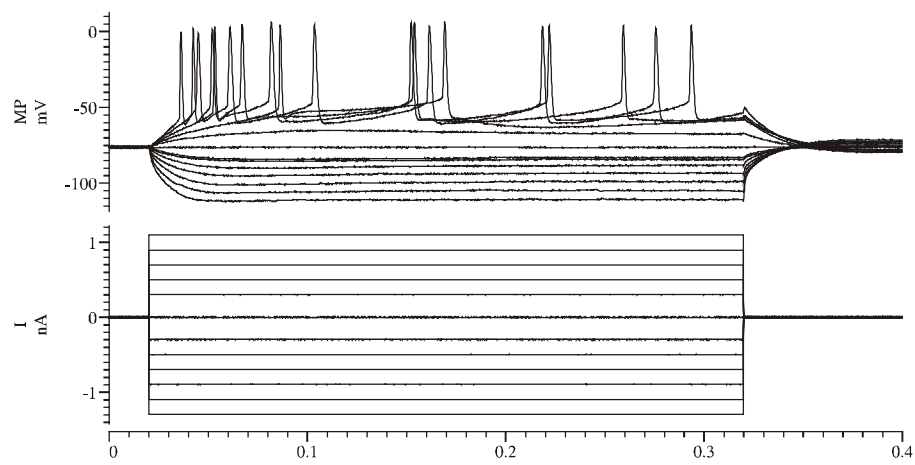


Abbildung 15: Erhöhung von (K^+) auf 8mM im Rattengewebe.

3.3 Untersuchung der evozierten Feldpotentiale

3.3.1 Ableitungen von Feldpotentialen bei Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche bei Schnittpräparaten unter nicht epileptogenen Bedingungen

Da zelluläres neuronales Verhalten bei den Untersuchungen der zellulären Eigenschaften keine wesentlichen Unterschiede zwischen chronisch epileptischem (Mensch) und nicht epileptischem Gewebe (Ratte) auftraten, wurden Analysen der Netzwerkerregbarkeit durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden evozierte Feldpotentiale analysiert. Diese wurden durch afferente Stimulation der weissen Substanz (Stimulation kommissuraler Eingänge) bzw. der pialen Oberfläche (Stimulation von Eingängen über Assoziationsfasern) ausgelöst und jeweils in Lamina 2/3 und Lamina 5, d.h., die für intrakortikale Datenintegration bzw. kortikale Ausgänge zuständigen Schichten registriert. Wie im vorausgehenden Abschnitt wurden diese Untersuchungen a) unter Kontrollbedingungen und b) unter epileptogenen Bedingungen (Veränderungen des ionalen Mikromilieus) vorgenommen (Cohen et al 2002; Mountcastle 1997). Die Reizschwelle lag unter diesen Bedingungen (Reizung der weissen Substanz) bei durchschnittlich $0,48 \pm 0,08$ mA, für chronisch epileptisches Gewebe (Mensch) und $0,74 \pm 0,11$ mA für nicht epileptisches Gewebe (Ratte). Einzelne Stimuli mit zunehmender Intensität bewirkten polyphasische Antworten (Schwellenreizstärke, 2-mal Schwellenreizstärke und 5-mal Schwellenreizstärke) mit gestufter Amplitude und überlagerten Summenaktionspotentialen. Die Feldpotentialantworten in supragranulären Schichten waren in chronisch epileptischen Schnittpräparaten (Mensch) im Vergleich zu nicht epileptischem Gewebe (Ratte) signifikant in ihrer Amplitude als auch in ihrer Dauer herabgesetzt. Dies galt allerdings nicht für Potentiale in den infragranulären Schichten (Abb. 20 und 21). Interessanterweise waren die grössten Reizantworten in nicht epileptischem Gewebe in den supragranulären Schichten zu finden, während keine Amplitudenunterschiede im chronisch epileptischen Gewebe (Mensch) zu beobachten waren.

Um die Beteiligung der verschiedenen glutamatergen Rezeptortypen an der Generierung der evozierten Feldpotentiale zu beurteilen, wurden in weiteren Experimenten NMDA-Rezeptoren, und danach APV ($100 \mu\text{M}$; 30 Minuten Applikation) blockiert. Im weiteren Verlauf wurden AMPA/Kainat Rezeptoren blockiert (CNQX, $20 \mu\text{M}$, 30 Minuten Applikation). Wie aus Abbildung 20 bzw. 21 hervorgeht sind NMDA-Rezeptoren an der Regenerierung der evozierten Feldpotentiale im Wesentlichen nicht beteiligt, während dies für EPSP auf Einzelzellebene durchaus gilt. Unterschiede zwischen chronisch epileptischem (Mensch) und nicht epileptischem Gewebe (Ratte) waren nicht zu verzeichnen.

Eine genauere Analyse der Daten zeigt, dass, sowohl in chronisch epileptischem Gewebe (Mensch) wie auch im nicht epileptischen Gewebe (Ratte) eine Blockade der NMDA-Rezeptoren auftritt.

Die Blockade der übrigen Typen ionotroper Glutamatrezeptoren durch CNQX führte zur praktisch vollständigen Unterdrückung der evozierten Feldpotentiale, sowohl in nicht epileptischem wie auch in chronisch epileptischem Gewebe (Abb. 20 und 21). Dennoch war in nicht epileptischen Gewebeschnitten (n=3) und chronisch epileptischen Gewebeschnitten (n=1) ein wesentlicher Teil der Feldpotentialantworten resistent, so dass bei Mittlung der Daten eine resistuelle Komponente verblieb (Abb. 20).

Die im folgenden aufgeführten Abbildungen zeigen Feldpotentialregistrierungen bei nicht epileptogenen Bedingungen in nicht epileptischem Gewebe bzw. chronisch epileptischem Gewebe bei Stimulation mit Schwellenintensität, sowie doppelter Schwellenintensität und Reizung mit fünffacher Schwellenreizstärke in den supragranulären und infragranulären Schichten bei Reizung der weissen Substanz. Wie in den Abbildung zu sehen ist, wurden im nicht epileptischen Gewebe (Ratte), (Abb. 16 und 17), die grössten Antworten in den supragranulären Schichten gefunden.

Im Gegensatz zum chronisch epileptischem Gewebe (Mensch), (Abb. 18 und 19), hatten Rezeptoren, was nicht zu erwarten war, in ca. 40-60% der Fälle einen Anstieg der Feldpotentialamplituden zur Folge (um ca. 30-80%), während die übrigen Präparate kleinere Amplituden (Verringerung der Amplitude um 30-60%) aufwiesen. Die Heterogenität der Ergebnisse liess sich nicht mit interpathologischen Befunden oder dem Auftreten spontaner Feldpotentiale korrelieren.

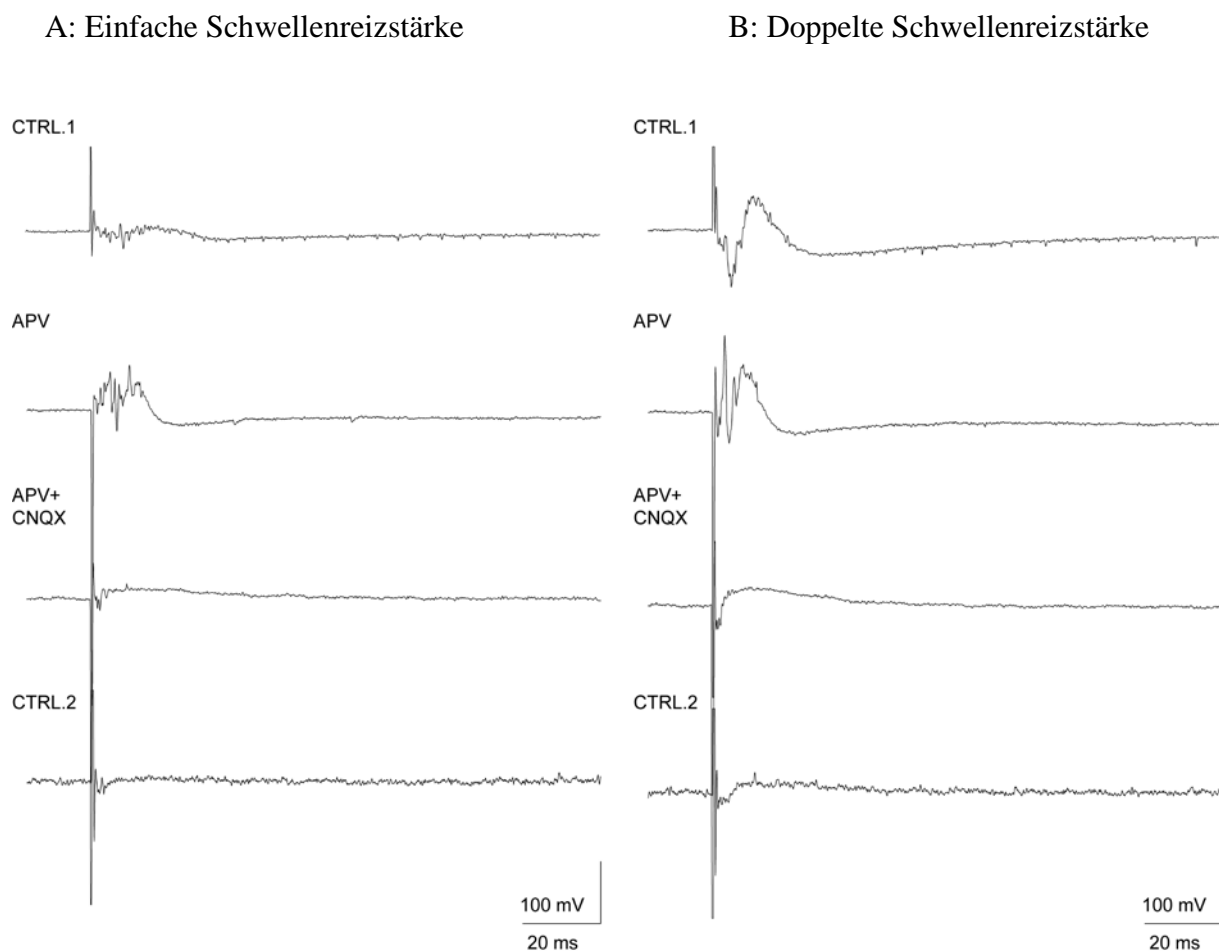
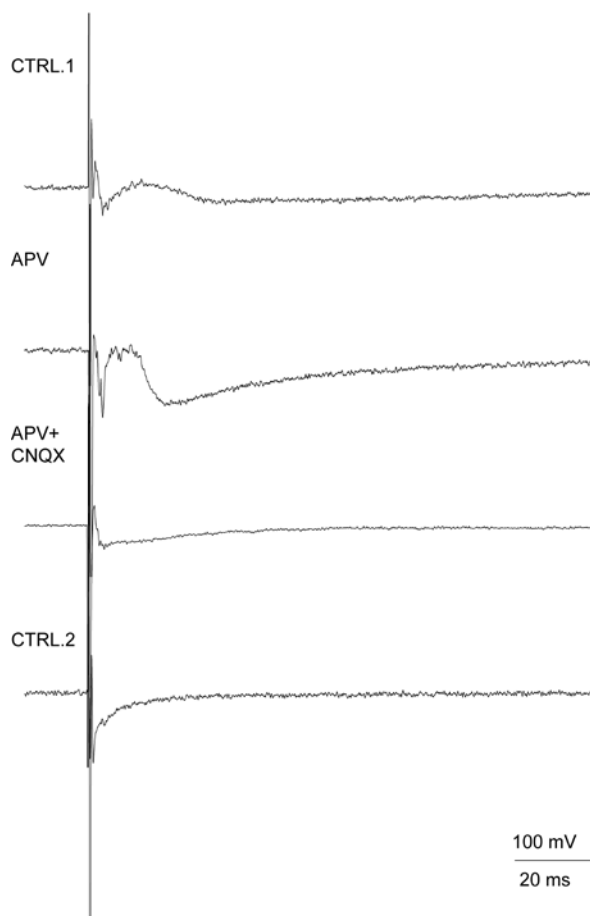


Abbildung 16: Originalregistrierung evozierter Potentiale in nicht epileptischem Gewebe (Ratte) in den supragranulären Schichten. A: Schwellenreizstärke, B: Doppelte Schwellenreizstärke.

Die evozierten Potentiale wurden zunächst unter Kontrollbedingungen (CTRL.1), und dann sukzessive unter Blockade von NMDA- (APV) und NMDA- sowie AMPA-/Kainat-Rezeptoren (APV+CNQX) und schliesslich nach Auswaschung der Toxine (CTRL.2) abgeleitet.

A: Einfache Schwellenreizstärke



B: Doppelte Schwellenreizstärke

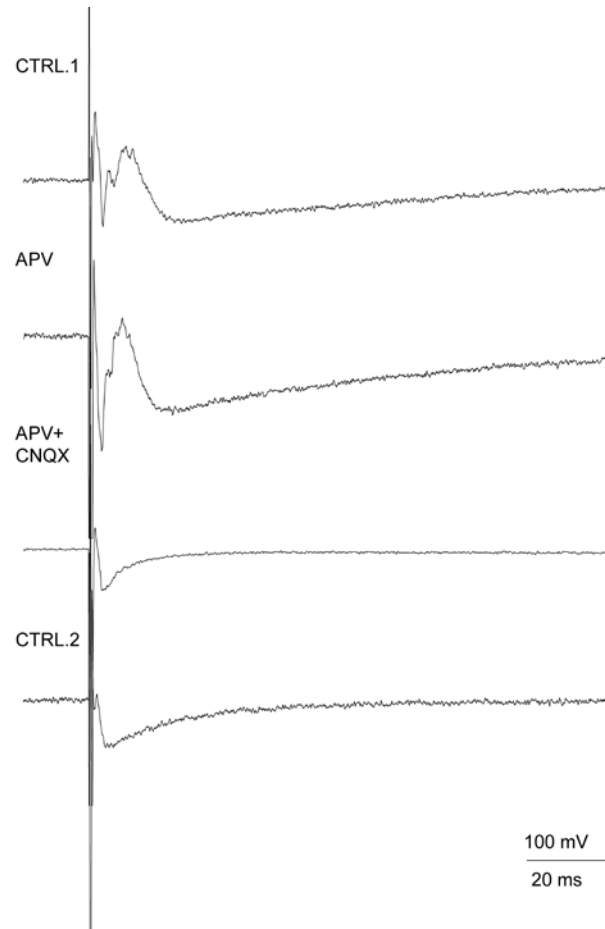


Abbildung 17: Originalregistrierung evozierter Potentiale in nicht epileptischem Gewebe (Ratte) in den infragranulären Schichten. A: Schwellenreizstärke, B: Doppelte Schwellenreizstärke.

Die evozierten Potentiale wurden zunächst unter Kontrollbedingungen (CTRL.1), und dann unter sukzessive unter Blockade von NMDA- (APV) und NMDA- sowie AMPA-/Kainat-Rezeptoren (APV+CNQX) und schliesslich nach Auswaschung der Toxine (CTRL.2) abgeleitet.

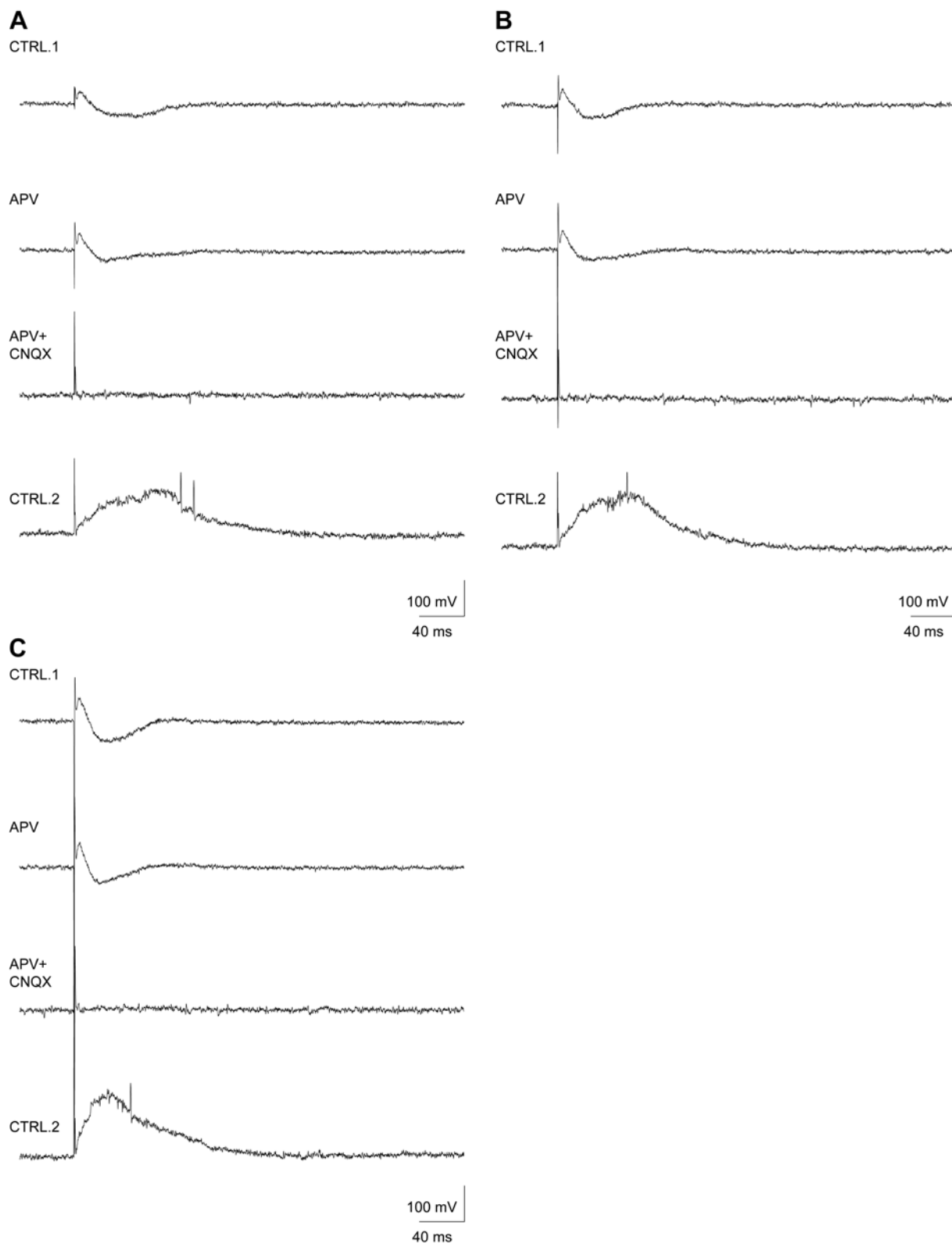


Abbildung 18: Originalregistrierung evozierter Potentiale in epileptischem Gewebe (Mensch) in den supragranulären Schichten. A: Schwellenreizstärke, B: Doppelte Schwellenreizstärke, C: Fünffache Reizschwellenstärke.

Die evozierten Potentiale wurden zunächst unter Kontrollbedingungen (CTRL.1), und dann sukzessive unter Blockade von NMDA- (APV) und NMDA- sowie AMPA-/Kainat-Rezeptoren (APV+CNQX) und schliesslich nach Auswaschung der Toxine (CTRL.2) abgeleitet.

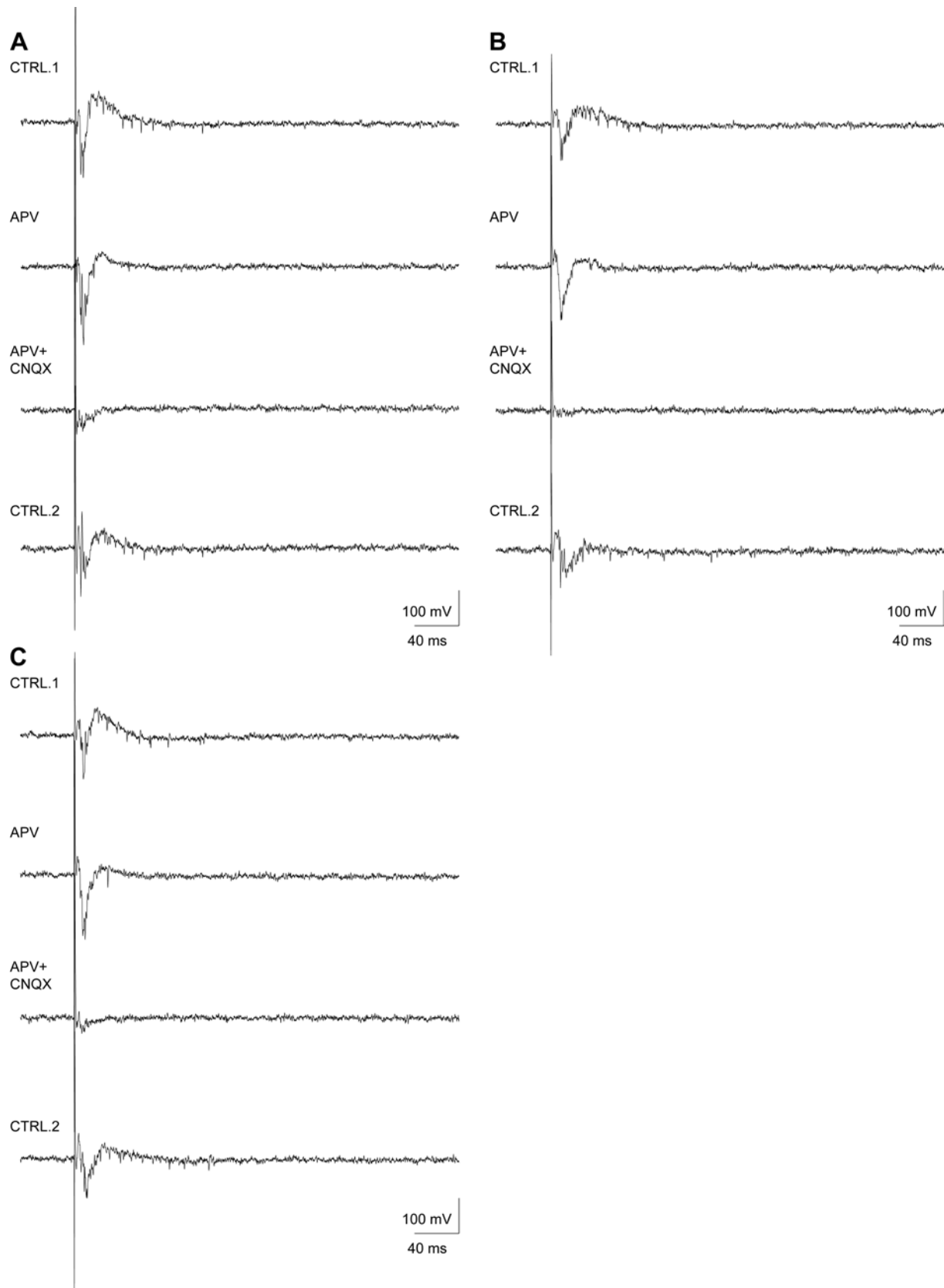


Abbildung 19: Originalregistrierung evozierter Potentiale in epileptischem Gewebe (Mensch) in den infragranulären Schichten. A: Schwellenreizstärke, B: Doppelte Schwellenreizstärke, C: Fünffache Reizschwellenstärke

Die evozierten Potentiale wurden zunächst unter Kontrollbedingungen (CTRL.1), und dann sukzessive unter Blockade von NMDA- (APV) und NMDA- sowie AMPA-/Kainat-Rezeptoren (APV+CNQX) und schliesslich nach Auswaschung der Toxine (CTRL.2) abgeleitet.

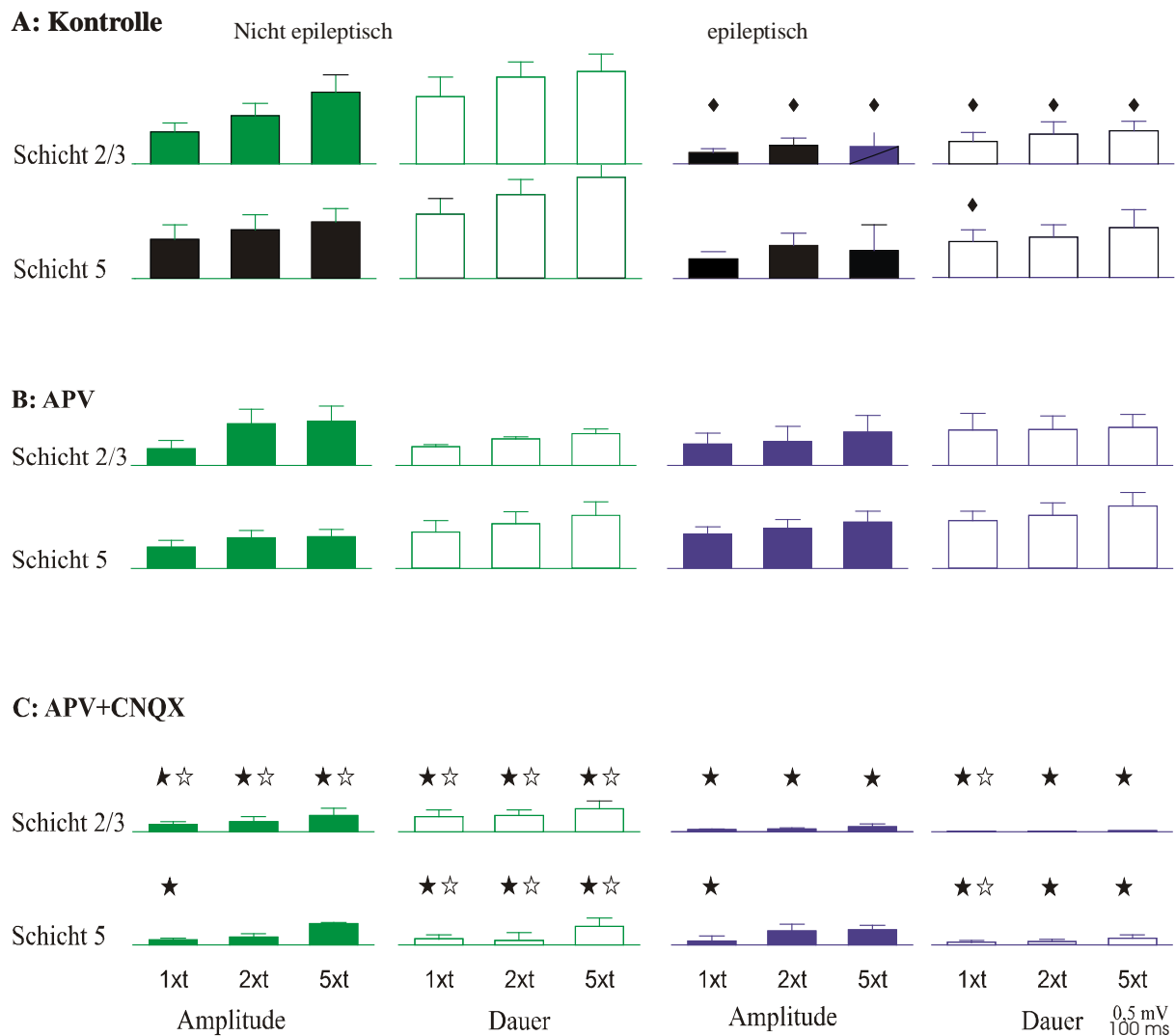


Abbildung 20: Auswertung evozierter Feldpotentiale unter Kontrollbedingungen bei Reizung der weissen Substanz, (links nicht epileptisches Gewebe, rechts chronisch epileptisches Gewebe). Die grauen Balken zeigen die Amplitudenhöhe, die weissen Balken zeigen die Dauer der Reizantwort.

A: Ableitung unter Kontrollbedingungen.

B: Ableitung unter Applikation von APV.

C: Ableitung unter Applikation von APV und CNQX.

★: Signifikante Veränderung gegenüber Kontrollbedingungen.

☆: Signifikante Veränderung gegenüber NMDA-Rezeptorblockade (APV).

♦: signifikante Abweichung von chronisch epileptischem zu nicht epileptischem Gewebe.

3.3.2 Feldpotentialableitungen bei Reizung der weissen Substanz und der pialen Oberfläche bei Schnittpräparaten unter epileptogenen Bedingungen

Es kann angenommen werden, dass unter epileptogenen Voraussetzungen, d.h. Erhöhung von der extrazellulären K^+ -Konzentration, die Netzwerkerregbarkeit von chronisch epileptischem Gewebe verändert wird, da Reduktionen der räumlichen Pufferkapazitäten von epileptischem Gewebe, zumindest in hippocampalem Gewebe beschrieben wurden (Kivi et al. 2000). Die Analyse der Feldpotentialantworten unter epileptogenen Bedingungen zeigte, dass die Potentialantworten im Wesentlichen unverändert blieben (Abb. 22-25). In nicht epileptischem Gewebe wie auch chronisch epileptischem Gewebe (Mensch) konnte ein Anstieg der Amplitude und Dauer evozierter Feldpotentiale beobachtet werden. Dieser Anstieg war allerdings signifikant in infragranulären Schichten chronisch epileptischen Gewebes (Mensch) bei hoher Reizintensität (5-fache Schwellenreizstärke).

Unter epileptogenen Bedingungen schien zumindest in chronisch epileptischem Gewebe eine deutliche NMDA-abhängige Komponente der evozierten Potentiale aufzutreten (signifikant bei Schwellenreizstärke in Schicht 5), da hier nunmehr (anders als unter nicht epileptogenen Bedingungen) die Blockade von NMDA-Rezeptoren zu einer deutlichen Reduktion der Feldpotential-Amplituden führte (Abb. 26). Im Gegenzug war unter Blockade von NMDA/Kainat-Rezeptoren keine residuelle Komponente mehr zu beobachten (Abb. 26).

Interessanterweise zeigte sich, dass unter epileptogenen Bedingungen ($8 \mu M K^+$) im Gegensatz zu nicht epileptischem Bedingungen ($4 \mu M K^+$) evozierte Feldpotentiale in chronisch epileptischem Gewebe (Mensch) gleiche Amplituden und Dauern aufweisen wie in nicht epileptischem Gewebe (Ratte). Dies könnte darauf hinweisen, dass chronisch epileptisches Gewebe eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des extrazellulären Milieus aufweist.

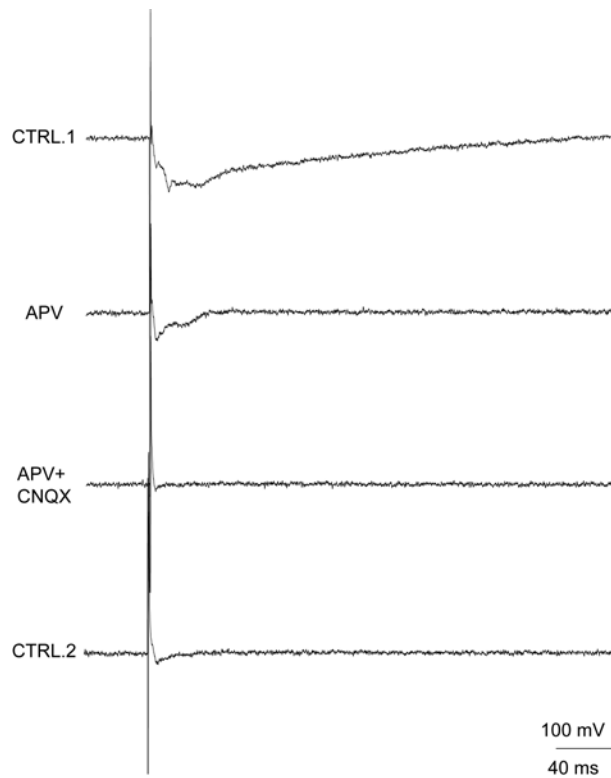


Abbildung 22:
Original Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe bei doppelter Schwellenintensität in den supragranulären Schichten.

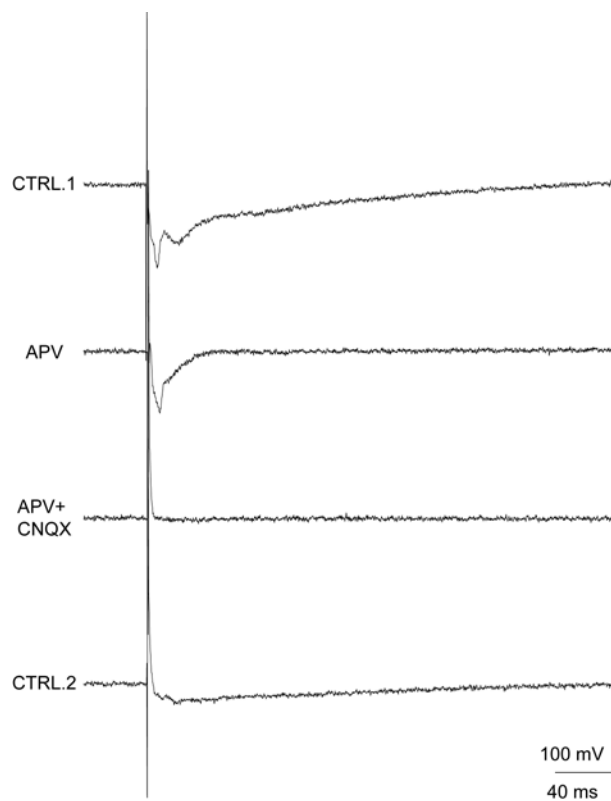


Abbildung 23:
Original Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe bei doppelter Schwellenintensität in den infragranulären Schichten.

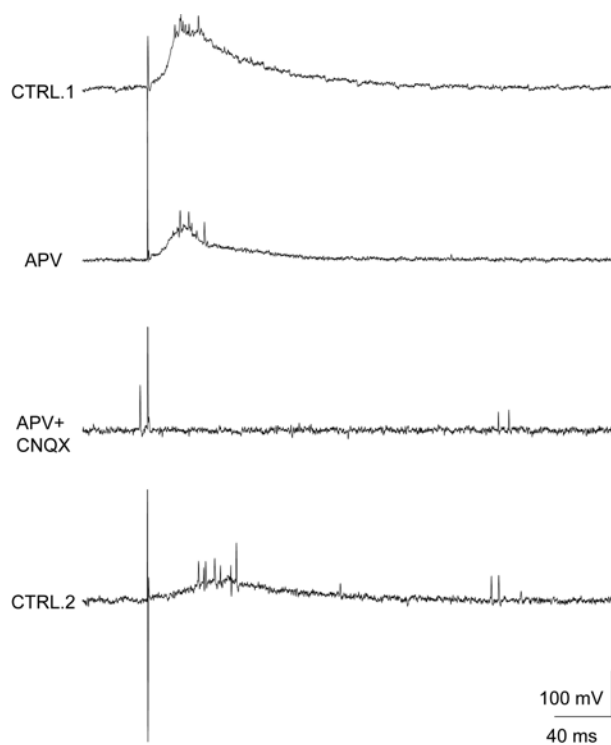


Abbildung 24:
Original Feldpotentialregistrierung von menschlichem Gewebe bei doppelter Schwellenintensität in den supragranulären Schichten.

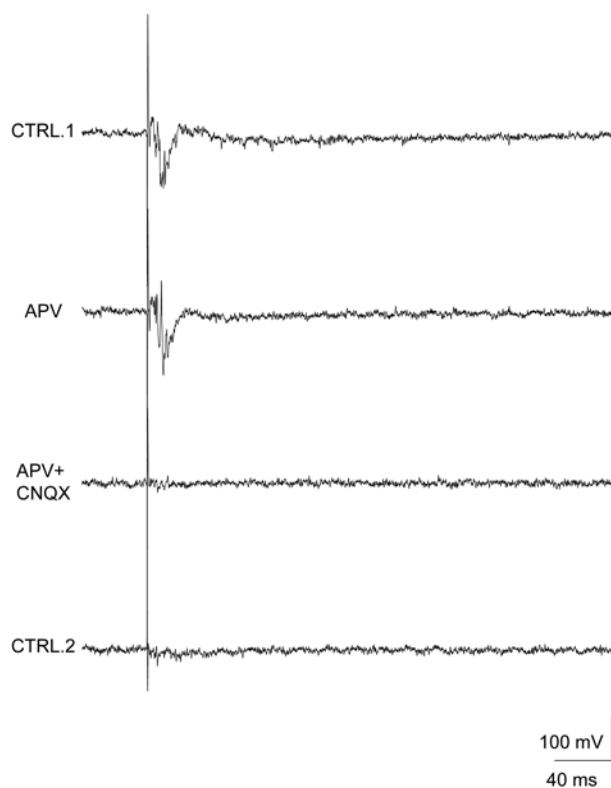


Abbildung 25:
Original Feldpotentialregistrierung von menschlichem Gewebe bei doppelter Schwellenintensität in den infragranulären Schichten.

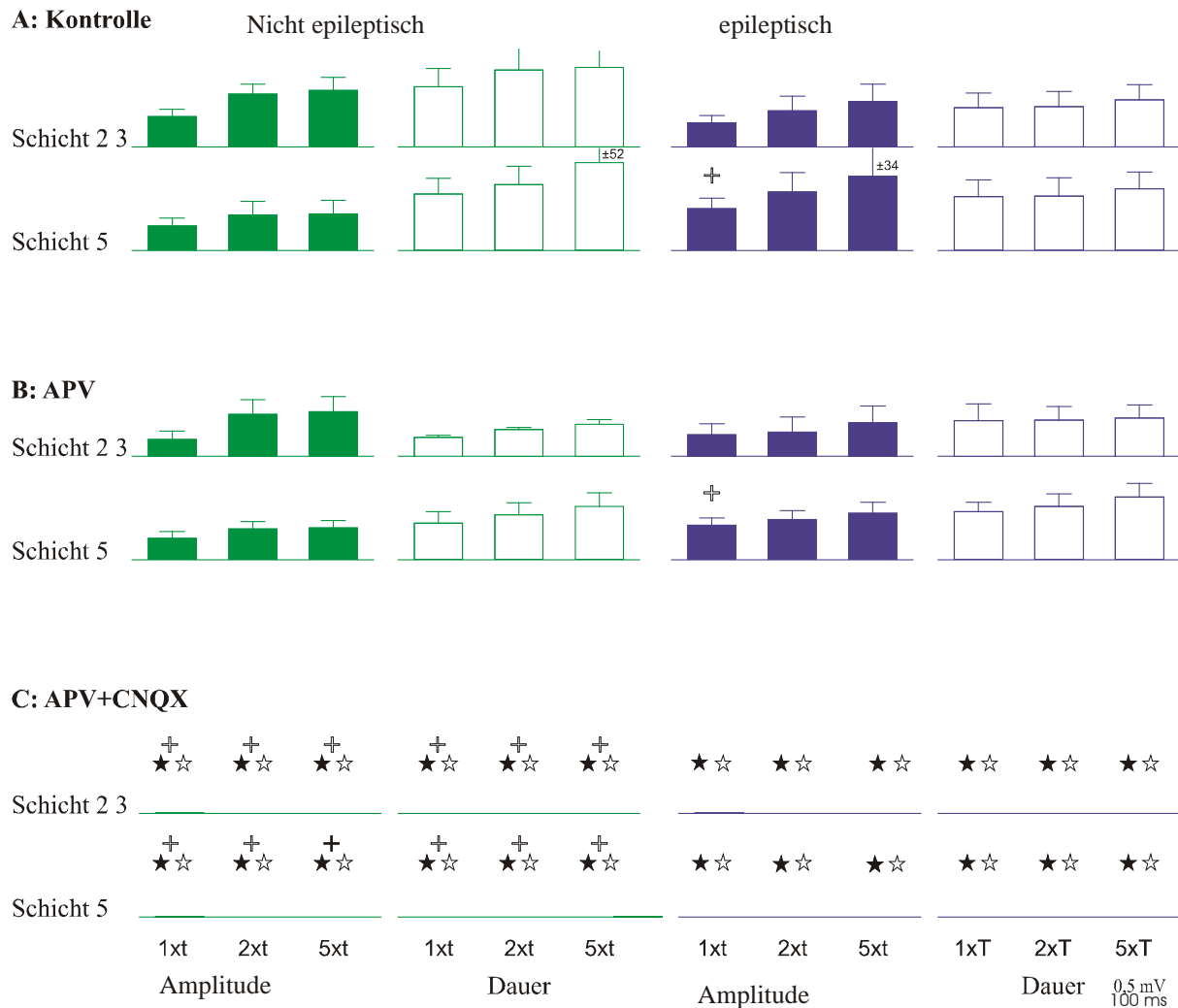


Abbildung 26: Auswertung evozierter Feldpotentiale unter Erhöhung der K^+ -Konzentration bei Reizung der weissen Substanz, (links nicht epileptisches Gewebe, rechts chronisch epileptisches Gewebe). Die grauen Balken zeigen die Amplitudenhöhe, die weissen Balken zeigen die Dauer der Reizantwort.

A: Ableitung unter Kontrollbedingungen.

B: Ableitung unter Applikation von APV.

C: Ableitung unter Applikation von APV und CNQX.

★: Signifikante Veränderung gegenüber Kontrollbedingungen.

☆: Signifikante Veränderung gegenüber NMDA-Rezeptorblockade (APV).

†: Signifikante Abweichung von Bedingungen bei Erhöhung der K^+ -Konzentration zu Kontrollbedingungen.

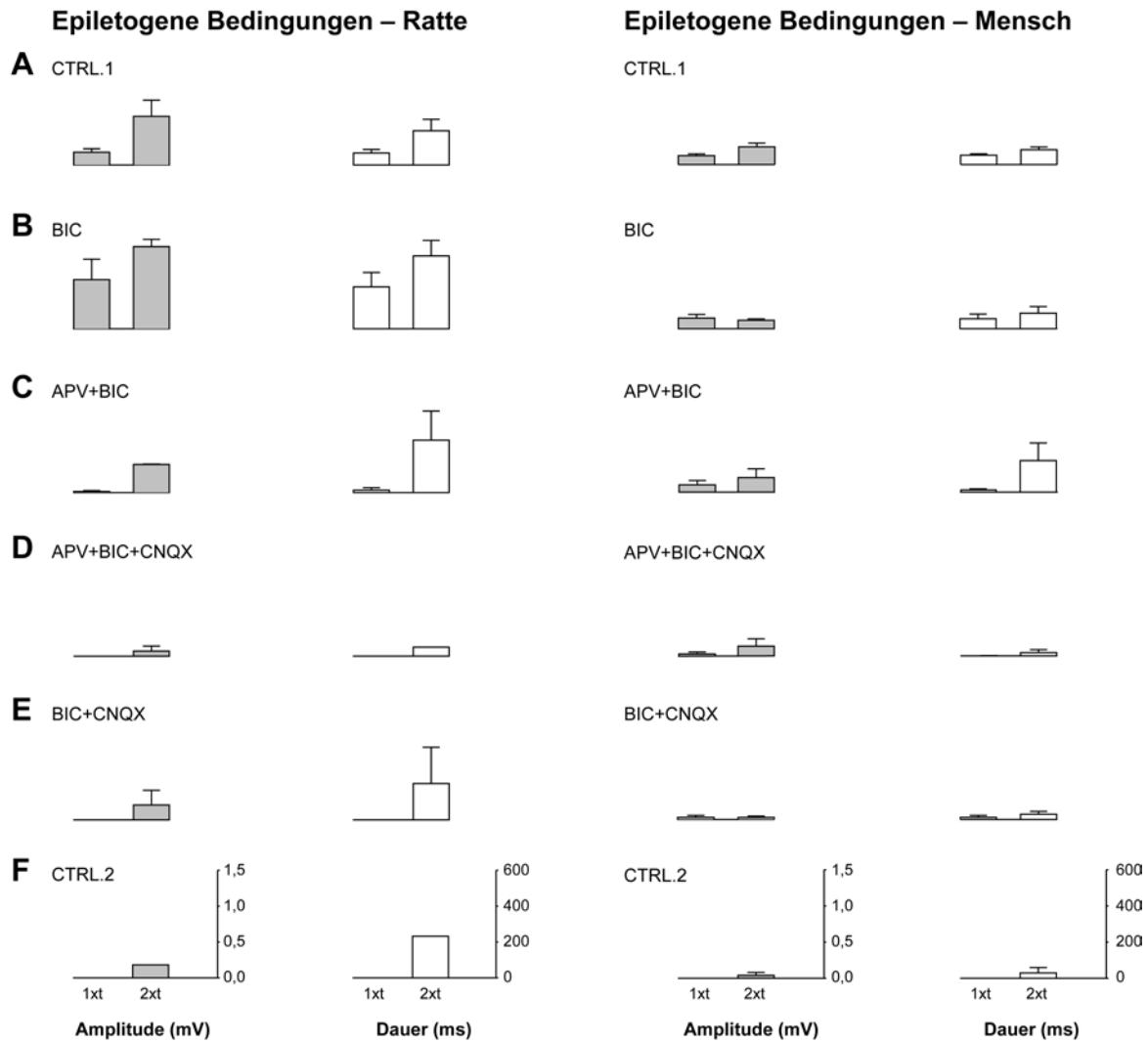


Abbildung 27: Auswertung evozierter Feldpotentiale bei Reizung der pialen Oberfläche unter Erhöhung der K^+ -Konzentration, (links nicht epileptisches Gewebe, rechts chronisch epileptisches Gewebe). Die grauen Balken zeigen die Amplitudenhöhe, die weissen Balken zeigen die Dauer der Reizantwort.

A: Ableitung unter Kontrollbedingungen.

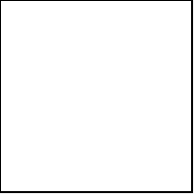
B: Ableitung unter Applikation von Bicucullin.

C: Ableitung unter Applikation von Bicucullin und APV.

D: Ableitung unter Applikation von Bicucullin, APV und CNQX.

E: Ableitung unter Applikation von Bicucullin und CNQX.

F: Ableitung nach Auswaschung der Toxine.



3.4 Doppelreizexperimente

Doppelreizexperimente können Aufschlüsse über synaptische Kurzzeit-Plastizität liefern und können dazu beitragen, Veränderungen in hemmenden Netzwerken festzustellen. Literaturbefunde deuten darauf hin, dass im menschlichen epileptogenen hippocampalen Gewebe doppelreizinduzierte rekurrente Hemmung als möglicher kompensatorischer Mechanismus verstärkt ist (Swanson et al. 1998; Wilson, et al. 1998). Wenig hingegen ist über die Situation in neokortikalem Gewebe in der Nähe epileptischer Foki bekannt. Aus diesem Grund wurden Änderungen evozierter Feldpotentiale bei Doppelreizstimulationen der weissen Substanz unter Verwendung verschiedener Inter-Stimulus-Intervalle (i.s.i. 30, 50, 100 ms), sowohl unter normalen als auch unter epileptogenen Bedingungen (hoher K^+ -Wert) untersucht. Die Doppelreize wurden mit fünffacher Schwellenreizstärke durchgeführt. Wie im vorausgegangenem Abschnitt, wurden auch in diesen Untersuchungen die Anteile von NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptor-vermittelten Potentiale bestimmt.

3.4.1 Doppelreizungsfeldpotentialableitungen unter nicht epileptogenen Bedingungen

Das Balkendiagramm (Abb. 32) zeigt Akzentuierungen bzw. Reduktionen evozierter Potentiale nach vorangegangener Stimulation bei verschiedenen Reizintervallen.

Unter Kontrollbedingungen (nicht epileptisches Gewebe, $n=24$; chronisch epileptisches Gewebe, $n=11$), riefen Doppelpulsstimulationen bei nicht epileptischem Gewebe und chronisch epileptischem menschlichem Gewebe überwiegend Reduktionen (Doppelpulshemmung) der evozierten Potentiale hervor, was als ein Zeichen für intakte rekurrente Unterdrückung gedeutet werden kann. Allerdings gilt dies nicht für chronisch epileptisches Gewebe (Mensch) bei 100 ms Reizschwellenstärke. Hier zeigte sich eine signifikante Häufung von Akzentuierungen als Zeichen eines Verlusts der rekurrenten Hemmung (Abb. 37), ($p=0,048$, χ^2 -Test).

Bei Blockade der NMDA-Rezeptoren blieb bei Doppelreizung eine Doppelpulshemmung zwar erhalten, fiel aber schwächer aus. Diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant.

Da nur wenige Präparate unter Blockade von NMDA- und AMPA-/Kainat-Rezeptoren noch verwertbare Potentiale generierten, wurde auf eine Analyse der Daten unter diesen Bedingungen verzichtet.

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele von Registrierungen von evozierten Feldpotentialen bei Doppelpulsstimulation in den supragranulären neokortikalen Schichten 2/3 (Abb. 28, 30) und infragranulären neokortikalen Schicht 5 (Abb. 29, 31).

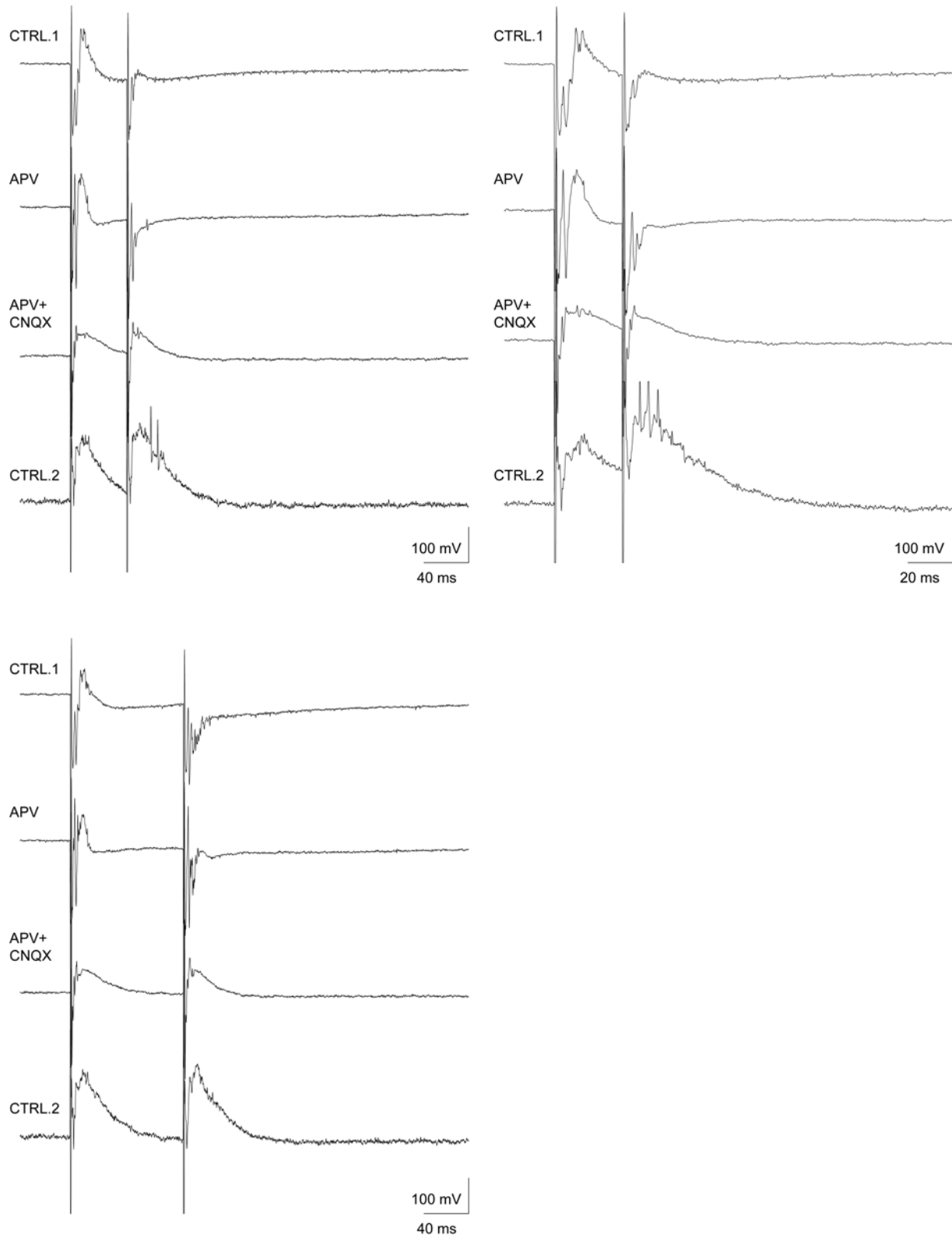


Abbildung 28: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe in den supragranulären Schichten 2/3, bei i.s.i. von 30 ms, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

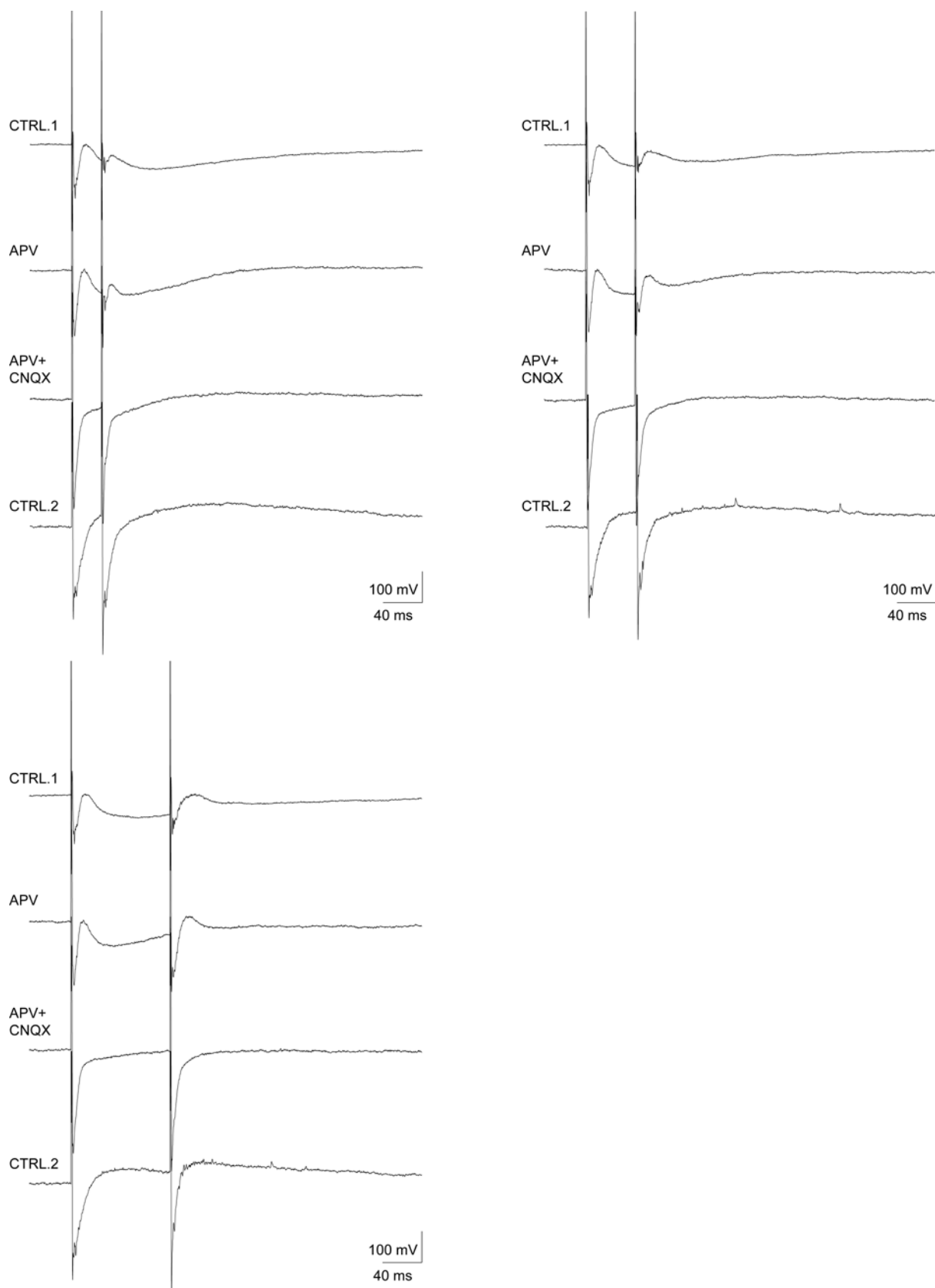


Abbildung 29: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe in den infragranulären Schichten 5/6, bei i.s.i. von 30 ms, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

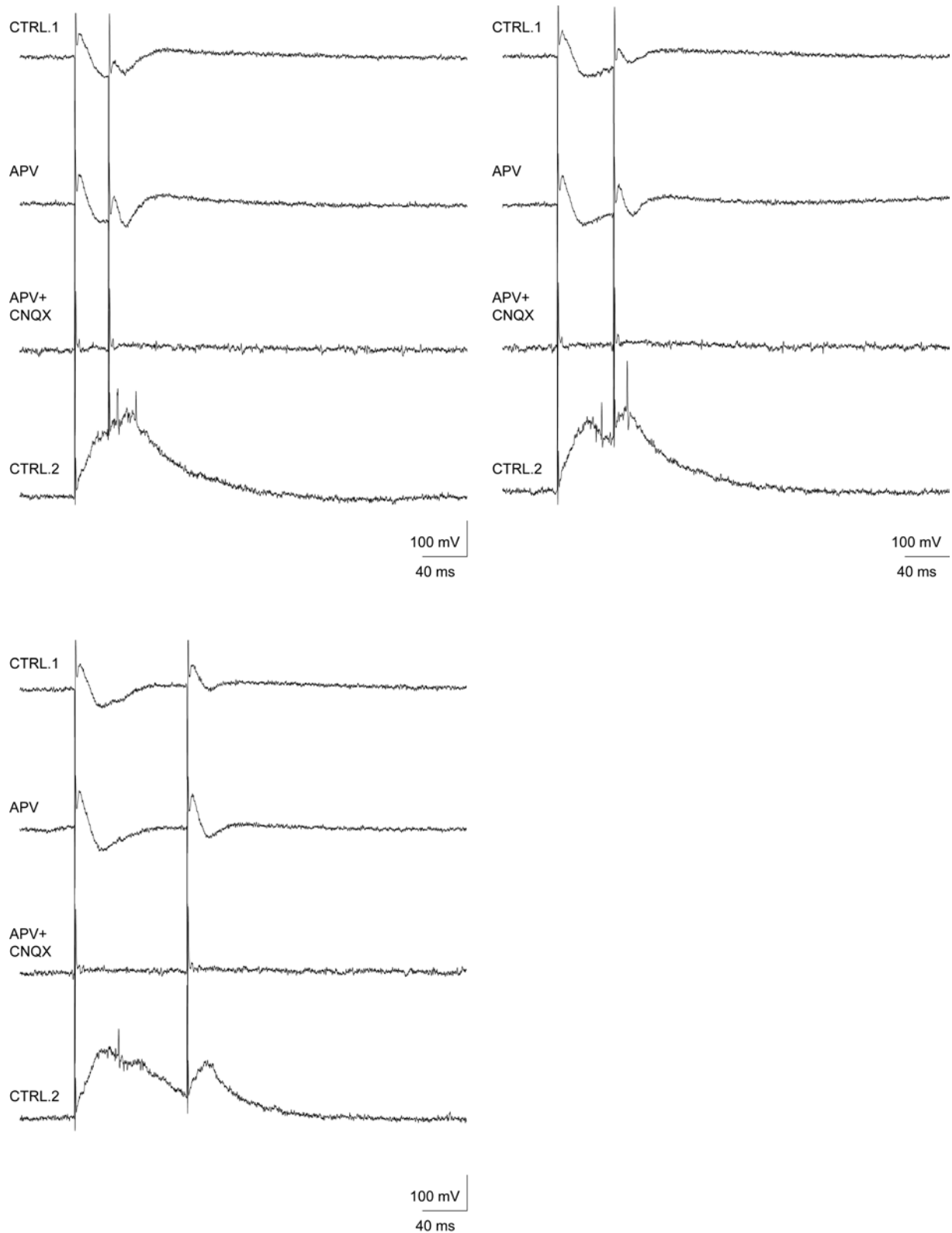


Abbildung 30: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Menschengewebe in den supragranulären Schichten 2/3, bei i.s.i. von 30 ms, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

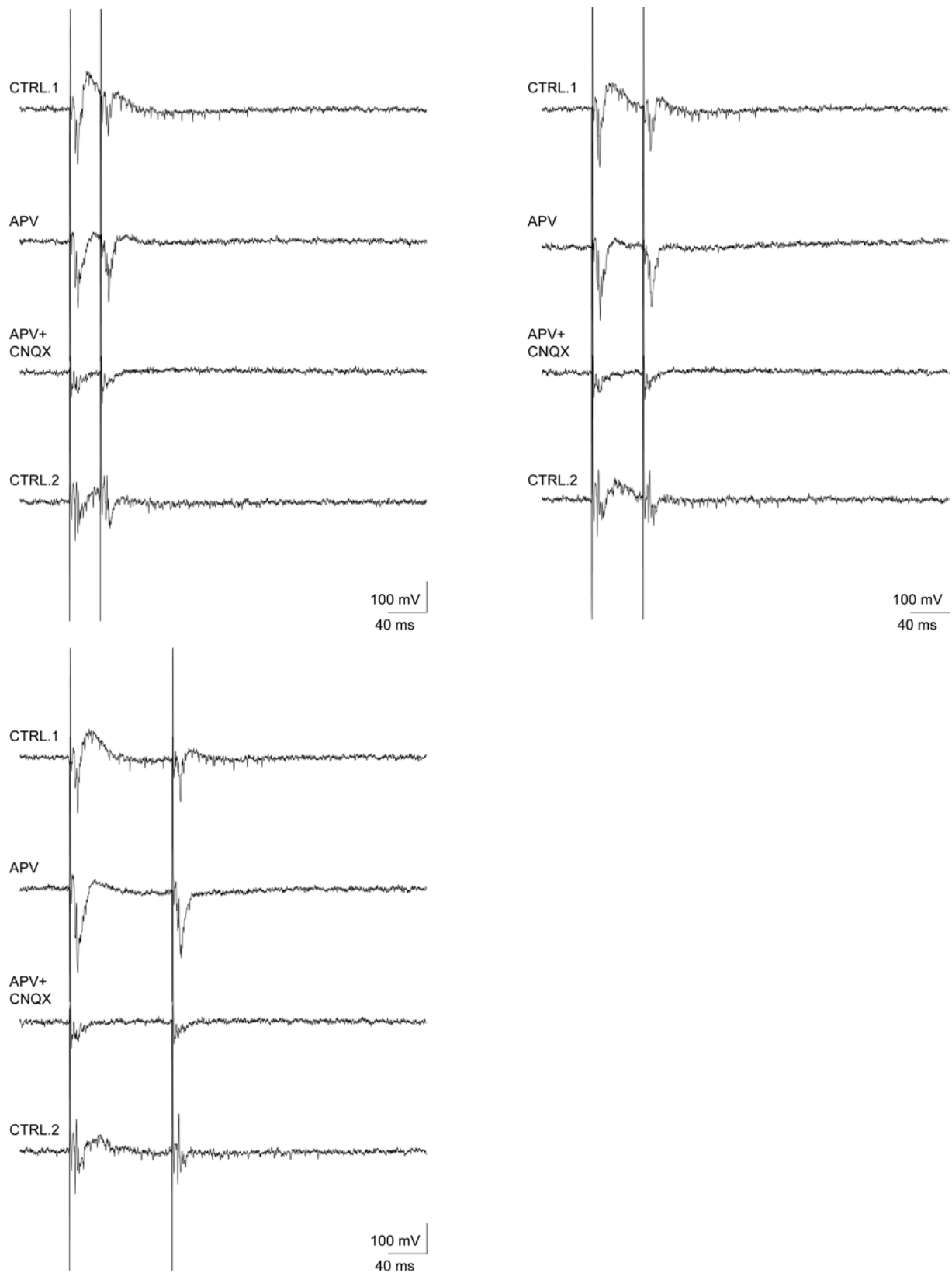


Abbildung 31: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Menschengewebe in den infragranulären Schichten 5/6, bei i.s.i. von 30 ms, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

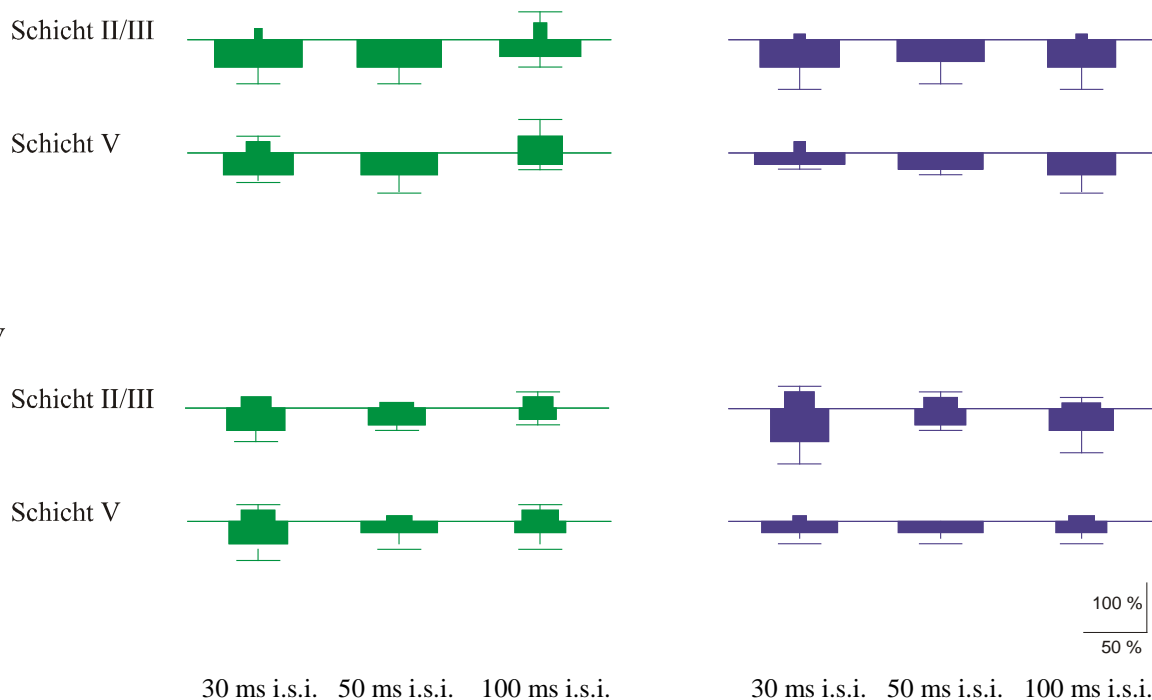
Kontrolle

Abbildung 32: Auswertungsdiagramm der bei Doppelreizungen ausgelösten Akzentuierungen (Balken nach oben) bzw. Depressionen (Balken nach unten) und der Häufigkeit ihres Auftretens in % (Balkenbreite) unter nicht epileptogenen Bedingungen bei Reizung der weissen Substanz. (Links Ratte, rechts Mensch.)

3.4.2 Feldpotentialableitungen bei Doppelreizung unter epileptogenen Bedingungen

Unter epileptogenen Bedingungen (Erhöhung des extrazellulären K^+ -Spiegels auf 8 mM) zeigte sich in chronisch epileptischem menschlichem Gewebe, tendenziert eine höhere Akzentuierung bei Doppelreizung besonders in infragranulären Schichten. Dieser Unterschied war signifikant gegenüber Reizantworten von 100 ms unter nicht epileptogenen Bedingungen (Abb. 37), ($p=0,05$, X^2 -Test, Schicht 5).

Unter Blockade von epileptogenen NMDA-Rezeptoren, zeigten sich heterogene Antworten ohne signifikante Unterschiede zwischen Kontrollbedingungen und Rezeptorblockade oder zwischen nicht epileptischem und chronisch epileptischem Gewebe.

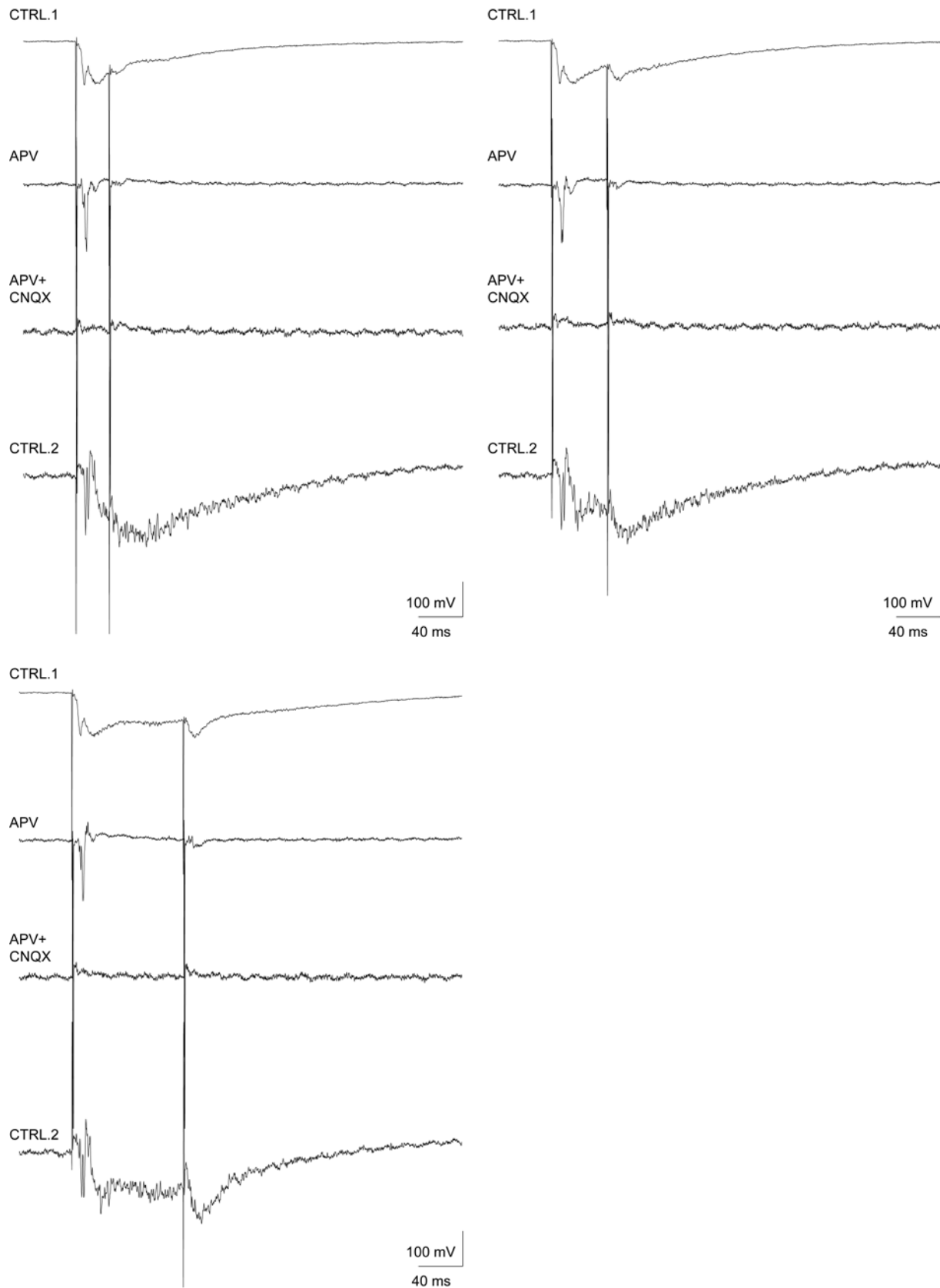


Abbildung 33: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe in den supragranulären Schichten 2/3, bei i.s.i. von 30 ms, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

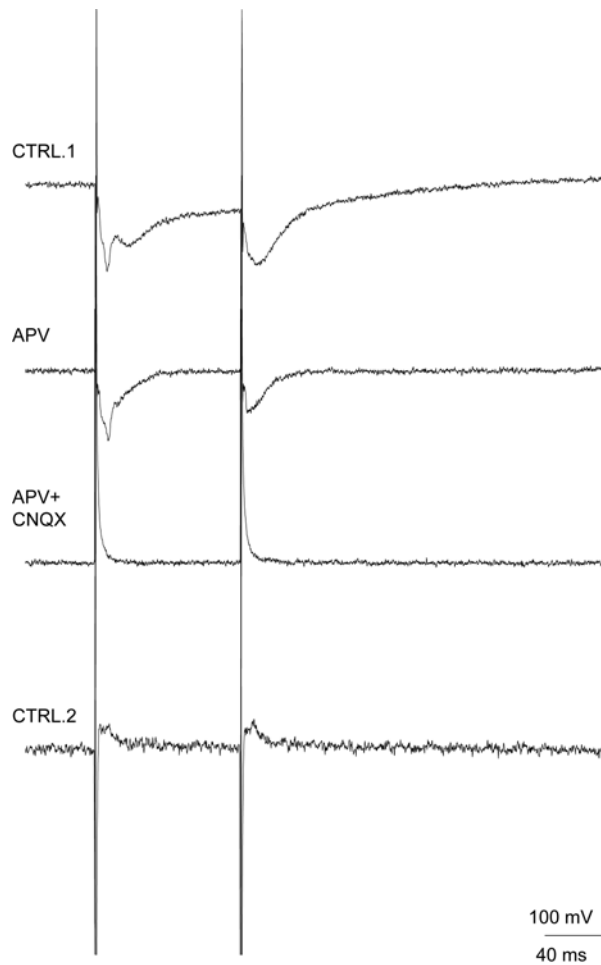


Abbildung 34: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Rattengewebe in den infragranulären Schichten 5/6, bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

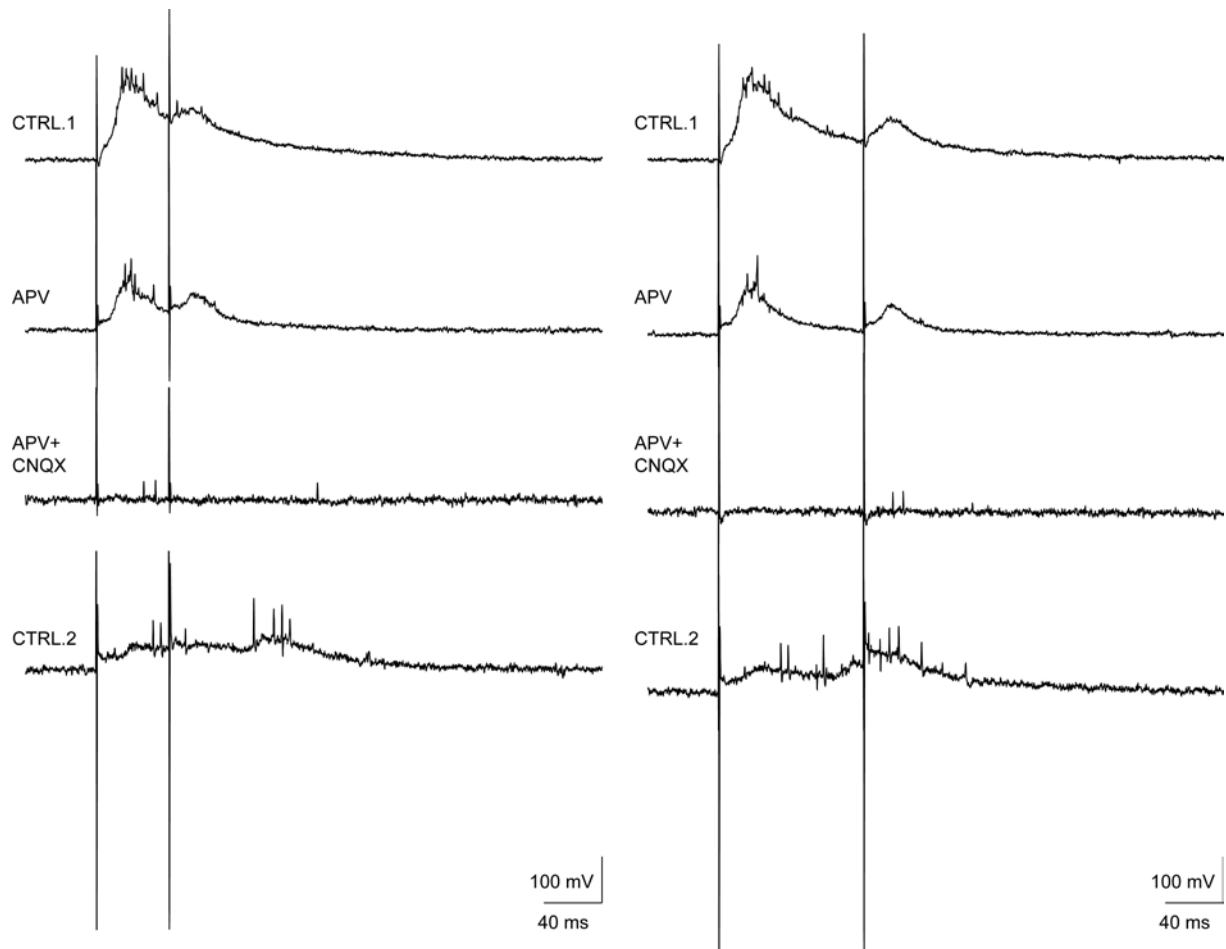


Abbildung 35: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Menschengewebe in den supragranulären Schichten 2/3, bei i.s.i. von 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt jeweils die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle 2 nach Auswaschung der Toxine.

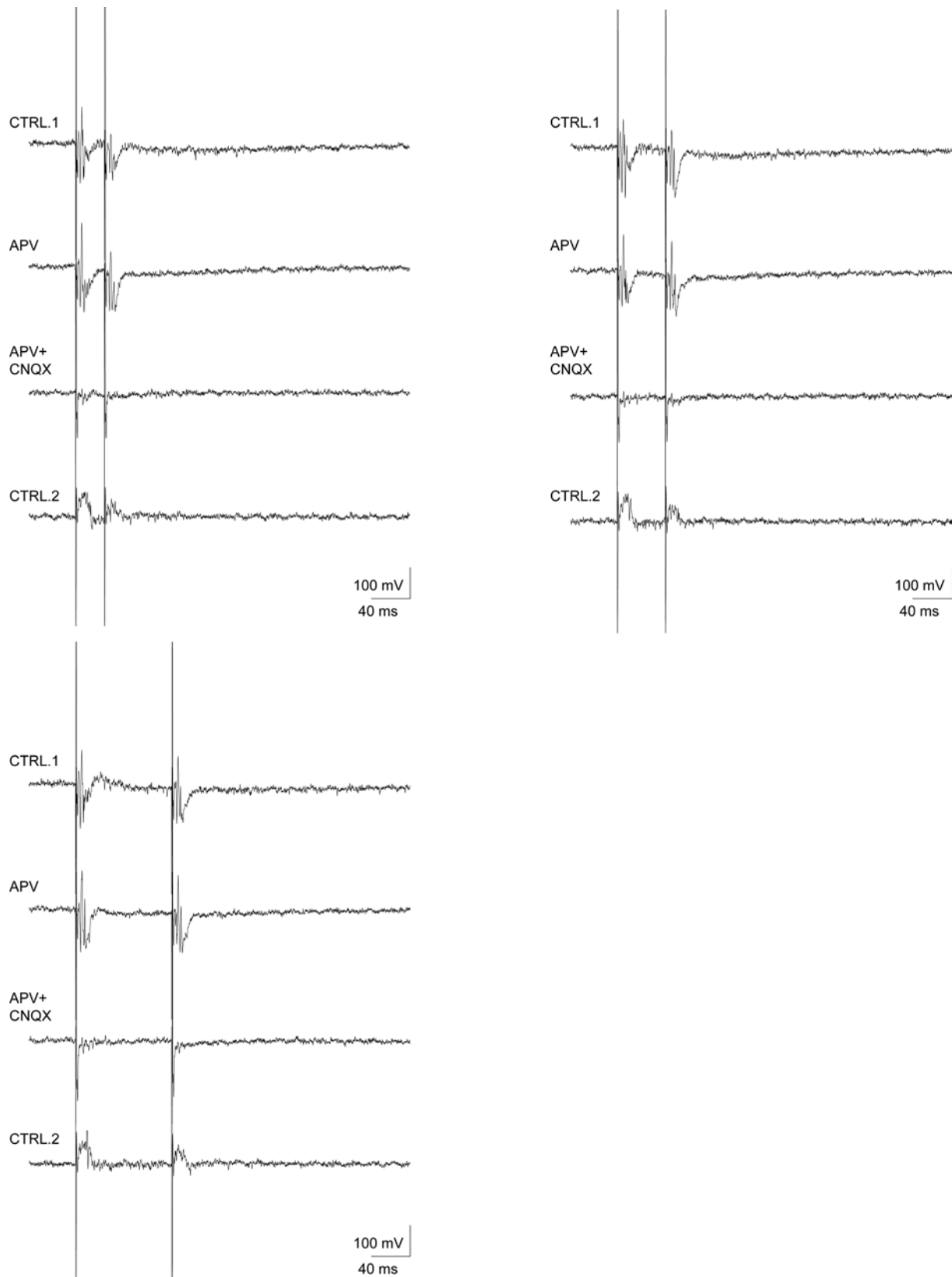


Abbildung 36: Doppelreizung bei Feldpotentialregistrierung von Menschengewebe in den infragranulären Schichten 5-6, bei i.s.i. von 30 ms, 50 ms und bei i.s.i. von 100 ms. Die erste Spur zeigt die Antwort unter aCSF, die zweite bei Applikation von APV, die dritte bei Applikation von CNQX und die vierte Spur ist die Kontrolle wieder unter Gabe von aCSF.

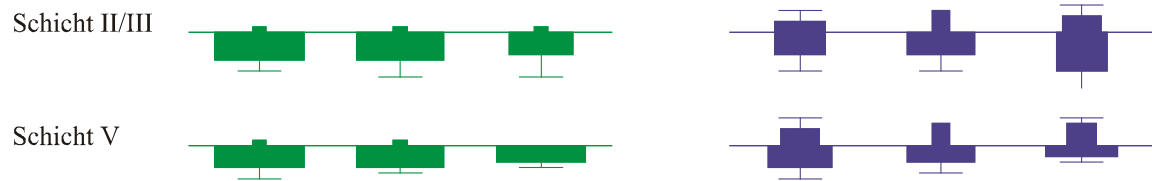
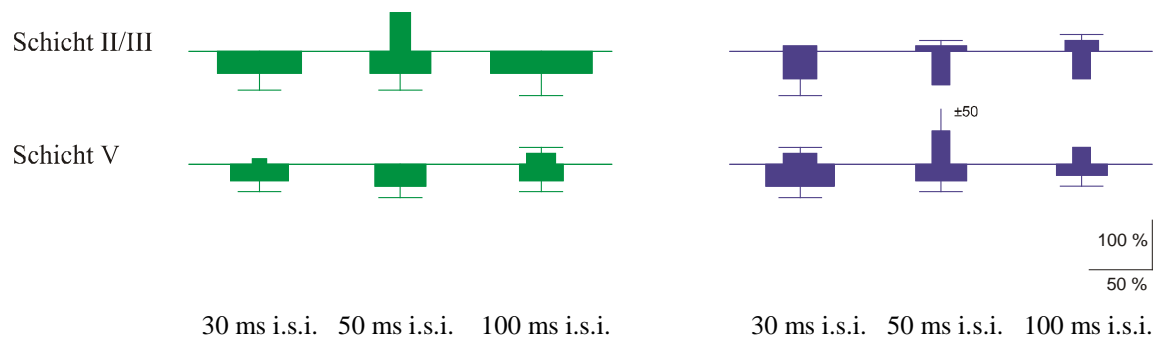
Kontrolle**APV**

Abbildung 37: Auswertungsdiagramm der bei Doppelreizungen ausgelösten Akzentuierungen (Balken nach oben) bzw. Depressionen (Balken nach unten) und der Häufigkeit ihres Auftretens in % (Balkenbreite) unter epileptogenen Bedingungen bei Reizung der weissen Substanz. (Links Ratte, rechts Mensch.)

Diskussion

4.1 Neuronale Entladungseigenschaften

Neuronale Burst-Entladungen werden häufig als ein Merkmal für epileptische Aktivität gesehen. Die vorliegende Untersuchung zeigt sowohl bei menschlichem, wie bei neokortikalem Gewebe der Ratte ein regelmäßiges neuronales Entladungsmuster (Abb. 14, 15). Nach Luhmann et al. (1998) ist dies ein typischer Befund. Einige Publikationen zeigten jedoch, dass „Burst“-Entladungen als mögliches Zeichen erhöhter epileptischer Aktivität in menschlichem epileptogenem neokortikalem Gewebe selten vorkommt (Avoli und Williamson 1996; Deisz 1999; Hwa und Avoli 1992; Jiang und Haddad 1992; Prince und Wong 1981). So untermauern viele neuere Studien das Fehlen von Neuronen, die „Burst“-Entladungen generieren, nicht nur in supra- sondern auch in infragranulären Schichten (Avoli et al. 1994; Avoli und Olivier 1998; Foehring et al. 1991; Tasker et al. 1996). Colder et al. (1996) haben angenommen, dass nahe einer epileptogenen Läsion „Burst“-Entladungen als im Rahmen eines möglichen adaptiven Prozesses reduziert werden. So scheint die Frage, ob „Burst“-Entladungen und epileptische Aktivität zusammenhängen, noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Dies entspricht den hier vorliegenden Beobachtungen, dass im Gegensatz zu den hippokampalen CA1-Neuronen (Su et al. 2001) neokortikale Zellen selbst bei Veränderung des ionalen Mikromilieus keine „Burst“-Entladungen generieren. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene mögliche „Schrittmacher-Neuron“, dass Aktionspotentiale vor den jeweils spontanen steilen Feldpotentialentladungen generierte (Abb. 2), war auch nur ein regelmässig entladendes („regular-firing“) Neuron (Koch et al. 2005).

4.2 Neuronale synaptische Antworten

Vorhergehende Untersuchungen im menschlichen epileptogenen hippokampalen Gewebe zeigten, dass bei chronischer Epilepsie neuronale synaptische Eigenschaften verändert werden. So wurde von ungewöhnlich verlängerten GABA-vermittelten synaptischen Potentialen (Williamson et al. 1995; Avoli et al. 2005; Klaassen et al. 2006) und stark variablen NMDA-Rezeptorabhängigen Antworten (Isokawa et al. 1997; Isokawa und Mathern 1999; Isokawa 2000; Beck et al. 2000) berichtet und davon, dass Veränderungen synaptischer Potentiale häufiger im Hinblick auf erregende und seltener auf hemmende synaptische

Potentiale vorkommen (Knowles et al. 1992; Naylor et al. 2005; Löscher 2007). Obwohl laterale temporale Hirnstrukturen häufig nicht als der eigentliche Fokus der epileptischen Erregungsausbreitung in der Temporallappenepilepsie angesehen, sondern eher als eine irritative Zone betrachtet werden, berichteten neuere Untersuchungen davon, dass sich nicht nur die meisten Anfälle zu den ipsilateralen neokortikalen Bereichen verbreiten (King und Spencer 1995), sondern dass, (vielleicht als eine Folgeerscheinung oder sogar einen noch weiter reichenden Effekt von Temporallappenepilepsie), strukturelle abnorme Veränderungen (Moran et al. 2001) und Plastizitätsveränderungen (Mikkonen et al. 1998) die Erregungsausbreitung weit über den Hippokampus hinaus verlängerten. So fanden Marco und DeFelipe (1997) Anzeichen, dass die Anzahl exzitatorischer Synapsen gegenüber hemmenden Synapsen morphologisch überwiegen. Dies könnte bedeuten, dass Veränderungen der synaptischen Eigenschaften auch epileptisches neokortikales Gewebe verändern. Untersuchungen von Telfeian et al. (1999), Hwa und Avoli (1992), Prince und Wong (1981) zeigten, dass synaptische Aktivierung „Bursts“ oder sich wiederholende Entladungen triggert. Im Gegensatz dazu zeigt die hier vorliegende Untersuchung keine auffallenden Veränderungen der synaptischen Potentiale als Antwort auf Stimulationen aufsteigender Intensität auf. Ähnlich wie bei Nagetierneuronen bestanden im vorliegenden Fall alle neuronalen Synapsen aus einer Sequenz von De- und Hyperpolarisierungen des Membranpotentials (Luhmann et al. 1998). Diese wurden durch die AMPA/Kainat-Rezeptoren (Vincent und Mulle 2008) und in geringerem Ausmass auch durch NMDA- und GABA_A-Rezeptoren vermittelt (Köhling 2002; Mann und Mody 2008). Die hier vorgefundene sequentielle Abfolge glutamaterger, depolarisierender und GABA-erger hyperpolarisierender Membranpotentialänderungen und das Auftreten erregbarer NMDA-abhängiger Potentialkomponenten bei GABA_A-Blockade stimmen mit anderen Untersuchungen überein (Avoli et al. 1994; Avoli und Olivier 1998; Dudek et al. 1995; Tasker et al. 1992). Dies bestätigt, dass es unwahrscheinlich ist, dass synaptische Veränderungen zur epileptogenen Aktivität des neokortikalen epileptischen Gewebes beitragen. Tatsächlich mag der Befund, dass bei Applikation niedriger Bicucullinkonzentration, (also bei eingeschränkter GABA_A-Rezeptorfunktion), Depolarisationen nur in nicht epileptischem Gewebe (Ratte) auftraten, auf einen adaptiven Prozess chronisch epileptischen Gewebes hinweisen (Köhling et al. 2003).

4.3 Synaptische Netzwerkaktivität

Während Einzelzellantworten auf fokale Stimulation keine Anzeichen veränderter Erregbarkeit zeigten, mag eine afferente Stimulation der weissen Substanz, wegen der komplexen Netzwerkverknüpfungen (Kohn et al. 2000; Mountcastle 1997) eine erhöhte Epileptogenizität aufdecken. Derartige afferente Stimulationen bedingt, sowohl im Rattengewebe als auch im menschlichem Schnittpräparat eine kolumnare Aktivierung der darüber liegenden neokortikalen Schichten (Kohn et al. 2000, Straub et al. 2003). Dementsprechend fand sich in der vorliegenden Arbeit Netzwerkaktivität sowohl in infra- als auch in supragranulären Schichten (Kohn et al. 2000, Straub et al. 2003). Diese Aktivität war sowohl im nicht epileptischem wie auch im chronischem epileptischem Gewebe polyphasisch und spiegelt vermutlich eine Abfolge von EPSP und IPSP (Biella et al. 2001), sowie direkte und interlaminare Aktivierungsmuster wieder (Kohn et al. 2000). Anstelle der eigentlich erwarteten vergrößerten Reizantworten im menschlichen Gewebe als Zeichen der Übererregbarkeit fand sich in der vorliegenden Arbeit eine allgemein abgeschwächte Aktivierung. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Gliose gesehen werden, die in den meisten Gewebeschnitten vorhanden war und zu fokalem oder homogenem Zellverlust geführt haben mag, wie auch Marco und DeFelipe (1997) berichteten. Unabhängig davon unterscheidet sich das Netzwerk im chronisch epileptischem Gewebe von dem im nicht epileptischem Gehirn dadurch, dass vor allem infragranuläre Schichten während der Stimulation der weissen Substanz aktiviert wurden (Straub et al. 2003). Die synaptische Zusammensetzung der Signale ist jedoch bei chronisch epileptischem und nicht epileptischem Gewebe gleich, insofern als das NMDA-Rezeptoren praktisch nicht (jedenfalls unter nicht epileptogenen Bedingungen) zur Netzwerkaktivierung beitragen. Die Tatsache, dass eine Blockade der NMDA-Rezeptoren in einigen Fällen tatsächlich zu einem Anstieg der Potentiale führte, verdient eine kurze Diskussion: Vorausgesetzt, dass das Ausmass der Netzwerkaktivierung bei afferentem Stimulus durch hemmende Aktivität kontrolliert wird (Kohn et al. 2000), würde bedeuten, dass sich NMDA-Rezeptoren möglicherweise hauptsächlich auf Interneuronen befinden. Die verbleibenden Antworten nach selbst vollständiger Blockade der schnellen glutamatergen Transmission könnten durch eine direkte antidrome Aktivierung der rekurrenten Fasern oder durch GABA-erge synaptische Aktivität (oder durch beides) erklärt werden. Es kann also, ausser im Hinblick auf geringfügige Unterschiede bezüglich der laminaren Aktivierungsmuster, die tatsächlich auf eine verringerte

Erregbarkeit des menschlichen Gewebes hinweisen, kein Anzeichen einer erhöhten epileptischen Erregbarkeit beobachtet werden.

4.4 Erhöhung der Epileptogenität durch erhöhte Kaliumkonzentration

Wenn der laterale Temporallappen tatsächlich die „irritative Zone“ um den wahren epileptischen Fokus darstellt, was macht diese Zone „irritativ“? Eine Hypothese könnte sein, dass solches "irritatives" Gewebe für epileptogene Bedingungen anfälliger ist. Eine Hauptveränderung während epileptischer Tätigkeit besteht in einem starken Anstieg des extrazellulären Kaliums (Lux et al. 1986; Lux et al. 2000). Es war deshalb zu vermuten, dass chronisch epileptisches, menschliches, neokortikales Gewebe anfälliger sein könnte gegenüber ansteigender extrazellulärer K^+ -Konzentrationen. Dieses ist in der Tat der Fall: Besonders bei Reizungen nahe der Erregungsschwelle gab es eine signifikante Zunahme der Amplitude bei evozierten Potentialen, auch bei höheren Reizintensitäten setzt sich diese Tendenz fort (Abb. 20 bzw. 26). Dieses liegt wahrscheinlich nicht an einem steigenden Einfluss der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten synaptischen Mechanismen, obwohl vermutet wird, dass dafür eine NMDA-Hochregulierung während epileptischer Aktivität in den Tiermodellen (Rogawski 1992) und im menschlichen Hippokampus (Isokawa und Levesque 1991) verantwortlich ist. Obgleich der Gesamteinfluss der NMDA-Rezeptor-vermittelten Übertragung vermutlich wegen der K^+ -induzierten Depolarisierung stieg, wie schon eine stärkere relative Signalreduktion während NMDA-Blockade verglichen mit Kontrollbedingungen zeigte, blieb zwischen schwelennaher Reizung vor und nach dem K^+ -Ionenkonzentrationsanstieg der signifikante Unterschied der Amplituden erhalten. Daraus ist zu schliessen, dass in menschlichem, chronischem, epileptischem Hirnrindengewebe eine höhere Erregbarkeitsveränderung (als Antwort auf den K^+ -Ionenkonzentrationsanstieg) entsteht als im gesunden Gewebe.

4.5 Kurzzeitplastizität

Kurzzeitplastizität in Form von Doppelpulshemmung spiegeln Änderungen der praesynaptischen Transmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit und den Einfluss von Rückkopplungshemmung wieder (Applegate und Landfield 1988; Mori et al. 1994; Zucker

1999). Doppelpulshemmung stellt einen Mechanismus dar, der Gewebeerregbarkeit besonders bei hochfrequenter Aktivierung reguliert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit zunehmenden längeren Doppelreizintervallen die Doppelpulshemmung im chronisch epileptischen Gewebe des Menschen stärker wird. Dies gilt nicht im nicht epileptischen Gewebe. Da diese Änderung bei langen Intervallen hervortrat, spiegelt dies eher eine stärkere rekurrente Hemmung der präsynaptische Änderungen, die innerhalb der ersten Millisekunden nach einer Erregung erwartet werden. Es scheint, dass diese Rückkopplungshemmung teilweise mit NMDA-Rezeptoren bzw. mit ihrer Blockade zusammenhängen. Bei NMDA-Rezeptorblockade ist der Grad der Inhibition verringert und Doppelpulsakzentuierung tritt in einigen Fällen auf (Abb. 37). Dieses würde wieder darauf deuten, dass vor allem Interneurone NMDA-rezeptorvermittelte Eingänge erhalten. In Übereinstimmung mit einer erhöhten erregenden Antwort des chronisch epileptischen Gewebes bei K^+ -Ionenkonzentrationserhöhung im Extrazellulärraum ist die Doppelpulshemmung reduziert und in einigen Gewebeschnitten bei einem K^+ -Ionenkonzentrationsanstieg auf 8 mM, wo Doppelpulshemmung unter normalen Bedingungen verstärkt vorkommt, im Gegensatz zu nicht epileptischen Schnitten ganz verschwunden.

Zusammenfassend ist zu schlussfolgern, dass subtile Veränderungen der Erregbarkeit, wie sie in der Empfindlichkeit der Doppelpulshemmung gegenüber K^+ -Änderungen zum Ausdruck kommen, zur Epileptogenität des chronisch epileptischen, menschlichen, neokortikalen Gewebes beitragen mögen.

Zusammenfassung

Literaturbefunde an epileptischem, menschlichem Hippokampusgewebe und bei chronisch epileptischen Tiermodellen belegen Funktionsänderungen der synaptischen und intrinsischen Erregbarkeit. Es wird vermutet, dass sich intrinsische neuronale und synaptische Erregbarkeit, sowie Kurzzeitplastizität bei einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration, wie er auch bei Anfällen vorkommt, verändern könnte. Um zu prüfen, ob solche Änderungen auch im menschlichen, neokortikalen, chronisch epileptischen Gewebe auftreten, wurden synaptisch evozierte, glutamat-abhängige Potentiale in menschlichen, neokortikalen Schnittpräparaten untersucht, die von Patienten bei epilepsiechirurgischen Eingriffen gewonnen wurden. Die Experimente wurden an Gewebeschnitten aus dem Temporallappen (Dicke: 500 μ m) von 51 Patienten durchgeführt. Als Kontrollmaterial dienten Gewebeschnitte aus dem Kortex nicht epileptischer Ratten ($n=87$). Es wurden das neuronale Entladungsverhalten, synaptische Antworten und Doppelpulsreizantworten als Maß der Kurzzeitplastizität untersucht. Evozierte Feldpotentiale (EP) und intrazelluläre Potentiale (IP) wurden durch Stimulation der weissen Substanz und der pialen Oberfläche hervorgerufen. Die Reizintensität lag hierbei bei einfacher, zweifacher und fünffacher Schwellenintensität. Die Doppelpulsreizung wurde mit Reizintervallen von 30, 50 und 100 ms durchgeführt; die Reizintensität lag hierbei bei fünffacher Reizschwellenintensität. Evozierte Potentiale wurden in den Schichten 2/3 und 5, sowie intrazelluläre Ableitungen bzw. synaptische Potentiale in den Schichten 2/3 vorgenommen. Dies geschah zum einen unter Kontrollbedingungen und zum anderen unter epileptogenen Bedingungen (4 bzw. 8 mM $(K^+)_0$), und wurde durch Zugabe des NMDA-Rezeptorblockers APV (100 μ M) oder von APV und des AMPA/Kainat-Rezeptorblockers CNQX (20 μ M) pharmakologisch charakterisiert.

Evozierte Potentiale im chronisch epileptischen, menschlichen Gewebe unterschieden sich nicht von denen, die im nicht epileptischen Gewebe (Ratte) gefunden wurden. Unter Kontrollbedingungen waren evozierte Potentiale polyphasisch, wurden verkürzt durch NMDA-Rezeptorblockade (mit gleichzeitigem Anstieg der Amplitude) und verschwanden bei gleichzeitiger AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptorblockade. Bei Doppelpulsreizen fand sich im Allgemeinen eine Doppelpulshemmung, die in eine Akzentuierung bei NMDA-Rezeptorblockade überging.

Nach K^+ -Konzentrationserhöhung von 4 mM auf 8 mM unterschied sich das neuronale Entladungsmuster nicht von Mensch und Tier. Veränderungen der synaptischen Empfindlichkeit im epileptischen Gewebe, d.h., eine erhöhte Netzwerktätigkeit bei K^+ -Konzentrationserhöhung und ein Rückgang der Depression bei Doppelpulsreizung waren dafür verantwortlich.

Literaturverzeichnis

Applegate MD, Landfield PW. Synaptic vesicle redistribution during hippocampal frequency potentiation and depression in young and aged rats. *J. Neurosci.* 1988; 8: 1096-1111.

Avoli M, Hwa GGC, Lacaille JC, Olivier A, Villemure JG, Granger G. Electrophysiological and repetitive firing properties of neurons in the superficial/middle layers of the human neocortex maintained in vitro. *Exp. Brain Res.* 1994; 98: 135-144.

Avoli, M, Louvel, J, Pumain, R, Köhling, R. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Progr. Neurobiol.* 2005; 77: 166-200.

Avoli M, Olivier A. Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 1998; 61,3: 589-606.

Avoli M, Williamson A. Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Prog. Neurobiol.* 1996; 48: 519-554.

Ayala GF. The paroxysmal depolarizing shift. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1983; 124: 15-21.

Baskys A. Metabotropic receptors and 'slow' excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 1992 Mar. 15(3): 92-96.

Beck H, Goussakov IV, Lie A, Helmstaedter C, Elger CE. Synaptic Plasticity in the Human Dentate Gyrus. *J. Neurosci.* 2000; 20: 7080-7086.

Biella G, Uva L, de Curtis M. Network activity evoked by neocortical stimulation in area 36 of the guinea pig perirhinal cortex. *J. Neurophysiol.* 2001; 86: 164-172.

Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.* 1989; 62: 1149-1162.

Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 2002; 298: 1418-1421.

Colder BW, Frysinger RC, Wilson CL, Harper RM, Engel J. Decreased neuronal burst discharge near site of seizure onset in epileptic human temporal lobes. *Epilepsia* 1996; 37: 113-121.

Connors BW, Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *TINS* 1990; 13: 99-104.

Deisz RA. GABA_B receptor-mediated effects in human and rat neocortical neurones in vitro. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1755-1766.

Dudek FE, Wuarin J-P, Tasker JG, Kim YI, Peacock WJ. Neurophysiology of neocortical slices resected from children undergoing surgical treatment for epilepsy. *J. Neurosci. Methods* 1995; 59: 49-58.

Dziki M, Hunack D, Löscher W. Kindled rats are more sensitive than non-kindled rats to the behavioural effects of combined treatment with MK-801 and valproate. *Europ. J. Pharmacol.* 1992; 222: 273-278.

Eastwood SL, Burnet PWJ, Beckwith J, Kerwin RW, Harrison PJ. AMPA glutamate receptors and their flip and flop mRNAs in human hippocampus. *NeuroReport* 1994; 5: 1325-1328.

Elger CE, Durwen HF, Helmstaedter C. Neuropsychological and psychosocial aspects of surgical therapy of epilepsy. *Nervenarzt* 1989 Jan. 60(1): 10-16.

Flint AC, Connors BW. Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J. Neurophysiol.* 1996; 75: 951-956.

Foehring RC, Lorenzon NM, Herron P, Wilson CJ. Correlation of physiologically and morphologically identified neuronal types in human association cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 1991; 66: 1825-1837.

Gola M. Action potential changes induced by repetitive stimulation: a voltage clamp study (Helix pomatia neurons). *Pflügers Arch.* 1974 Feb. 4; 346(2): 121-140.

Goldensohn ES, Purpura DP. Intracellular potentials of cortical neurons during focal epileptogenic discharges. *Science* 1963 Mar. 1; 139: 840-842.

Hauser WA, Kurland LT. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia.* 1975 Mar. 16(1): 1-66.

Heinemann U, Arens J, Dreier JP, Stabel J, Zhang CL. In vitro epileptiform activity: role of excitatory amino acids. *Epilepsy Res.* 1991; 10: 18-23.

Henneberry RC. Cloning of the genes for excitatory amino acid receptors. *Bioessays.* 1992 Jul. 14(7): 465-471

Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 1991 May 31; 252(5010): 1318-1321.

Hwa GGC, Avoli M. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA and non- NMDA receptors in the superficial/middle layers of the epileptogenic human neocortex maintained in vitro. *Neurosci. Lett.* 1992; 143: 83-86.

Hwa GGC, Avoli M, Olivier A, Villemure JG. Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp. Brain Res.* 1991; 83: 329- 339

Isokawa M, Avanzini G, Finch DM, Babb TL, Levesque MF. Physiologic properties of human dentate granule cells in slices prepared from epileptic patients. *Epilepsy Res.* 1991; 9: 242-250.

Isokawa M. Altered pattern of light transmittance and resistance to AMPA-induced swelling in the dentate gyrus of the epileptic hippocampus. *Hippocampus* 2000; 10: 663-672.

Isokawa M, Fried I. Extracellular slow negative transient in the dentate gyrus of human epileptic hippocampus in vitro. *Neurosci.* 1996; 72: 31-37.

Isokawa M, Levesque M, Fried I, Engel J. Glutamate currents in morphologically identified human dentate granule cells in temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.* 1997; 77: 3355-3369.

Isokawa M, Levesque MF. Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neurosci. Lett.* 1991; 132: 212-216.

Isokawa M, Mathern GW. Developmental changes in NMDA-induced intrinsic optical signals in the hippocampal dentate gyrus of children with medically intractable seizures. *Dev. Neurosci.* 1999; 21: 215-222.

Jiang C, Haddad GG. Differential responses of neocortical neurons to glucose and/or O₂ deprivation in the human and rat. *J. Neurophysiol.* 1992; 68: 2165-2173.

Jonas P. Glutamate receptors in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993 Dec. 20; 707: 126-135.

Kamphuis W, De Rijk TC, Talamini LM, Lopes da Silva FH. Rat hippocampal kindling induces changes in the glutamate receptor mRNA expression patterns in dentate granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1994 Jul. 1; 6(7): 1119-1127.

King D, Spencer S. Invasive electroencephalography in mesial temporal-lobe epilepsy. *J. Clinical Neurophysiol.* 1995; 12: 32-45.

Kivi A, Lehmann TN, Kovács R, Eilers A, Jauch R, Meenke HJ, Deimling A, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12: 2039-204

Klaassen A, Glykys J, Maguire J, Labarca C, Mody I, Boulter J. Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006 Dec. 12; 103(50): 19152-19157.

Knowles WD, Awad IA, Nayel MH. Differences of in vitro electrophysiology of hippocampal neurons from epileptic patients with mesiotemporal sclerosis versus structural lesions. *Epilepsia* 1992; 33: 601-609.

Koch UR, Musshoff U, Pannek H, Ebner A, Wolf P, Speckmann E-J, Köhling R. Intrinsic excitability, synaptic potentials, and short-term plasticity in human epileptic neocortex. *J. Neurosci.* 2005 Jun. 1; 80(5): 715-726.

Köhling R. GABA becomes exciting. *Science* 2002; 298: 1350-135

Köhling R, Koch UR, Hagemann G, Redecker C, Straub H, Speckmann E-J. Differential sensitivity to induction of spreading depression by partial disinhibition in chronically epileptic human and rat as compared to native rat neocortical tissue. *Brain Res.* 2003 Jun. 13; 975(1-2): 129-134.

Köhling R, Lücke A, Straub H, Speckmann E-J. A portable chamber for long-distance transport of surviving human brain slice preparations. *J. Neurosci. Meth.* 1996; 67: 233-236.

Köhling R, Lücke A, Straub H, Speckmann E-J, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek HW, Oppel F. Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain* 1998; 121: 1073-1087.

Köhling R, Lücke A, Straub H, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek HW, Oppel F, Qü M, Zilles K, Speckmann E-J. Currents source density profiles of epileptiform field potentials and laminar distribution of transmitter receptors in human epileptic temporal lobe tissue. *Europ. J. Physiol.* 1998; 435 (Suppl. 6): R 134.

Köhling R, Qu M, Zilles K, Speckmann E-J. Current-source-density profiles associated with sharp waves in human epileptic neocortical tissue. *Neurosci.* 1999; 94: 1039-1050.

Köhling R, Höhling H-J, Straub H, Kuhlmann D, Kuhnt U, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Pannek HW, Gorji A, Speckmann E-J. Optical Monitoring of Neuronal Activity During Spontaneous Sharp Waves in Chronically Epileptic Human Neocortical Tissue. *J. Neurophysiol.* 2000; 84: 2161-2165.

Kohn A, Metz C, Quibrera M, Tommerdahl MA, Whitsel BL. Functional neocortical microcircuitry demonstrated with intrinsic signal optical imaging in vitro. *Neurosci.* 2000; 95: 51-62.

Kuhr G, De Koninck Y, Mody I. Properties of NMDA channels in neurons acutely isolated from epileptic (kindled) rats. *J. Neurosci.* 1993; 13: 3612-3627.

Lason W, Turchan J, Przewlocka B, Labuz D, Mika J, Przewlocki R. Seizure-related changes in the glutamate R2 and R5 receptor genes expression in the rat hippocampal formation. *J. Neural. Transm.* 1997; 104(2-3): 125-133.

Lee WL, Hablitz JJ. Excitatory synaptic involvement in epileptiform bursting in the immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 1991 Dec. 66(6): 1894-1901.

Löscher W. Mechanisms of drug resistance in status epilepticus. *Epilepsia.* 2007; 48 Suppl. 8: 74-77.

Löscher W, Hönack D. Responses to NMDA receptor antagonists altered by epileptogenesis. *TiPS* 1991; 12: 51.

Louvel J, Pumain R, Roux FX, Chodkiewicz JP. Recent advances in understanding epileptogenesis in animal models and in humans. In: P. Chauvel, A.V. Delgado-Escueta (Eds.), *Advances in Neurology*. Vol. 57, Raven Press, New York 1992: 517-523.

Lücke A, Köhling R, Straub H, Moskopp D, Wassmann H, Speckmann E-J: Changes of extracellular calcium concentration induced by application of excitatory amino acids in the human neocortex in vitro. *Brain Res.* 1995; 671: 222-226.

Luhmann HJ, Karpuk N, Qü M, Zilles K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J. Neurophysiol.* 1998; 10: 92-102.

Lux HD, Heinemann U. Ionic changes during experimentally induced seizure activity. *Contemporary Clinical Neurophysiology* 2000; EEG Suppl. 34: 289-297.

Lux HD, Heinemann U, Dietzel I. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Advances in Neurology* 1986; 44: 619-639.

Maggio R, Liminga U, Gale K. Selective stimulation of kainate but not quisqualate or NMDA receptors in substantia nigra evokes limbic motor seizures. *Brain Res.* 1990 Oct. 1; 528(2): 223-230.

Mann EO, Mody I. The multifaceted role of inhibition in epilepsy: seizure-genesis through excessive GABAergic inhibition in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 2008 Apr. 21(2): 155-160.

Marco P, DeFelipe J. Altered synaptic circuitry in the human temporal neocortex removed from epileptic patients. *Exp. Brain Res.* 1997; 114: 1-10.

Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 1991 Feb. 28; 349(6312): 760-765.

Matsumoto H, Marsan CA. Cellular mechanisms in experimental epileptic seizures. *Science* 1964 Apr. 10; 144: 193-194.

McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, Mc Keever PE, Troncoso JC, Johnston MV. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 1991; 29: 529-541.

McNamara JO. The neurobiological basis of epilepsy. *Trends Neurosci.* 1992 Oct; 15(10): 357-9.

Meldrum BS. Excitatory amino acids in epilepsy and potential novel therapies. *Epilepsy Res.* 1992 Jul; 12(2): 189-96.

Mikkonen M, Soininen H, Kälviäinen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M, Paljärvi L, Pitkänen A. Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: Increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 923-934.

Moran NF, Lemieux L, Kitchen ND, Fish DR, Shorvon SD. Extrahippocampal temporal lobe atrophy in temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis. *Brain* 2001; 124: 167-175.

Mori A, Takahashi T, Miyashita Y, Kasai H. Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired-pulse depression. *J. Physiol.* 1994; 476: 217-218.

Mountcastle VB. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 1997; 120: 701-722.

Musshoff, U. RNA editing of the glutamate receptor subunit GluR2 in cortical and hippocampal tissues of epileptic patients. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10 (Suppl.10): 132

Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J. Neurosci.* 2005 Aug. 24; 25(34): 7724-7733

Niedermeyer E. Awakening epilepsy ('Aufwach-Epilepsie') revisited. *Epilepsy Res. Suppl.* 1991; 2: 37-42.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 1984 Feb. 2-8; 307(5950): 462-465.

Prince DA, Wong RKS. Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Res.* 1981; 210: 323-333.

Puckett C, Gomez CM, Korenberg JR, Tung H, Meier TJ, Chen XN, Hood L. Molecular cloning and chromosomal localization of one of the human glutamate receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991 Sep. 1; 88(17): 7557-7561.

Randle JC, Vernier P, Garrigues AM, Brault E. Properties of the kainate channel in rat brain mRNA injected *Xenopus* oocytes: ionic selectivity and blockage. *Mol. Cell. Biochem.* 1988 Mar.-Apr. 80(1-2): 121-132.

Rogawski MA. The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy: A status report. *Drugs* 1992; 44: 279-292.

Sacaan AI, Bymaster FP, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptor activation produces extrapyramidal motor system activation that is mediated by striatal dopamine. *J. Neurochem.* 1992 Jul. 59(1): 245-251.

Sander JW, Shorvon SD. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1987 Jul. 50(7): 829-839.

Schoepp DD, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993 Jan. 14(1): 13-20.

Schwartzkroin PA, Prince DA. Microphysiology of human cerebral cortex studied in vitro. *Brain Research* 1976; 115: 497-500.

Schwartzkroin PA, Turner DA, Knowles WD, Wyler AR. Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the in vitro slice preparation. *Ann. Neurol.* 1983; 13(3), 249-257.

Segal MM. Epileptiform activity in microcultures containing one excitatory hippocampal neuron. *J. Neurophysiol.* 1991 Apr. 65(4): 761-770.

Simpson LH, Wheal HV, Williamson R. The contribution of non-NMDA and NMDA receptors to graded bursting activity in the CA1 region of the hippocampus in a chronic model of epilepsy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991 Jul. 69(7): 1091-1098.

Sommer B, Seeburg PH. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol. Sci.* 1992 Jul. 13(7): 291-296.

Speckmann E-J, Caspers H. Paroxysmal depolarization and changes in action potentials induced by pentylenetetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia* 1973 Dec. 14(4): 397-408.

Speckmann E-J, Elger CE. The neurophysiological basis of epileptic activity: a condensed overview. *Epilepsy Res. Suppl.* 1991; 2: 1-7.

Speckmann, E-J, H Schulze, Walden J. *Epilepsy and calcium*. Urban Schwarzenberg, Baltimore, 1986.

Straub H, Kuhnt U, Höhling J-M, Köhling R, Gorji A, Kuhlmann D, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Pannek HW, Lahl R, Speckmann E-J. Stimulus-induced patterns of bioelectric activity in human neocortical tissue recorded by a voltage sensitive dye. *Neurosci.* 2003; 121: 587-604.

Su HL, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 2001; 21: 4173-4182.

Swanson TH, Sperling MR, O'Connor MJ. Strong paired pulse depression of dentate granule cells in slices from patients with temporal lobe epilepsy. *J. Neural. Transm.* 1998; 105: 613-625.

Tasker JG, Hoffman N.W, Kim YI, Fisher RS, Peacock WJ, Dudek FE. Electrical properties of neocortical neurons in slices from children with intractable epilepsy. *J. Neurophysiol.* 1996; 75: 931-939.

Tasker JG, Peacock WJ, Dudek FE. Local synaptic circuits and epileptiform activity in slices of neocortex from children with intractable epilepsy. *J. Neurophysiol.* 1992; 67,3: 496-507.

Telfeian AE, Spencer DD, Williamson A. Lack of correlation between neuronal hyper-excitability and electrocorticographic responsiveness in epileptogenic human neocortex. *J. Neurosurg.* 1999; 90: 939-945.

Urban L, Aitken PG, Friedman A, Somjen GG. An NMDA-mediated component of excitatory synaptic input to dentate granule cells in epileptic human hippocampus studied in vitro. *Brain Res.* 1990: 319-322.

Vezzani A, Speziale C, Della Vedova F, Tamburin M, Benatti L. Alternative splicing at the C-terminal but not at the N-terminal domain of the NMDA receptor NR1 is altered in the kindled hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 1995 Dez. 1; 7(12): 2513-2517.

Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neurosci.* 2008 Mar. 8.

Williamson A, Telfeian AE, Spencer DD. Prolonged gaba responses in dentate granule cells in slices isolated from patients with temporal lobe sclerosis. *J. Neurophysiol.* 1995; 74: 378-387.

Wilson C L, Khan SU, Engel J, Isokawa JR, Babb TL, Behnke, EJ. Paired pulse suppression and facilitation in human epileptogenic hippocampal formation. *Epilepsy Res.* 1998; 31: 211-230.

Yeh G-C, Bonhaus DW, Nadler JV, McNamara JO. N-methyl-D-aspartate receptor plasticity in kindling: quantitative and qualitative alterations in the N- methyl-D-aspartate receptor-channel complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86: 8157-8160.

Zielinski JJ. Epilepsy and mortality rate and cause of death. *Epilepsia*. 1974 Jun. 15(2): 191-201.

Zucker RS. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol*. 1999: 305-313.

Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Professor Dr. R. Köhling vom Institut für Physiologie der Universität Rostock, der mir ermöglichte, an diesem interessanten Thema zu arbeiten, und der immer bereit war, inhaltliche Fragen zu diskutieren.

Herrn Professor Dr. E.-J. Speckmann vom Institut für Physiologie der Universität Münster möchte ich für seine stete Bereitschaft zur Diskussion danken.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Universität Münster für ihre ausgezeichnete technische Assistenz, sowie den Mitarbeitern der Feinmechanik und Elektronik.