

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Aus dem Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Köhling

Video-EEG-Analysen von Gliom-tragenden Ratten unter Behandlung mit Perampanel

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von Franziska Zessin

aus Dresden

Rostock, Dezember 2022

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Timo Kirschstein

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Wittstock

3. Gutachter: PD Dr. Felix von Podewils

Datum der Verteidigung: 08.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Motivation.....	6
1.2 Gliome.....	6
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	7
1.2.2 Klassifikation.....	7
1.2.3 Symptomatik.....	8
1.2.4 Diagnostik.....	8
1.2.5 Therapie.....	9
1.3 Gliom-assoziierte Epilepsie.....	10
1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	10
1.3.2 Pathophysiologie.....	11
1.3.3 Charakteristika und Symptomatik.....	13
1.3.4 Klassifikation.....	13
1.3.5 Diagnostik.....	14
1.3.6 Therapie und Rolle der Glutamat-Rezeptor-Antagonisten.....	15
1.4 Gliom-Modell.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 F98-Ratten-Gliom-Modell.....	19
2.2 Stereotaktische Elektroden- und Gliomzellimplantation.....	20
2.3 Therapie mit dem AMPA-Rezeptorblocker Perampanel.....	24
2.4 Telemetrische EEG-Überwachung.....	24
2.5 Datenanalyse mittels Software.....	25

2.5.1	Auswertung der Video-EEG-Daten.....	25
2.5.2	Markierung interiktaler Spikes im EEG.....	26
2.6	Analyse von Patienten-EEGs.....	27
2.7	Statistik.....	29
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Tier 1.....	31
3.1.1	Baseline-Phase.....	33
3.1.2	Beginn der Behandlung.....	34
3.1.3	präfinaler Zeitraum.....	35
3.2	Tier 2.....	36
3.2.1	Baseline-Phase.....	37
3.2.2	Beginn der Behandlung.....	39
3.2.3	präfinaler Zeitraum.....	40
3.3	Tier 3.....	41
3.3.1	Baseline-Phase.....	42
3.3.2	Beginn der Behandlung.....	43
3.3.3	präfinaler Zeitraum.....	44
3.4	Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.....	45
3.4.1	Veränderung der Spikerate von der Baseline-Phase zum präfinalen Zeitraum.....	45
3.4.2	Lebensdauer.....	49
3.5	Klinische EEGs.....	50
4.	Diskussion.....	53
4.1	Methodenkritik.....	53
4.1.1	Gliom-Modell.....	53
4.1.2	Versuchstiere.....	54
4.1.3	Auswertung der EEG-Daten.....	55
4.2	Auftreten interiktaler Spikes in der Baseline-Phase bei allen Tieren.....	56

4.3 Einfluss der Behandlung mit Perampanel auf die Lebensdauer.....	58
4.4 Einfluss der Behandlung mit Perampanel auf die Lebensqualität.....	59
4.5 Ausblick.....	64
5. Zusammenfassung.....	66
6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	68
7. Thesen.....	70
8. Literaturverzeichnis.....	71
9. Danksagung.....	77
10. Lebenslauf.....	78
11. Eidesstattliche Versicherung.....	79

Abkürzungen

2-HG	2-Hydroxyglutarat
α -KG	Alpha-Ketoglutarat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-propionsäure
BCAT1	Branched-Chain Aminosäuretransferase 1
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSI	Data Science International, Inc.
EAAT2	exzitatorischer Aminosäure-Transporter 2
EEG	Elektroenzephalographie
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GS	Glutamin-Synthetase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IED	interictal epileptiform discharge
ILAE	International League Against Epilepsy
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter
KG	Körpergewicht
MRT	Magnetresonanztomographie
NCIC	National Cancer Institute of Canada
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

PBS	phosphate-buffered saline
PER	Perampanel
PIE	post injury epilepsy
RCT	Radiochemotherapie
TMZ	Temozolomid
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization
Xc-	Glutamat-Zystin-Austauscher
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Motivation

Primäre Hirntumoren gehören zu den zehn häufigsten krebbedingten Todesursachen (Schneider et al. 2010). Der häufigste Primärtumor des ZNS bei Erwachsenen, das Glioblastom, gehört dabei zu den verheerendsten Krankheitsbildern. In der Regel beträgt die Überlebensdauer nach der Diagnosestellung im Median weniger als ein Jahr, selbst unter den günstigsten Umständen stirbt ein Großteil der Patienten innerhalb von zwei Jahren (Stupp et al. 2005). Dabei gehen Tumoren des ZNS, je nach Tumorart unterschiedlich häufig, mit damit assoziierter Epilepsie einher, welche entweder als erstes klinisches Zeichen oder mit Fortschreiten der Krankheit auftritt (van Breemen et al. 2009) und die Lebensqualität der betroffenen Patienten zusätzlich einschränkt.

1.2 Gliome

Bei Gliomen handelt es sich um neuroepitheliale Tumoren (Birnbauer 2018), die im Erwachsenenalter die häufigsten Primärtumoren des ZNS darstellen (Alfonso et al. 2017). Insgesamt machen sie 30 bis 40 Prozent aller Hirntumoren aus und werden eingeteilt in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome und gemischte oligo-dendrogliale und astrozytäre Tumoren, wobei der vorherrschende Zelltyp maßgeblich ist (Schneider et al. 2010). In der aktuellen WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren werden neben histologischen auch molekulare Merkmale berücksichtigt (Louis et al. 2016), auf welche im Folgenden noch eingegangen wird.

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Gliome treten bei Kindern und Jugendlichen mit einer Inzidenz von 5:100.000 auf, machen also die häufigsten Tumoren in dieser Altersgruppe aus. Bei Erwachsenen beträgt die Inzidenz 28:100.000 (Mattle & Fischer 2021). Es handelt sich um typische Tumoren des mittleren Alters mit einem Inzidenzgipfel zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr (Schneider et al. 2010). Die Ursachen für die Entstehung von Hirntumoren sind weitgehend unbekannt, laut Birnbaum (2018) ist ein gesicherter Risikofaktor die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung. Außerdem beschreibt er in seinen Ausführungen einen Zusammenhang zwischen seltenen genetischen Erkrankungen wie dem Turcot- oder dem Li-Fraumeni-Syndrom und der Entstehung von Tumoren des Nervensystems.

1.2.2 Klassifikation

Die bisherige Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems der WHO aus dem Jahr 2007 teilte diese in sieben Gruppen ein, wobei ausschließlich histologische Kriterien berücksichtigt wurden (Louis et al. 2007). Diese Einteilung wurde 2016 weiterentwickelt, indem zusätzlich molekulare Parameter bei der Diagnostik von Hirntumoren Anwendung fanden (Louis et al. 2016), sodass heute 17 Hauptgruppen unterschieden werden. Das Glioblastom gehört zur ersten Gruppe, den diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren (Birnbaum 2018) und wird noch einmal eingeteilt in Glioblastom mit IDH-Wildtyp, mit IDH-Mutation oder nicht näher bezeichnet für Glioblastome, bei denen die IDH-Analyse nicht möglich ist (Louis et al. 2016).

Neben diesen Aspekten teilt die WHO Hirntumoren entsprechend ihres Wachstumsmusters in vier Grade ein (Birnbaum 2018, Louis et al. 2016). Zu Grad I zählen benigne Tumoren, die sich durch eine hohe Differenzierung und eine geringe Proliferation bzw. Zelldichte auszeichnen, z. B. das pilozytische Astrozytom. Nur Tumoren diesen Grades haben eine günstige Prognose und sind in der Regel kurativ behandelbar. Tumoren des Grades II werden noch als benigne bezeichnet und sind ebenfalls durch eine hohe Differenzierung gekennzeichnet, allerdings besitzen sie eine mäßige Proliferation und neigen zu diffuser Infiltration des umliegenden Gewebes und im Verlauf zu Malignisierung. Ein Beispiel hierfür ist das diffuse Astrozytom. Grad III-Tumoren sind maligne Tumoren mit geringer Differenzierung

und hoher Proliferationsrate. Die Tumorzellen sind durch Kernpolymorphien und Mitosen gekennzeichnet, ein Beispiel ist das anaplastische Astrozytom. Ebenfalls maligne Tumoren des Grades IV weisen eine sehr geringe Differenzierung, eine ausgeprägte Proliferation und viele Kernpolymorphien und Mitosen auf. Zusätzliche Kennzeichen sind Gefäßproliferate und Nekrosen. Ein typischer Grad IV-Tumor ist das Glioblastom, der häufigste maligne hirneigene Tumor (Birnbauer 2018).

1.2.3 Symptomatik

Laut Birnbauer (2018) zählen zu den typischen Symptomen von Hirntumoren epileptische Anfälle, häufig als erste Manifestation. Des Weiteren können sich kognitive Defizite und Veränderungen des Wesens zeigen. Schließlich können auch Symptome auftreten, die mit einer Steigerung des Hirndrucks zusammenhängen, beispielsweise Kopfschmerzen, Bewusstseinsminderung, morgendliche Übelkeit und Erbrechen.

Je nach Art und Wachstum des Tumors kann die Symptomatik in Form einer sog. „Crescendo-Verlaufsdynamik“ auftreten. Dabei zeigen sich bei malignen Tumoren relativ frühzeitig nach Erkrankungsbeginn klinische Symptome, welche stetig und rasch fortschreiten, während bei benignen Tumoren die Symptome über einen langen Zeitraum schleichend zunehmen und sich erst nach vielen Jahren klinisch manifestieren (Mattle & Fischer 2021).

1.2.4 Diagnostik

Entscheidend bei der Diagnostik von Hirntumoren sind bildgebende Verfahren (Mattle & Fischer 2021). Dabei ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel der Computertomographie (CT) überlegen, u.a. wegen der höheren Empfindlichkeit, des stärkeren Weichteilkontrastes und der besseren Möglichkeit der Darstellung des Tumorausmaßes (Schneider et al. 2010). Dennoch kann eine zusätzliche CT ergänzende Informationen, z. B. zur Lagebeziehung zwischen Tumor und Knochen, geben. Zur eindeutigen Klassifizierung werden die Entnahme einer Gewebeprobe und die Untersuchung von Tumormarkern, v. a. bei malignen Läsionen, genutzt (Mattle & Fischer 2021).

1.2.5 Therapie

Die Behandlung von Hirntumoren kann in zwei Aspekte eingeteilt werden: die tumorspezifische und die symptomatische Therapie. Die Art der tumorspezifischen Therapie richtet sich nach verschiedenen Faktoren wie dessen Größe, Lokalisation und Dignität (Mattle & Fischer 2021). Laut den Autoren ist bei Tumoren des Grades I bei erfolgreicher Resektion durch radikale Operation eine Heilung möglich. Erlaubt die Lage des Tumors, z. B. entlang der Sehbahn, keine Radikal-OP, können Bestrahlung und/oder Chemotherapie angewendet werden (Birnbaum 2018). Auch bei Grad II-Tumoren wird die vollständige Resektion angestrebt, wobei bei Risikopatienten eine adjuvante Radiochemotherapie (RCT) zum Einsatz kommt. Tumoren des Grades III und IV sollen ebenfalls möglichst vollständig reseziert werden, hier ist die anschließende RCT aufgrund des hohen Rezidivrisikos obligat (Birnbaum 2018). Dem Autor nach gilt für den Zeitpunkt der Therapie folgende Grundregel: die Behandlung von benignen Tumoren erfolgt, wenn diese wachsen oder Symptome, mit Ausnahme der medikamentös gut beherrschbaren Epilepsie, verursachen. Bei malignen Tumoren sollte die Behandlung umgehend begonnen werden.

Zur symptomatischen Therapie gehören die Behandlung der tumorassoziierten Epilepsie mit Antikonvulsiva, Glukokortikoide wie Dexamethason zur Hirndrucksenkung, da insbesondere maligne Tumoren ein ausgeprägtes Umgebungsödem verursachen können, und die analgetische Behandlung von Kopfschmerzen nach dem WHO-Stufenschema (Birnbaum 2018).

Speziell zur Therapie von Glioblastomen verglichen Stupp et al. 2005 im Rahmen einer Studie in Zusammenarbeit mit der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und dem National Cancer Institute of Canada (NCIC) die Wirkung der Behandlung ausschließlich mit Strahlentherapie einerseits und die Kombination dieser mit adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) andererseits. Bei der Strahlentherapie wurde der Tumor einmal täglich an je fünf Tagen in der Woche mit einer fraktionierten Dosis von 2 Gy bestrahlt. Die Behandlung wurde für eine Gesamtdosis von 60 Gy über sechs Wochen durchgeführt. Die begleitende Chemotherapie mit TMZ erfolgte mit Dosen von 75 mg pro Quadratmeter Körperoberfläche und Tag über die Dauer der Strahlentherapie. Nach einer Pause von vier Wochen erhielten die Patienten bis zu sechs Zyklen adjuvantes TMZ alle 28 Tage, wobei die Dosis in Abhängigkeit von auftretenden Nebenwirkungen von 150 mg pro Quadratmeter im ersten Zyklus auf 200 mg pro Quadratmeter erhöht wurde. Im Ergebnis

zeigte sich, dass die zusätzliche Chemotherapie mit TMZ ergänzend zur Bestrahlung einen statistisch signifikanten und klinisch bedeutsamen Überlebensvorteil bietet, wobei eine minimale zusätzliche Toxizität besteht.

Auf die Studie Bezug nehmend etablierte sich die postoperative Strahlentherapie in Kombination mit der begleitenden und anschließenden adjuvanten Temozolomid-Chemotherapie als Behandlungsstandard (Schneider et al. 2010).

1.3 Gliom-assoziierte Epilepsie

1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie

Mattle & Fischer (2021) konstatierten, dass ein Prozent der Menschen an Epilepsie leidet und dass bei Vorliegen einer genetischen Epilepsie bei einem Elternteil das Risiko für die Nachkommen 1:25 beträgt. Laut den Autoren werden verschiedene Ursachen bzw. Ätiologien unterschieden. Eine Ursache kann in morphologischen Anomalien der Hirnstruktur, beispielsweise Narben oder Tumoren, liegen. In diesem Fall spricht man von struktureller Epilepsie, auf welche im Folgenden noch näher eingegangen wird. Eine weitere Form ist die metabolische Epilepsie, bei welcher die Anfälle von stoffwechselbedingten (z.B. Hypoglykämie) oder toxischen (z.B. Alkohol) Einflüssen ausgehen. Bei der genetischen Epilepsie sind Genmutationen für die erhöhte Anfallsbereitschaft verantwortlich. Die infektiöse Epilepsie ist die Folge einer Infektion, die ebenfalls mit einer Veränderung der Hirnstruktur (z.B. Zystizerkose) einhergehen kann. Zuletzt gibt es auch immunvermittelte Ursachen für Epilepsie, z.B. die limbische Enzephalitis. Bei allen Formen und Ursachen ist zu beachten, dass nicht jede Ätiologie bei jedem Individuum das gleiche epileptogene Potenzial hat (Mattle & Fischer 2021).

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE, engl.: International League Against Epilepsy) hat eine klinische Definition für das Vorliegen einer Epilepsie formuliert, wonach eine der drei folgenden Bedingungen erfüllt sein muss:

1. Auftreten von mindestens zwei unprovokierten (oder reflektorischen) Anfällen im Abstand von mehr als 24 Stunden,

2. Auftreten eines unprovokierten (oder reflektorischen) Anfalls und eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 60%, dass weitere Anfälle nach zwei unprovokierten Anfällen in den nächsten zehn Jahren auftreten, oder
3. ein diagnostiziertes Epilepsiesyndrom (Fisher et al. 2014).

Die oben erwähnte strukturelle Epilepsie tritt bei Patienten mit einem Hirntumor mit einer Häufigkeit von mindestens 30 % (je nach Tumorart) auf, wobei bei fast einem Drittel der Fälle das erste klinische Anzeichen für das Bestehen eines Tumors ein epileptischer Anfall ist und es bei weiteren 30 bis 50 % im Verlauf zur Entwicklung von Anfällen kommt (van Breemen et al. 2007, Dunn-Pirio et al. 2018). Speziell für das Glioblastom liegt die Inzidenz bei 30 bis 62 Prozent (Armstrong et al. 2016, Kerkhof & Vecht 2013).

1.3.2 Pathophysiologie

Grundlage eines epileptischen Anfalls ist eine abnorme Aktivität zerebraler Neuronen, welche entweder durch ein Überwiegen exzitatorischer Transmitter (z. B. Glutamat) oder die verminderte Funktion inhibitorischer Transmitter (z. B. γ -Aminobuttersäure, GABA) entsteht (Mattle & Fischer 2021).

Die Mechanismen hinter der Tumor-assoziierten Epilepsie sind noch nicht vollständig geklärt (Kirschstein & Köhling 2016). Armstrong et al. (2016) konstatierten, dass die Glutamatfreisetzung aus Gliomzellen deutlich gesteigert ist. Der erhöhte Glutamatspiegel fördert die epileptische Aktivität (Buckingham et al. 2011, Dunn-Pirio et al. 2018) sowie die Proliferation und Migration von Tumorzellen (Ishiyuchi et al. 2007). Im Jahr 2021 veröffentlichten Lange et al. eine neue Arbeit und gingen detaillierter auf die Rolle des Glutamats bei der Entstehung der Anfälle und auch der Tumorprogression ein. Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass ein veränderter Glutamat-Signalweg im Tumor und dem umliegenden Gewebe zu einem bis zu 100fach erhöhten extrazellulären Glutamatspiegel führt (Lange et al. 2021). Neben einer gesteigerten Proliferation und Invasion der Gliomzellen resultiert dies laut den Autoren in epileptischen Entladungen und Exzitotoxizität. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Izumoto et al. 2018.

Auf Abbildung 1 ist der Mechanismus der Glutamatfreisetzung dargestellt, welcher von Fröscher et al. (2014) beschrieben wurde.

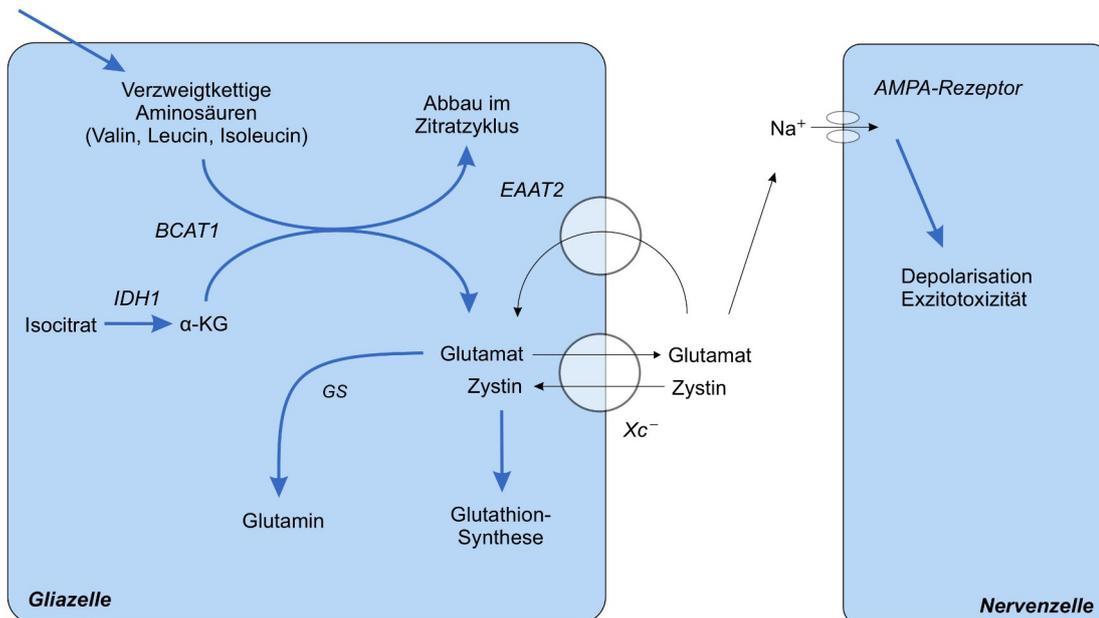


Abb. 1: Glutamatfreisetzung aus Gliazellen (in Anlehnung an Fröscher et al. 2014)

Im Inneren der Gliazelle wird Isocitrat mittels der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) zu α -Ketoglutarat (α -KG) umgewandelt. Nach der Aufnahme verzweigtkettiger Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin) in die Zelle werden diese zusammen mit dem α -KG durch das Enzym Branched-Chain-Aminosäuretransferase 1 (BCAT1) zu Glutamat verstoffwechselt. Dieses wird durch den Glutamat-Zystin-Austauscher (Xc^-) in den Extrazellulärraum freigesetzt. Eine Wiederaufnahme des Glutamats in die Zelle kann über den exzitatorischen Aminosäure-Transporter 2 (EAAT2) erfolgen, sodass es mit Hilfe der Glutamin-Synthetase (GS) in Glutamin umgewandelt werden kann. Die Glutamin-Synthetase zeigt bei Patienten mit Gliom-assoziiierter Epilepsie eine reduzierte Aktivität (Fröscher et al. 2014, Rosati et al. 2013). Des Weiteren liegt bei Gliom-Patienten eine Hochregulierung von BCAT1 und Xc^- vor, wodurch es zu einer gesteigerten Glutamat-Freisetzung kommt, zudem ist die EAAT2-Expression herunterreguliert, wodurch entsprechend weniger Glutamat zurück in die Zelle geschleust wird (Fröscher et al. 2014, Robert & Sontheimer 2014, Armstrong et al. 2016). Die verhältnismäßig hohe Anfallsinzidenz bei niedriggradigen Gliomen lässt sich mit einer Genmutation der IDH1

erklären: das mutierte Enzym wandelt Isocitrat nicht zu α -KG um, sondern zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG), welches durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Glutamat und die damit einhergehende Fähigkeit zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ein epileptogenes Potenzial besitzt (Stockhammer et al. 2012, Fröscher et al. 2014).

Die verminderte inhibitorische Wirkung von GABA ist auf eine gestörte Chlorid-Homöostase zurückzuführen: eine veränderte Expression der Chlorid-Transporter NKCC1 und KCC2 im epileptischen peritumoralen Cortex resultiert in einer hohen Chlorid-Konzentration in der Zelle, weshalb GABA depolarisierend wirkt (Conti et al. 2011, Fröscher et al. 2014).

1.3.3 Charakteristika und Symptomatik

Laut Mattle & Fischer (2021) zeichnen sich epileptische Anfälle durch unterschiedliche Charakteristika aus. Einerseits zeigt sich ein anfallsweises Auftreten (d. h. unvorhersagbar und transient), andererseits eine Wiederholung in unterschiedlichen Häufigkeiten und eine Stereotypie, also der ähnliche Verlauf je Individuum. Die Anfälle äußern sich durch motorische, sensible, sensorische oder viszerale Symptome und können mit Einschränkungen des Bewusstseins einhergehen.

1.3.4 Klassifikation

Auf Basis der Klassifikation der Anfallsarten der ILAE, die 1981 entwickelt und 2010 erweitert wurde, hat die Liga 2017 eine überarbeitete Einteilung, beruhend auf operativen Gesichtspunkten, vorgestellt (Fisher et al. 2017). Dabei wird zunächst die Erstmanifestation des Anfalls betrachtet, es erfolgt die Unterteilung in fokalen, generalisierten oder unbekanntem Beginn (Fisher et al. 2017, Mattle & Fischer 2021). Die Autoren konstatierten weiter, dass bei Anfällen mit fokalem Beginn einerseits unterschieden wird, ob das Bewusstsein des Patienten beeinträchtigt war oder nicht und andererseits eine Einteilung nach der motorischen Reaktion erfolgt, also ob der Anfall motorisch (z. B. klonisch, d. h. mit rhythmischen Muskelkontraktionen) oder nicht-motorisch (z. B. sensorisch) beginnt. Außerdem können sich fokale Anfälle zu bilateral tonisch-klonischen weiterentwickeln. Anfälle mit generalisiertem Beginn werden unterteilt in motorische und nicht-motorische. Die motorischen Anfälle werden

weiter unterteilt, beispielsweise in tonisch-klonische oder atonische Anfälle. Die nicht-motorischen Anfälle mit generalisiertem Beginn werden Absencen genannt und ebenfalls näher bezeichnet, z. B. als atypisch oder myoklonisch. Sie manifestieren sich meist im Kindes-/Jugendalter und imponieren oft nur als kurze Zerstretheit (Mattle & Fischer 2021). Bei Anfällen mit unbekannter Erstmanifestation werden ebenfalls motorische und nicht-motorische unterschieden. Weiterhin kann ein Anfall als nicht klassifizierbar eingestuft werden, wenn nur unzureichende Informationen vorliegen oder er sich keiner der genannten Kategorien zuordnen lässt (Fisher et al. 2017).

Die ILAE veröffentlichte 2017 auch eine erweiterte Version ihrer Klassifikation der Anfallsarten, in welcher auf die unterschiedlichen Typen des Beginns der Symptome näher eingegangen wird und diese mit konkreten Beispielen untermauert werden.

1.3.5 Diagnostik

Entscheidend für die Diagnose einer Epilepsie sind neben der Erhebung einer exakten Anamnese und einer umfassenden klinischen Untersuchung die Ableitung eines Elektroenzephalogramms (EEG), welches bei unauffälligem Befund durch Provokationsfaktoren wie Schlafentzug oder Aufzeichnung über einen verlängerten Zeitraum erweitert werden kann (Mattle & Fischer 2021). Feyissa & Tatum (2019) zufolge zeigen sich bei Epilepsie-Patienten im EEG-Grundrhythmus für gewöhnlich keine Auffälligkeiten. Es kann zu einer generalisierten oder fokalen Verlangsamung des Rhythmus kommen, welche allerdings nicht spezifisch für das Vorliegen einer Epilepsie ist (Pillai & Sperling 2006). Zu den abnormen Potenzialen gehören nicht epileptiforme Abweichungen und die interiktalen (interikal = zwischen den Anfällen) epileptiformen Entladungen (IEDs, engl.: interictal epileptiform discharges), welche durch Spikes, Sharp waves, Spike-and-slow-wave-Komplexe und Polyspikes gekennzeichnet sind (Feyissa & Tatum 2019). Diese können laut den Autoren isoliert oder in kurzen Serien auftreten und sind das wichtigste diagnostische Kennzeichen einer Epilepsie, wobei Typ, Lokalisation und Frequenz der IEDs betrachtet werden müssen und eine sorgfältige Unterscheidung von harmlosen Wellenformen wichtig ist, um eine Überinterpretation zu verhindern. Janszky et al. (2005) untersuchten Patienten, welche an Temporallappenepilepsie litten. Die Autoren berichteten von einem Zusammenhang zwischen dem Alter der betrachteten Patienten, der Krankheitsdauer und der Anfallsfrequenz mit dem häufigeren Auftreten von IEDs.

Für Pillai & Sperling (2006) ist das Vorliegen interiktaler Spikes das Markenzeichen der Epilepsie, da die kortikale Übererregbarkeit und Hypersynchronie aufgezeigt werden. Sie legten sechs Kriterien für das Vorliegen von interiktalen Spikes und Sharp waves fest, welche durch Feyissa & Tatum (2019) modifiziert wurden: die Potenziale treten paroxysmal auf und heben sich deutlich vom Grundrhythmus ab. Abrupte Wechsel der Polarität sind ebenso charakteristisch. Die Autoren definierten eine Dauer von 20 bis 70 ms für interiktale Spikes und von 70 bis 200 ms für Sharp waves. Außerdem zeichnen sie sich durch Asymmetrie, einen steilen Anstieg, ein physiologisches Feld (erkennbar auch in benachbarten Ableitungen), negative Polarität und eine nachfolgende Slow wave aus.

Klinisch gibt es keinen Grund, interiktale Spikes und Sharp waves voneinander zu trennen, da sie das Selbe bedeuten und die zugrundeliegenden Ursachen ähnlich sind; das unterschiedliche Aussehen im EEG bringt die Schnelligkeit der neuronalen Synchronisation und die Ausbreitung der Entladung im Cortex zum Ausdruck (Pillai & Sperling 2006).

Feyissa & Tatum (2019) konstatierten, dass das Vorliegen von ictalen EEGs, die also während eines Anfalls aufgezeichnet wurden, eine Charakterisierung und Quantifizierung des Anfalls ermöglicht. So können beispielsweise der Ausgangspunkt eines Anfalls lokalisiert, Epilepsiesyndrome diagnostiziert und Therapieentscheidungen getroffen werden. Bei generalisierten Anfällen zeigt sich ein typisches Bild aus synchron auftretenden Spikes und Waves in allen Ableitungen, Absencen sind durch Schübe von synchronen Ausbrüchen von etwa drei Spikes und Waves pro Sekunde gekennzeichnet und die EEGs fokaler Anfälle geben Aufschluss über die Lokalisation des Anfallsbeginns durch epileptiforme Signale in den betreffenden Ableitungen (Mattle & Fischer 2021).

1.3.6 Therapie und Rolle der Glutamat-Rezeptor-Antagonisten

Rémi (2018) beschrieb in seinen Ausführungen allgemeine Maßnahmen in der Lebensführung, die Epilepsie-Patienten beachten sollten. Dazu gehören zum Beispiel ein regelmäßiger Tagesablauf, wenig Alkoholkonsum und die Aufklärung über Vorsichtsmaßnahmen im Alltag. Durch eine umfassende Anamnese können anfallsauslösende Triggerfaktoren wie Schlafentzug bestimmt oder ausgeschlossen werden. Eine weitere Säule der Epilepsie-Therapie ist die medikamentöse Behandlung mit Antikonvulsiva. Perucca (2013) konstatierte, dass die Rangfolge der Wirksamkeit verschiedener Mittel unabhängig von der Ursache der Anfälle ist, ob diese nun Tumor-assoziiert sind oder eine andere Ätiologie aufweisen. Es existiert keine Leitlinie speziell zur Behandlung der Tumor-assoziierten

Epilepsie, weshalb die allgemeinen Richtlinien zur Therapie von fokalen Anfällen auch hier Anwendung finden (Fröscher et al. 2014). Laut den Autoren spielen bei der Auswahl des Antikonvulsivums die Nebenwirkungen und pharmakokinetischen Interaktionen mit den Chemotherapeutika eine Rolle und die medikamentöse Therapie sollte aufgrund des hohen Rezidivrisikos beginnen, sobald der erste Anfall stattgefunden hat. Dennoch wird keine prophylaktische Antikonvulsiva-Gabe, also eine medikamentöse Behandlung vor dem ersten Auftreten von Anfällen, empfohlen (Fröscher et al. 2014). Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft ist noch unklar, welche Antikonvulsiva die beste Option der Therapie der Anfälle darstellen und ob es sogar Mittel mit verlässlich tumorhemmenden Wirkungen gibt (Lange et al. 2019). Die Autoren untersuchten in einer Studie die Wirksamkeit und eventuelle Hemmwirkung auf die Proliferation von Glioblastomzellen *in vitro* und kamen zu dem Ergebnis, dass ausschließlich der AMPA-Rezeptor-Antagonist Perampanel (PER) zusätzlich zur antikonvulsiven Wirkung bei hoher Dosierung auch antiproliferative Effekte vermittelt. Es zeigte sich eine hemmende Wirkung auf die Glucoseaufnahme in die Glioblastomzelle, wodurch deren Metabolismus beeinträchtigt wurde. Außerdem wurden geringere extrazelluläre Glutamatspiegel gemessen und es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des Enzyms Glutamin-Synthetase durch die Perampanel-Gabe.

Im Gegensatz dazu konnten Mayer et al. (2020) in ihren *in vivo*-Versuchen keinen tumorhemmenden Effekt von Perampanel feststellen. Dabei wurden C6-Zellen in den Neocortex von Wistar-Ratten injiziert, um ein Modell der Gliom-assoziierten Epilepsie zu etablieren. Auch in diesen Versuchen bestätigte sich die reduzierte Glucoseaufnahme in Gliomzellen unter Perampanel. Die Größe der Tumoren konnte jedoch nicht verringert werden und es gab keine Auswirkungen auf die Überlebenszeit der Tiere. Allerdings fanden die Autoren bei der Untersuchung der Hirnschnitte heraus, dass durch PER spontane epileptiforme Entladungen gehemmt wurden, ein Aspekt, der die antikonvulsive Wirkung bestätigt.

Auch Coppola et al. (2020) untersuchten in einer klinischen Studie mit 36 Hirntumorpatienten über zwölf Monate Perampanel in Bezug auf Wirksamkeit, Verträglichkeit und Auswirkungen auf die Lebensqualität. Es wurde mit einer PER-Gabe von 2 mg pro Tag begonnen und diese über Wochen je nach klinischen Ergebnissen schrittweise auf bis zu 12 mg pro Tag gesteigert. Dabei wurde eine signifikante Reduktion des Auftretens von Anfällen beobachtet, ein Drittel der Patienten erreichte Anfallsfreiheit. Auch wenn keine signifikante Verbesserung der Lebensqualität festgestellt werden konnte, traten keine schweren Nebenwirkungen auf und die Wirksamkeit von Perampanel bei Hirntumor-assoziiierter Epilepsie wurde nachgewiesen.

1.4 Gliom-Modell

Kirschstein & Köhling (2016) gaben einen Überblick über die bis dato bestehenden experimentellen Modelle von Tumor-assoziierten Epilepsien. Diese sind notwendig, um Aspekte wie die epileptogenen Mechanismen verschiedener Tumorarten, den möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen Malignität und dem Auftreten von Anfällen zu verstehen, sich der Wechselwirkung zwischen Tumor und umgebendem Nervengewebe bewusst zu werden und die je nach Tumorart besten Behandlungsmöglichkeiten zu erforschen. Die bisherigen Modelle stützen sich laut den Autoren dabei auf unterschiedliche Zelllinien: humane (Campbell et al. 2012), humane Primärzellkulturen in immunsupprimierten Ratten (Buckingham et al. 2011; Campbell et al. 2015), Zelllinien von Ratten (Senner et al. 2004; Köhling et al. 2006) oder gemischte Zelllinien (Beaumont et al. 1996). Die Vorteile der Nutzung dieser Zelllinien liegen unter anderem in der verhältnismäßig einfachen Kultivierung, der Möglichkeit der Markierung mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) und der dadurch erreichbaren präzisen visuellen Abgrenzung des Tumorgewebes. Die Tumorzellen, normalerweise insgesamt $2,5 \times 10^5$ bis 2×10^6 Zellen, werden als Suspension stereotaktisch in das Gehirn injiziert, wodurch es zu einem Tumorwachstum auf 1 bis 2 mm Durchmesser innerhalb von 7 bis 15 Tagen kommt (Kirschstein & Köhling 2016). Bei Injektion der Zellen in den Neocortex resultiert diese in Anfällen oder Abweichungen im EEG und *in vitro* Übererregbarkeit mit spontanen Entladungen (Köhling et al. 2006; Buckingham et al. 2011; Tönjes et al. 2013).

Des Weiteren wurden im Rahmen der Hirntumorforschung Untersuchungen an Mäusen durchgeführt, wobei die Transplantation von lebenden Glioblastomzellen aus einer humanen Primärzellkultur im Wachstum eines Tumors und dem Auftreten neurologischer Symptome, beispielsweise Lethargie, resultierte (Tönjes et al. 2013).

Lange et al. (2020) beschreiben in ihrer Arbeit ein Tiermodell, das F98-Ratten-Gliom-Modell. Um die therapeutische Wirksamkeit einer PER-Behandlung als Ergänzung zur Radiochemotherapie zu untersuchen, wurden F98-Gliomzellen in Fischer-Ratten gezüchtet. Es zeigte sich, dass die Implantation der F98-Gliomzellen ein brauchbares Modell der orthotopen Gliomprogression im Neocortex der Ratte und zur Simulation eines Gliom-assoziierten epileptiformen Phänotyps ergab.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst auf Basis des F98-Ratten-Gliom-Modells die Wirksamkeit einer medikamentösen Behandlung mit dem AMPA-Rezeptor-Antagonisten Perampanel bei Gliom-assoziiertes Epilepsie der Ratte untersucht. Bei den Untersuchungen lag das Augenmerk auf verschiedenen Größen: zum Einen wurde die Häufigkeit des Auftretens von interiktalen Spikes betrachtet, indem die vorliegenden Video-EEGs analysiert und manuell nach epileptiformen Potenzialen abgesucht wurden. Diese Analyse erfolgte jeweils in drei verschiedenen Zeiträumen: nach der Operation, zu Beginn der Behandlung und kurz vor dem Lebensende der Tiere (präfinal). Es erfolgte der Vergleich mit historischen Daten des präfinalen Zeitraums aus früheren Dissertationen (Boisserée, Liebelt) von Tieren, die keine Behandlung erhalten hatten. Die Überlebenszeit der Tiere nach der Operation wurde analysiert, um einen potenziellen Einfluss der Perampanel-Gabe auf das Gesamtüberleben zu untersuchen. Beim Auftreten von Anfällen sollten deren Häufigkeit und Dauer bestimmt werden, jedoch waren die behandelten Tiere anfallsfrei.

Abschließend wurden die klinischen EEG-Daten von Patienten, die entweder an einem Glioblastoma multiforme oder an Hirnmetastasen, ausgehend von einem Bronchial- oder Colonkarzinom litten, ausgewertet und verglichen.

Die Reduktion des Auftretens epileptischer Anfälle und interiktaler epileptiformer Potenziale ließe auf eine verbesserte Lebensqualität durch die Therapie mit Perampanel schließen, wodurch sich neue Behandlungsmöglichkeiten für die Gliom-assoziierte Epilepsie ergeben könnten. Durch die Auswertung der klinischen Patientendaten könnten neue Erkenntnisse zur Diagnostik und Behandlung oder zu weiteren Epilepsie-Modellen gewonnen werden.

2. Material und Methoden

Die beschriebenen Methoden wurden auf Grundlage der Arbeiten von Bajorat et al. (2011, 2016, 2018), Mayer et al. (2020) und Lange et al. (2020) durchgeführt und geringfügig nach Köhling et al. (2006), Kirschstein & Köhling (2016) und Schulze et al. (2020) modifiziert.

2.1 F98-Ratten-Gliom-Modell

Die Versuche wurden an drei männlichen Fischer-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Zur Entwicklung höhergradiger Gliome wurden den Tieren im Alter zwischen neun und zwölf Wochen in einer stereotaktischen Operation F98-Gliomzellen in den Neocortex implantiert.

Während aller Vorgänge wurden die nationalen und internationalen Standards der ethischen Nutzung von Tieren berücksichtigt (Antrag auf Genehmigung des Tierversuches von Prof. Kirschstein, Aktenzeichen LALLF 7221.3-1-017/14). Daher wurden sowohl die Anzahl der Versuchstiere als auch deren Leid auf ein Minimum reduziert, unter anderem durch vorher festgelegte Kriterien zum Abbruch der Versuche je nach Zustandsverschlechterung der Tiere. So wurden Tiere, bei denen Symptome wie Gewichtsverlust oder Apathie auf einen moribunden Status hindeuteten, in Narkose dekapitiert, womit die Versuche endeten. Während der Untersuchungen wurden die Tiere außerdem in einzelnen Käfigen gehalten, sodass es während der eventuell auftretenden epileptischen Anfälle nicht zu gegenseitigen Verletzungen kommen konnte. Des Weiteren erfolgte die Datenübertragung drahtlos, um Strangulationen während der Anfälle und anderer Bewegungen der Tiere zu verhindern.

Die Versuchstiere 1 bis 3 wurden mit dem Antikonvulsivum Perampanel behandelt. Es erfolgte der Vergleich mit den Ergebnissen von vier im Rahmen vorheriger Dissertationen (Boisserée, Liebelt) untersuchten Tieren (4 bis 7), welche keinerlei Behandlung erhalten hatten.

Eine Übersicht über die Versuchstiere findet sich in Tabelle 1.

Tab. 1: Übersicht der Versuchstiere

Bezeichnung	Geburtsdatum	Tag der Operation	Art / Start der Behandlung	Tag der Dekapitation
Tier 1	04.07.2017	06.09.2017	PER / 13.09.2017	02.10.2017
Tier 2	04.07.2017	06.09.2017	PER / 13.09.2017	21.09.2017
Tier 3	10.07.2017	12.09.2017	PER / 19.09.2017	02.10.2017
Tier 4	30.07.2015	22.10.2015	keine	11.11.2015
Tier 5	15.03.2017	31.05.2017	keine	14.06.2017
Tier 6	30.07.2015	05.10.2015	keine	06.11.2015
Tier 7	30.07.2015	22.10.2015	keine	09.11.2015

Die Tiere 1 bis 3 wurden in drei unterschiedlichen Zeiträumen untersucht: zuerst erfolgte die Betrachtung eines Tages der Baseline-Phase. Diese bezeichnet den Zeitraum frühestens 12 Stunden nach der Operation bis zum Beginn der Behandlung. Außerdem war ein Abschnitt von drei Tagen zu Beginn der Perampanel-Behandlung Gegenstand der Untersuchungen. Abschließend wurde der präfinale Zeitraum untersucht, also die Tage kurz vor dem Tod der Tiere. Die Daten aus der Baseline-Phase und dem präfinalen Zeitraum wurden mit denen der Tiere 4 bis 7 verglichen.

2.2 Stereotaktische Elektroden- und Gliomzellimplantation

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurde die Operation zur Elektroden- und Gliomzellimplantation von Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock, Dr. F. Lange und K. Porath, durchgeführt. Zuerst erfolgte die Anästhesie der Tiere mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) S-Ketaminhydrochlorid (Ketanest® S, Parke-Davis/Pfizer, Deutschland) und 10 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, BayerVital, Leverkusen, Deutschland). Eine künstliche Beatmung der Tiere war nicht erforderlich. Nach einer Überprüfung der Narkosetiefe wurde die Körperbehaarung an Kopf und Nacken entfernt und die rasierten Areale mit Braunoderm® (B. Braun, Melsung, Deutschland) desinfiziert. Die Tiere

wurden zur Fixierung in einem standardisierten stereotaktischen Rahmen (Typ SR-5 N, Narishige, Tokio, Japan) platziert. Alle verwendeten Instrumente wurden mit Wasserstoffperoxid und Peroxidessigsäurelösung (Actril®, Minntech, Minneapolis, MN, USA) sterilisiert. Es erfolgte eine Hautinzision in der Mitte des Kopfes (15 mm auf dem Kopf und 10 bis 15 mm am Nacken entlang) und die Separation des Subkutangewebes. Das Periost wurde ohne Beschädigung der Temporal- und Okzipitalmuskeln gereinigt. In eine subkutan geschaffene Tasche im Rücken der Tiere wurden die Telemetrie-Transmitter (Data Science International, Inc. (DSI), Arden Hills, MN, USA) eingesetzt. Mit einem schnell rotierenden Dentalbohrer wurden zwei Bohrlöcher mit einem Durchmesser von einem Millimeter gesetzt. Die erste Bohrung (B1) erfolgte 2 bis 3 mm posterior in Bezug auf das Bregma (Schnittpunkt der Sutura sagittalis mit der Sutura coronalis) und 4 mm links der Mittellinie. Das zweite Bohrloch (B2) wurde 4 bis 5 mm anterior bezogen auf das Lambda (Schnittpunkt Sutura sagittalis mit Sutura lambdoidea) und 4 mm rechts der Mittellinie gesetzt. Für die Zellimplantation wurde manuell ein drittes Bohrloch (B3) mit einem Durchmesser von 0,7 mm gebohrt, in einer Position 1,8 mm anterior des Bregmas und 2,5 mm anterior der Mittellinie. Abbildung 2 zeigt die Lage der Bohrlöcher auf dem Schädel des Versuchstieres.

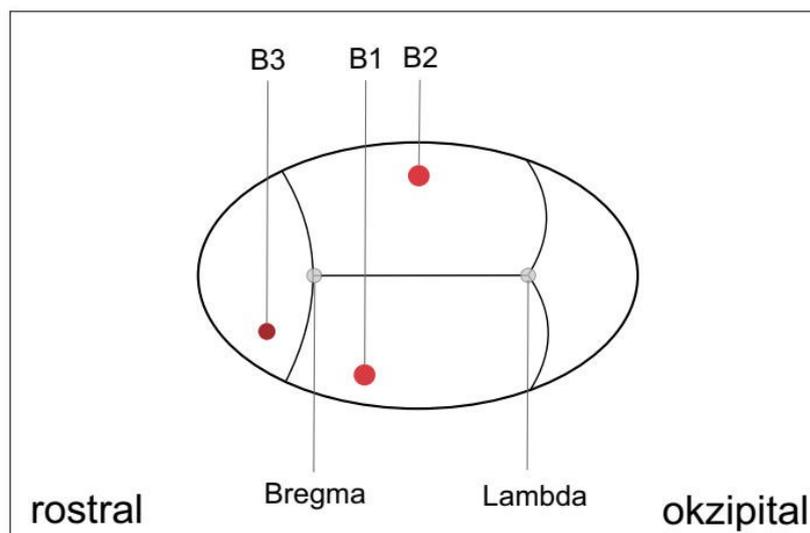


Abb. 2: Positionen der Bohrlöcher B1 und B2 für die Elektroden und Position des Bohrloches B3 für die Zellimplantation. Bregma = Schnittpunkt Sutura sagittalis mit Sutura coronalis, Lambda = Schnittpunkt Sutura sagittalis mit Sutura lambdoidea. B1: 2 bis 3 mm posterior des Bregmas und 4 mm links der Mittellinie, B2: 4 bis 5 mm anterior von Lambda und 4 mm rechts der Mittellinie, B3: 1,8 mm anterior des Bregmas und 2,5 mm links der Mittellinie.

Die Silikonisolierung wurde vom Ende der Transmitter-Kabel entfernt. Die beiden Elektroden wurden an den Spitzen umgebogen und epidural oberhalb des Cortex in die Bohrlöcher B1 und B2 gesetzt. Die Fixierung der Elektroden erfolgte mit einer Kombination aus lichthärtendem Haftvermittler (Heliobond®, Ivoclar Vivadent GmbH, Buers, Österreich) und lichthärtendem dentalen Füllungsmaterial auf Compomer-Basis (Compoglass® Flow, Ivoclar Vivadent GmbH), welches eine starke Haftung am darunterliegenden Neurocranium gewährleistet. Die Materialien wurden mit UV-Licht ausgehärtet.

Auf Abbildung 3 ist die Injektion der trypsinierten F98-Zellen zu sehen. Dabei wurden die Zellen aus einer subkonfluent wachsenden Kultur als Suspension aufgezo-gen und mittels einer Hamilton-Spritze (Model 701 N SYR, Hamilton, Reno, Nevada, USA) in Bohrloch B3 injiziert. Die Konzentration der Suspension betrug dabei 10^5 Zellen je $10\ \mu\text{l}$ PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl.: phosphate buffered saline) und es wurden insgesamt $10\ \mu\text{l}$ ($1\ \mu\text{l}$ alle zwei Minuten) injiziert. Tiere der Kontrollgruppe erhielten während der selben Prozedur eine Injektion mit $10\ \mu\text{l}$ PBS.



Abb. 3: Intraoperative Aufnahme der F98-Zellimplantation.



Abb. 4: Versuchstier postoperativ mit vernähter Wunde.

Im Anschluss wurde das Bohrloch mit Heliobond® abgedeckt und die Wunde vernäht. Dabei wurde für die Faszie resorbierbares 5-0 Nahtmaterial (Marlin®, Catgut, Markneukirchen, Deutschland) genutzt, für die Kopfhaut dagegen nicht-resorbierbares 5-0 Nahtmaterial (Polyester-S, Catgut). Abschließend wurde die Wunde mit isotoner Kochsalzlösung gereinigt und mit Braunoderm® desinfiziert.

Die Fotos der operierten Versuchstiere wurden zur Verfügung gestellt vom Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie in Rostock.

2.3 Therapie mit dem AMPA-Rezeptorblocker Perampanel

Am siebten Tag nach der stereotaktischen Gliomzellimplantation startete die Behandlung der Tiere: es wurde mit der Gabe von Perampanel (15 mg/kg KG pro Tag, Eisai Inc., Tokio, Japan) begonnen, welche bis zum Tod der Versuchstiere fortgesetzt wurde. Dabei wurde das Medikament, gelöst in DMSO im Verhältnis 1:1, mit einer Rate von 10 µl pro Stunde mittels einer subkutan implantierten osmotischen Minipumpe (Modell 2ML1, Alzet, Cupertino, CA, USA) abgegeben.

2.4 Telemetrische EEG-Überwachung

Die Video-EEG-Überwachung fand unter kontrollierten Umweltbedingungen statt. Die Versuchstiere wurden in einem isolierten Raum bei 22 ± 2 °C und relativer Luftfeuchtigkeit von 40 bis 60 % in einzelnen Käfigen untergebracht. Durch Anschalten des Lichtes von 6 bis 18 Uhr wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Die Überwachung wurde mit einem Telemetriesystem (ETA-F20, Dataquest A.R.T.4.2., Data Sciences International, Inc., St. Paul, MN, USA) durchgeführt, für die gleichzeitige Videoaufzeichnung wurde eine Hell/Dunkel-Netzwerk-Kamera mit Infrarotfilter (Axis 223M, Axis communications, Lund, Schweden) genutzt. Um die Videoqualität bei nächtlichen Aufnahmen (18 bis 6 Uhr) durch Verstärkung des Restlichtes zu verbessern, wurde über jedem Käfig ein blaues Nachtlicht ($I_v = 650$ mcd, entspr. max. 2 lx) angebracht. An einem Messplatz konnten bis zu vier Tiere untersucht werden. Der EEG-Sender der Tiere (Transmitter) wurde mittels eines Magneten aktiviert. Unterhalb der einzelnen Käfige befand sich jeweils eine Platte mit einem Receiver für die kabellose Übertragung der EEG-Daten vom Transmitter. Vom Receiver wurde das Signal über eine Data Exchange Matrix an einen Computer zur Auswertung weitergeleitet.

2.5 Datenanalyse mittels Software

Die Software NeuroScore™ 2.0 (DSI, Arden Hills, MN, USA) wurde für die Betrachtung der Videoaufzeichnungen sowie der EEG-Daten bei der Suche nach interiktalen Spikes und epileptischen Anfallsmustern genutzt. Auf Abbildung 5 sieht man eine Bildschirmansicht des Programms während der Auswertung.

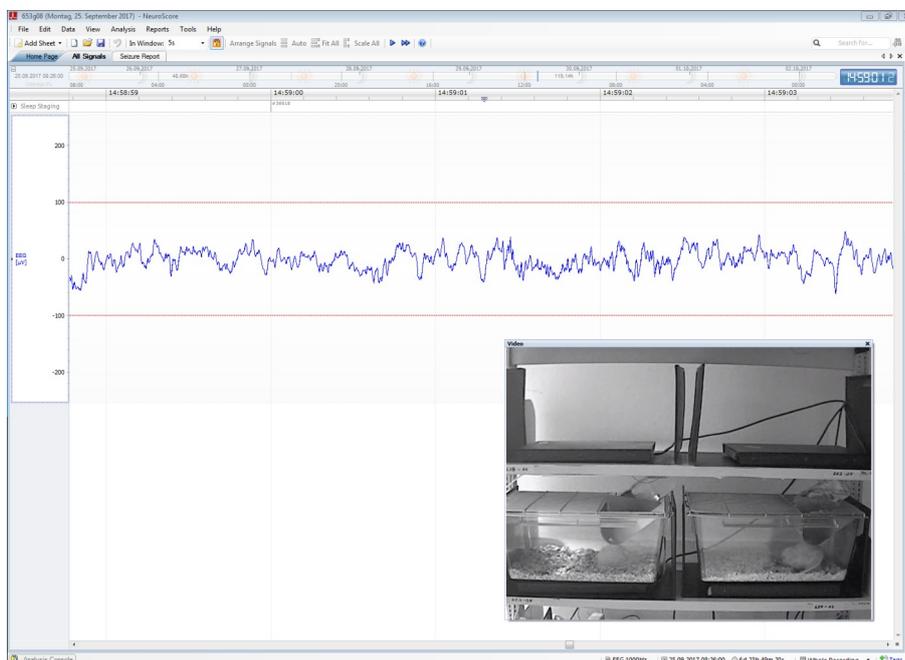


Abb. 5: Bildschirmansicht der Software NeuroScore™. Der Messplatz zur Video-EEG-Überwachung mit zwei zu untersuchenden Tieren kann parallel zur EEG-Spur betrachtet werden.

2.5.1 Auswertung der Video-EEG-Daten

Im Programm NeuroScore™ sind das EEG und die Videospur synchron dargestellt, wobei es möglich ist, die Daten in Echtzeit, beschleunigt zu betrachten oder anzuhalten. Mittels einer

Zeitleiste im oberen Bereich kann der gewünschte Zeitraum für die Betrachtung ausgewählt werden. Das Zeitfenster kann vom Benutzer festgelegt werden, wobei sich eine Einstellung von fünf Sekunden als praktikabel für die Analyse der Daten und Markierung interiktaler Spikes erwies. Zusätzliches Hilfsmittel waren Schwellenwertlinien, in der Software als „Axis Lines“ bezeichnet, womit eine einfachere Abgrenzung der interiktalen Spikes von der Grundaktivität möglich war. Auch wenn die Grundaktivität kein festgelegter Bereich war, sondern für jedes Tier individuell und veränderlich, erwies sich die Platzierung der „Axis Lines“ bei +100 μ V und -100 μ V als sinnvoll.

Trotz des Nachtlichtes waren die Tiere während der nächtlichen Aufnahmen (ca. 18 bis 6 Uhr) nicht genau zu erkennen, weshalb in diesem Zeitraum technisch bedingt nur die EEG-Spuren ausgewertet werden konnten.

2.5.2 Markierung interiktaler Spikes im EEG

Es kann aufgrund der Vordaten (Boisserée, Liebelt) angenommen werden, dass die Tiere nach der Injektion der F98-Zellen an Epilepsie litten. Zur Detektion von interiktalen Spikes und epileptischen Anfällen wurde das EEG manuell untersucht, parallel erfolgte die Analyse der Videospur. Aufgrund der bereits beschriebenen Individualität und Variabilität der Grundaktivität der einzelnen Tiere konnte keine absolute Definition für das Vorliegen interiktaler Spikes festgelegt werden und es musste bei jeder Markierung der aktuelle Grundrhythmus in die Untersuchung einbezogen werden. Dennoch wurden vorher bestimmte Kriterien für die Analyse genutzt: eine Dauer von 20 bis 70 ms und eine abrupte Negativierung oder Positivierung des EEG-Signals mit einer Amplitude, die mindestens das Doppelte der Spitze-zu-Spitze-Amplitude der Grundaktivität erreicht. Durch diese Festlegungen konnte zwischen interiktalen Spikes und Artefakten im EEG-Signal, z. B. von den Elektroden oder der Muskulatur, unterschieden werden.

Abbildung 6 zeigt einen interiktalen Spike des dritten untersuchten Tieres aus der Software NeuroScore™ im Zeitfenster von fünf Sekunden.

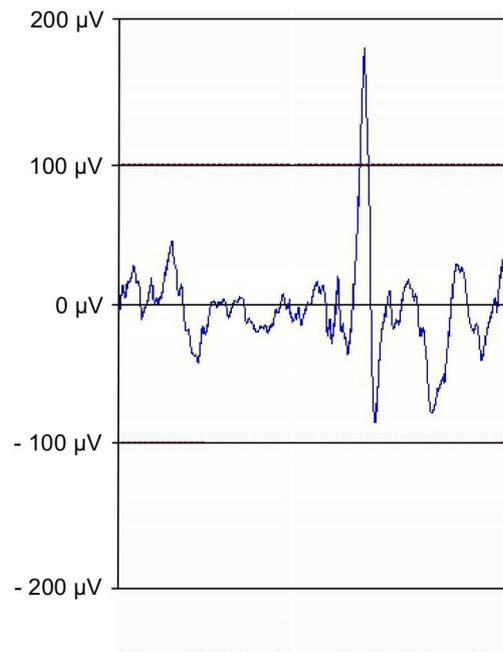


Abb. 6: Interiktaler Spike im EEG des untersuchten Tieres 3, Darstellung im Zeitfenster von fünf Sekunden

Auch für die Markierung eines epileptischen Anfalls wurden Kriterien festgelegt. Hierzu gehörten Anfallsmuster als iktales epilepsietypisches EEG und Verhaltensauffälligkeiten (meist motorischer Art) in der Videoaufzeichnung, welche wiederum der Unterscheidung von Artefakten diene.

Mit NeuroScore™ konnte am Ende der Auswertung ein „Seizure Report“, also ein Anfallsbericht, erstellt werden. So erhielt man eine zeitlich geordnete Auflistung aller manuell markierten Signale, unabhängig davon, ob es sich um einen interiktalen Spike oder einen Anfall handelte.

2.6 Analyse von Patienten-EEGs

Für die Auswertung klinischer Daten standen die EEG-Aufzeichnungen von acht Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung. Für die

Auswertung der Daten wurde die Software Neuroworks® (Natus Medical Inc., Pleasanton, CA, USA) genutzt. Die Patienten litten entweder an einem Glioblastoma multiforme oder an Metastasen, ausgehend von anderen Primärkarzinomen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 2. Aus technischen Gründen konnte das EEG von Patient 15 nicht ausgewertet werden.

Tab. 2: Übersicht der Patienten

Bezeichnung Patient	Diagnose	OP-Lokalisation
04	GBM	links zentral
06	GBM	rechts frontal
08	GBM	links temporal
15*	GBM	-
19	GBM	rechts temporal
23	GBM	rechts frontal
11	Metastasen Bronchialkarzinom	rechts parietal und links temporal
14	Metastase Colonkarzinom	rechts frontal

Bei der Analyse lag das Augenmerk ebenfalls auf epileptiformen Potenzialen. Neben den bereits beschriebenen interiktalen Spikes wurde das EEG nach einer anderen Form der interiktalen epileptiformen Entladungen, den Phasenumkehrungen, abgesucht. Die Phasenumkehr markiert in bipolaren Montagen den Ort der größten Elektronegativität zwischen zwei benachbarten Ableitungen mit einer gemeinsamen Elektrode. Dabei zeigen sich zwei gegenläufige Ausschläge durch eine oberflächenpositive abfallende EEG-Spur an einem Elektrodenpaar und eine oberflächennegative aufsteigende am anderen Elektrodenpaar, wodurch die Spitzen der beiden Wellen aufeinander zeigen (Feyissa & Tatum 2019). Auch diese Phasenumkehrungen gehören zu den epilepsietypischen Signalen.

Auf der Benutzeroberfläche der Software Neuroworks® sind die einzelnen EEG-Spuren übereinander dargestellt. Auch hier konnte mittels einer Zeitleiste an beliebige Punkte im EEG gesprungen werden, auch ein Abspielen der Spur in Echtzeit oder beschleunigt war möglich. Außerdem bestand die Möglichkeit, Markierungen und Kommentierungen vorzunehmen, welche ebenfalls in der Zeitleiste erschienen und so zu einer besseren Orientierung im EEG verhalfen. Die Zeitbasis konnte vom Benutzer eingestellt werden, je nach Grundrhythmus erwiesen sich 30 mm/sek oder 60 mm/sek als sinnvoll für die Analyse. Ein hilfreiches

Werkzeug für die Auswertung war die Zoom-Funktion, wobei mittels einer Lupe ausgewählte Bereiche des EEGs in beliebiger Vergrößerung betrachtet werden konnten. Abbildung 7 zeigt eine Bildschirmansicht des Programms während der Auswertung.

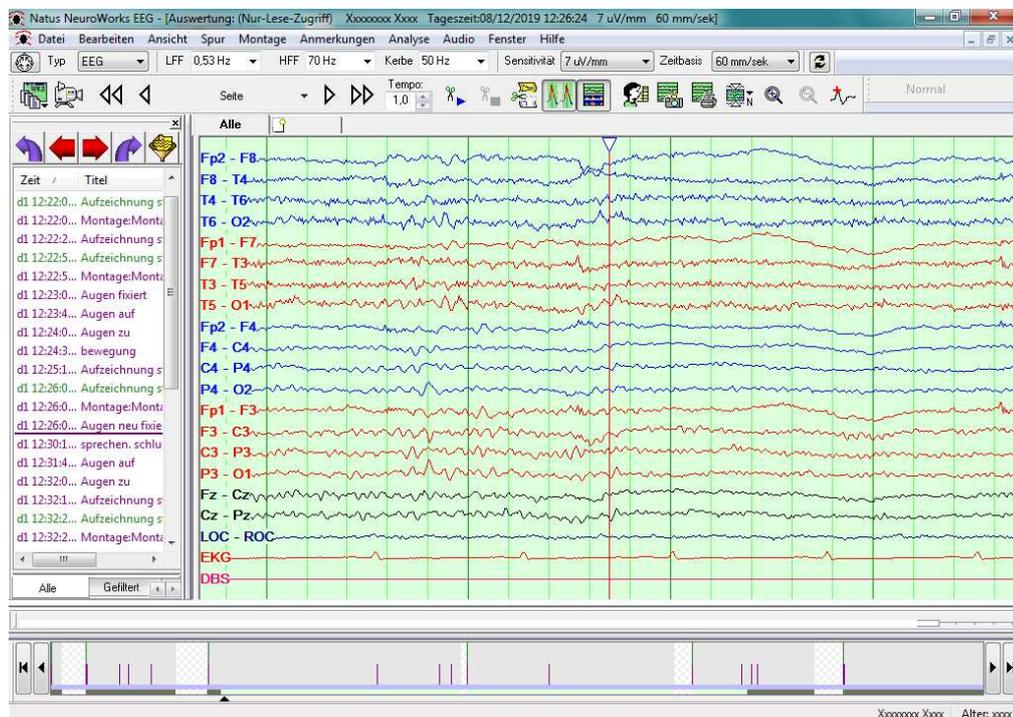


Abb. 7: Bildschirmansicht der Software Natus Neuroworks®

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2016, LibreOffice Calc 7.0, SigmaPlot 13.0 und SigmaStat 3.5. Mittelwerte \bar{x} , Standardabweichungen, Medianwerte und Quartile wurden gebildet. Es wurden die behandelten Tiere zu jeweils drei unterschiedlichen Zeitpunkten (Baseline, Behandlungsbeginn, präfinal) sowie die behandelten mit den unbehandelten Tieren verglichen

und auf signifikante Unterschiede untersucht. Dafür wurden der Mann-Whitney Rank Sum Test (U-Test), mit dem auch kleine Stichproben analysiert werden können, und der gepaarte T-Test genutzt, wobei die Unterschiede ab einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant galten.

3. Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich in fünf Teile. Zuerst werden die drei mit Perampanel behandelten Tiere jeweils einzeln präsentiert und die Häufigkeit der interiktalen Spikes pro Stunde (im Folgenden verkürzt auch Spikes genannt) in jeweils drei unterschiedlichen Zeiträumen (Baseline-Phase, Beginn Behandlung mit Perampanel, präfinal) dargestellt und verglichen. Es sollten auch eventuelle epileptische Anfälle hinsichtlich Häufigkeit und Dauer untersucht werden, jedoch traten diese bei den drei behandelten Tieren nicht auf. Im vierten Kapitel erfolgt der Vergleich mit den Daten des präfinalen Zeitraums vierer unbehandelter Tiere, die im Rahmen vorheriger Dissertationen von Boisserée und Liebelt erhoben worden sind. Im letzten Teil werden die Erkenntnisse aus der Betrachtung der klinischen EEGs von Patienten beschrieben.

3.1 Tier 1

Abbildung 8 veranschaulicht die Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde sowie die Verteilung bzw. Streuung der Daten des ersten behandelten Tieres in der Baseline-Phase, zu Beginn der Behandlung und im präfinalen Zeitraum.

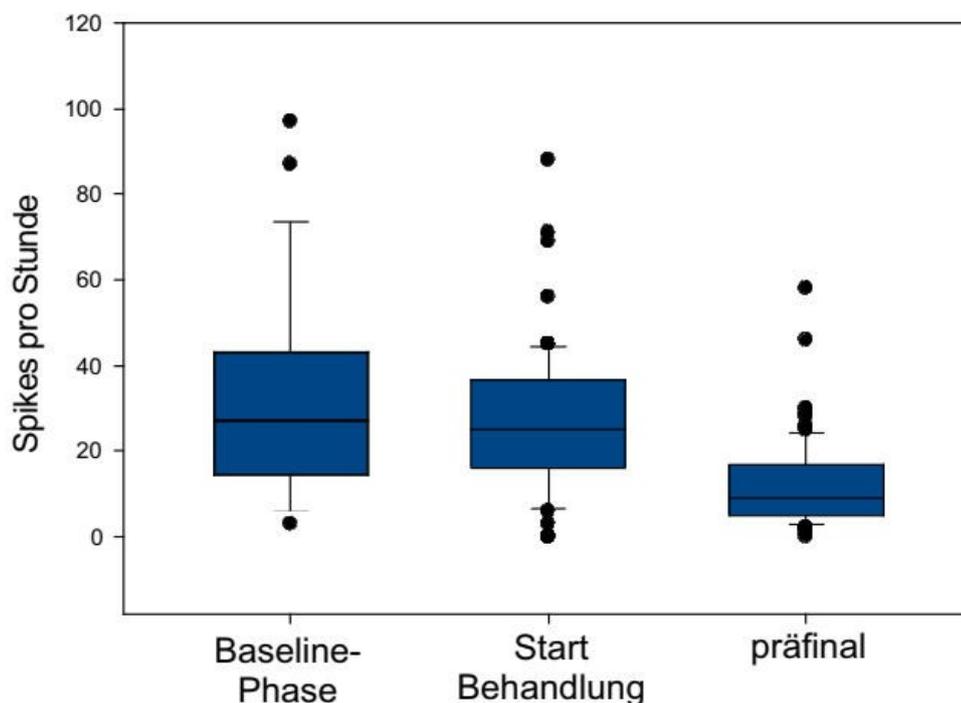


Abb. 8: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 in der Baseline-Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum.

Es wird ersichtlich, dass mit Fortschreiten der Behandlung das Auftreten der Spikes abnahm. Betrag der aus den Ergebnissen des untersuchten Zeitraums errechnete Median der Spikes während der Baseline-Phase noch 27, sank er zu Beginn der Therapie auf 25 und im präfinalen Zeitraum auf 17.

Das individuelle Verhalten von Tier 1 war insgesamt unauffällig, es zeigte weder ungewöhnlich intensive Aktivität noch schwere Apathie. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der technischen Gegebenheiten die Video-Beobachtung des Tieres lediglich für 12 Stunden am Tag, zwischen ca. 6 Uhr und 18 Uhr, adäquat möglich war.

In den folgenden Abschnitten sind Diagramme, die die Anzahl der Spikes der Tiere im zeitlichen Verlauf darstellen, beschrieben. Bei diesen wurde die Tageszeit in vollen Stunden angegeben, die abgetragenen Werte entsprechen den Messwerten in dieser vollen Stunde. Der untersuchte Tag ist durch die Zahlenwerte „- 19“, „- 18“ etc. unterhalb des Diagramms angegeben. Dabei bedeutet beispielsweise „- 20“, dass der Tod des Tieres in 20 Tagen

eingeleitet wurde. Um einen eventuellen Einfluss des zirkadianen Rhythmus zu bewerten, wurden in den besagten Diagrammen die Zeiträume, in denen das Licht ausgeschaltet war (ca. 18 bis 6 Uhr), grau hinterlegt.

3.1.1 Baseline-Phase

Auf Abbildung 9 ist die Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde während der Baseline-Phase im zeitlichen Verlauf abgetragen.

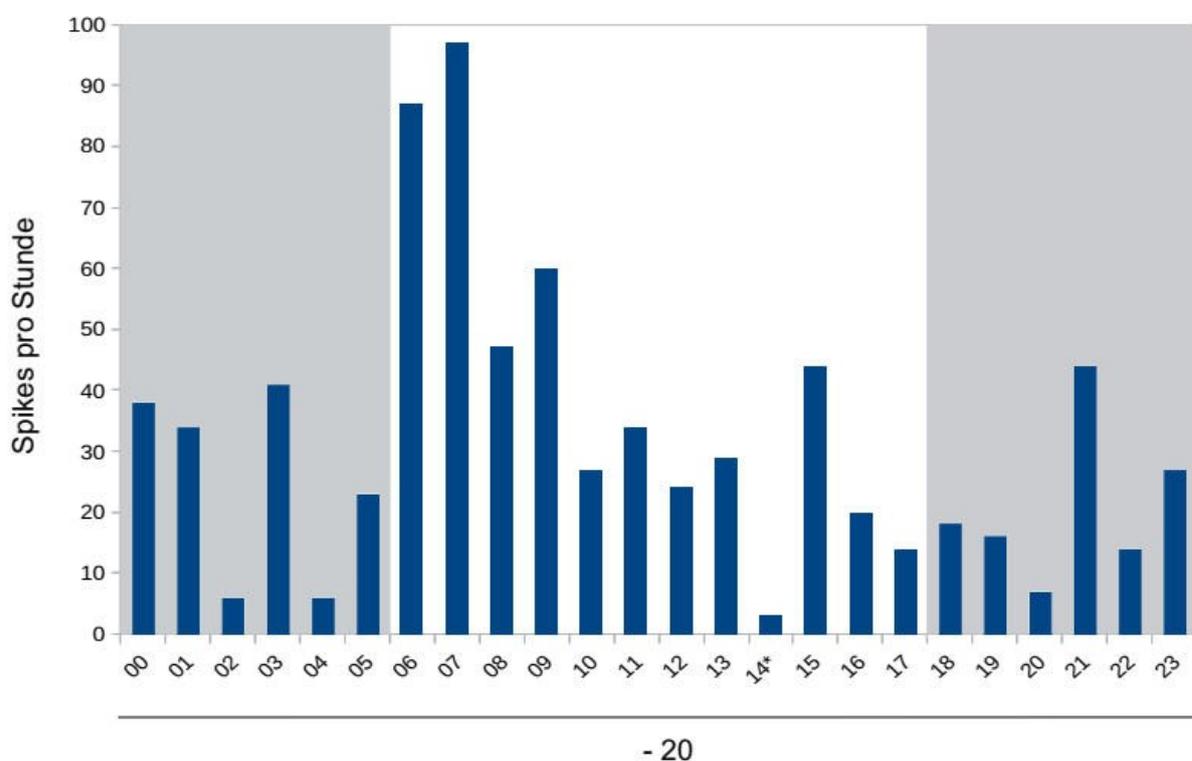


Abb. 9: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.

Insgesamt schwankte die Anzahl der Spikes innerhalb der untersuchten 24 Stunden. Auffällig ist die relativ hohe Spikerate am frühen Morgen, nachdem das Licht eingeschaltet wurde. Es traten tagsüber mehr Spikes auf als nachts (\bar{x} Tag = 40,5; \bar{x} Nacht = 22,8), jedoch lässt sich

aufgrund des kurzen Untersuchungszeitraums keine allgemeingültige Aussage über eine Tag-Nacht-Verteilung der epilepsietypischen Potenziale treffen. Die geringe Anzahl von Spikes in der Stunde 14 des untersuchten Tages kommt dadurch zustande, dass die EEG-Aufzeichnung für etwa 40 Minuten unterbrochen und ein neuer Datensatz begonnen wurde.

3.1.2 Beginn der Behandlung

Abbildung 10 stellt die zeitliche Verteilung der Spikes des ersten Tieres zu Beginn der Kombinationsbehandlung aus Radiochemotherapie und Perampanel dar.

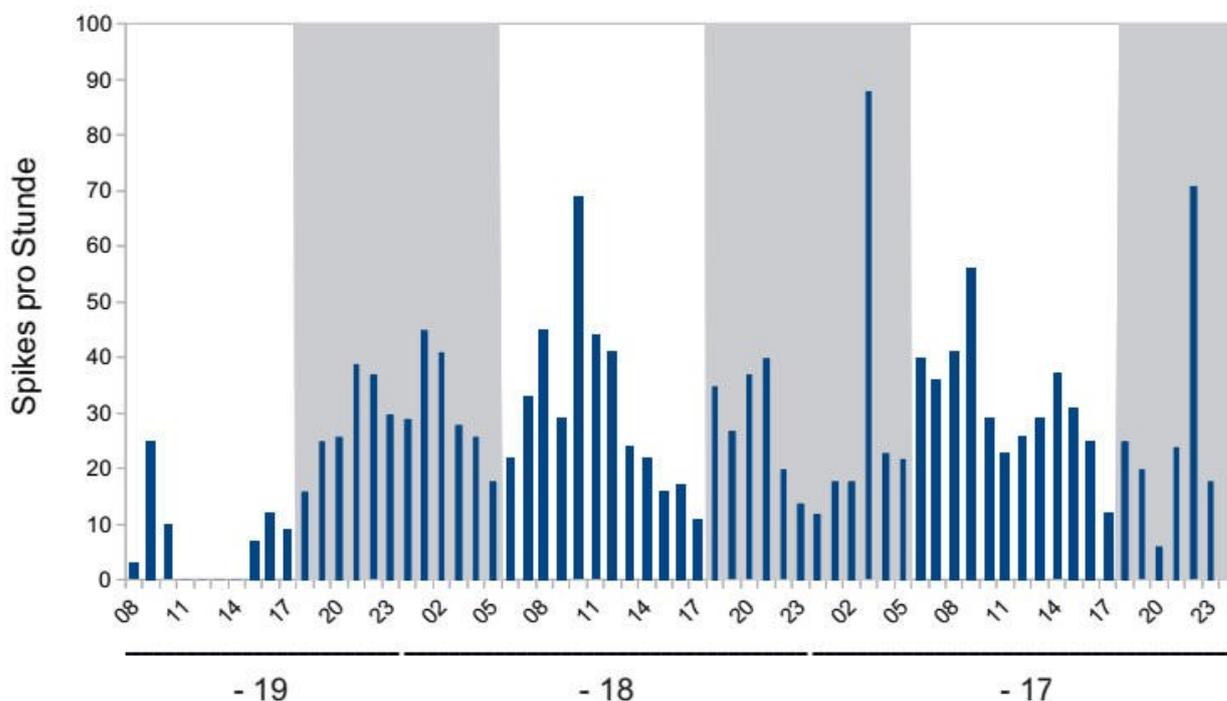


Abb. 10: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.

Der Median der Spikes pro Stunde betrug bei Behandlungsbeginn 25. Die Spikes waren ab dem Abend des ersten untersuchten Tages bis auf einige Ausreißer relativ gleichmäßig über den gesamten Zeitraum verteilt. Davor fiel besonders die Zeit zwischen 11 und 14 Uhr ins

Auge, in der keine Spikes aufgetreten sind. Es traten am Tag und in der Nacht ähnlich viele Spikes auf (\bar{x} Tag = 24,2; \bar{x} Nacht = 29,3).

3.1.3 präfinaler Zeitraum

Abbildung 11 zeigt den zeitlichen Verlauf der interiktalen Spikes pro Stunde im präfinalen Zeitraum, also in den letzten Tagen, bevor das Tier aufgrund seines moribunden Zustandes dekapitiert wurde.

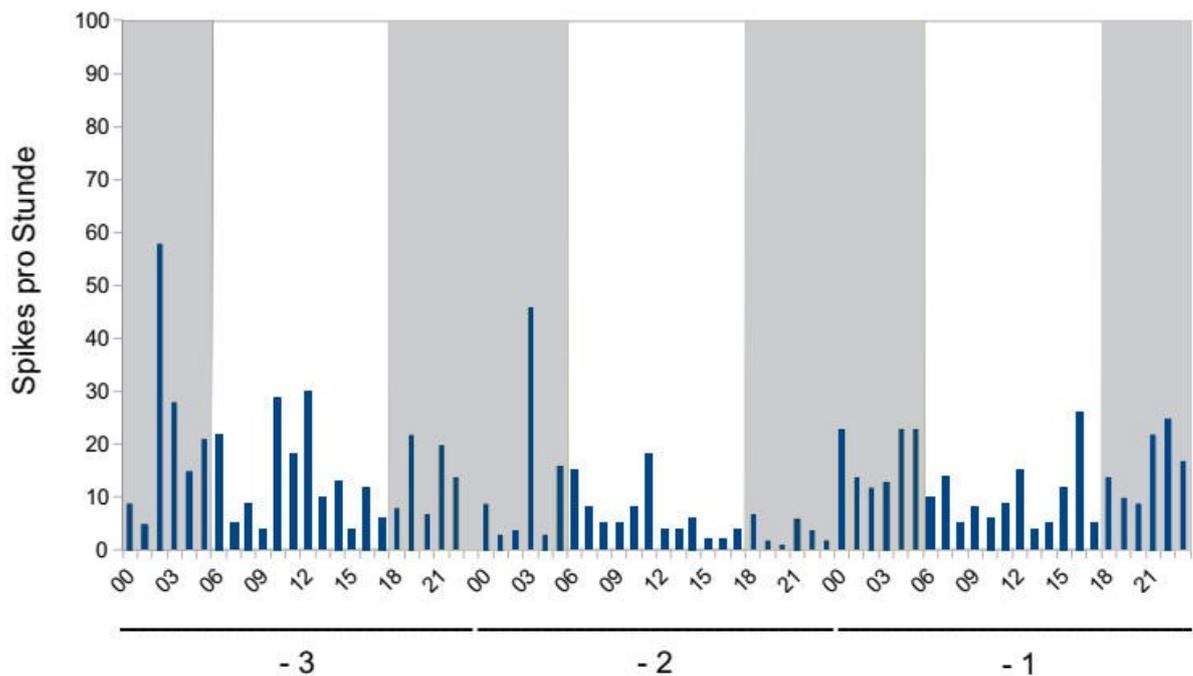


Abb. 11: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.

Der Median der Spikes betrug in der präfinalen Phase 17. Es lag bis auf wenige Ausreißer eine einigermaßen gleichmäßige Verteilung der Spikes über den gesamten untersuchten

Zeitraum vor, wobei es keine großen Unterschiede zwischen den Tagen und Nächten gab (\bar{x} Tag = 10,1; \bar{x} Nacht = 14,3). Evident ist, dass die Spikerate am letzten Tag (- 1) vor der Dekapitation noch einmal leicht angestiegen ist.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass mit Fortschreiten der Behandlung die Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde abnahm. Der errechnete Median der Spikes betrug während der Baseline-Phase noch 27, war also um den Faktor 1,6 größer als im präfinalen Zeitraum.

3.2 Tier 2

Abbildung 12 zeigt die die Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde sowie die Verteilung bzw. Streuung der Daten für das zweite behandelte Tier in der Baseline-Phase, zu Beginn der Behandlung und im präfinalen Zeitraum.

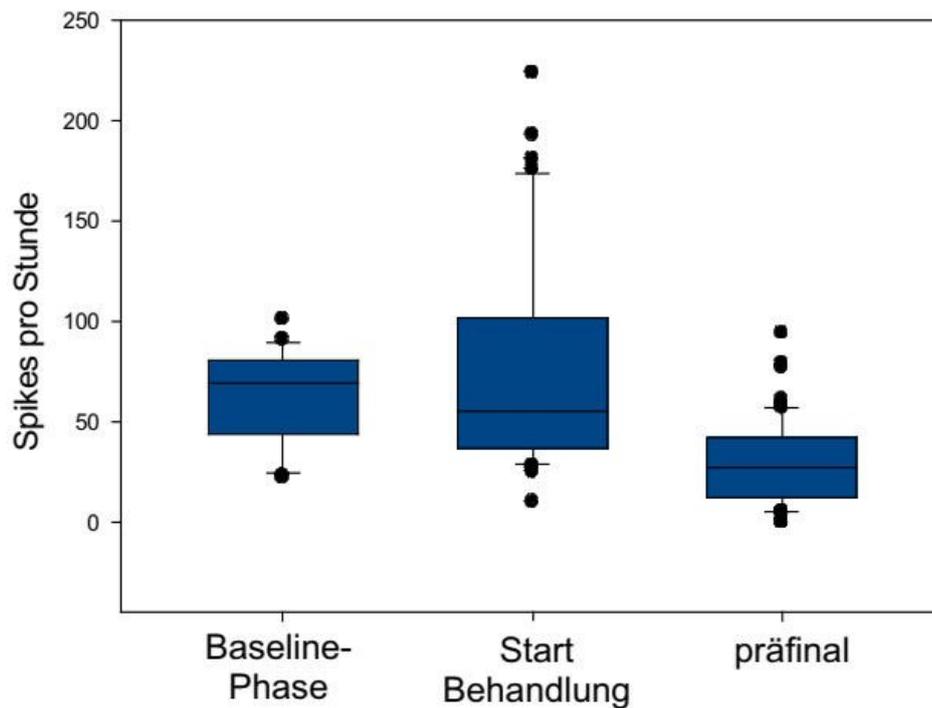


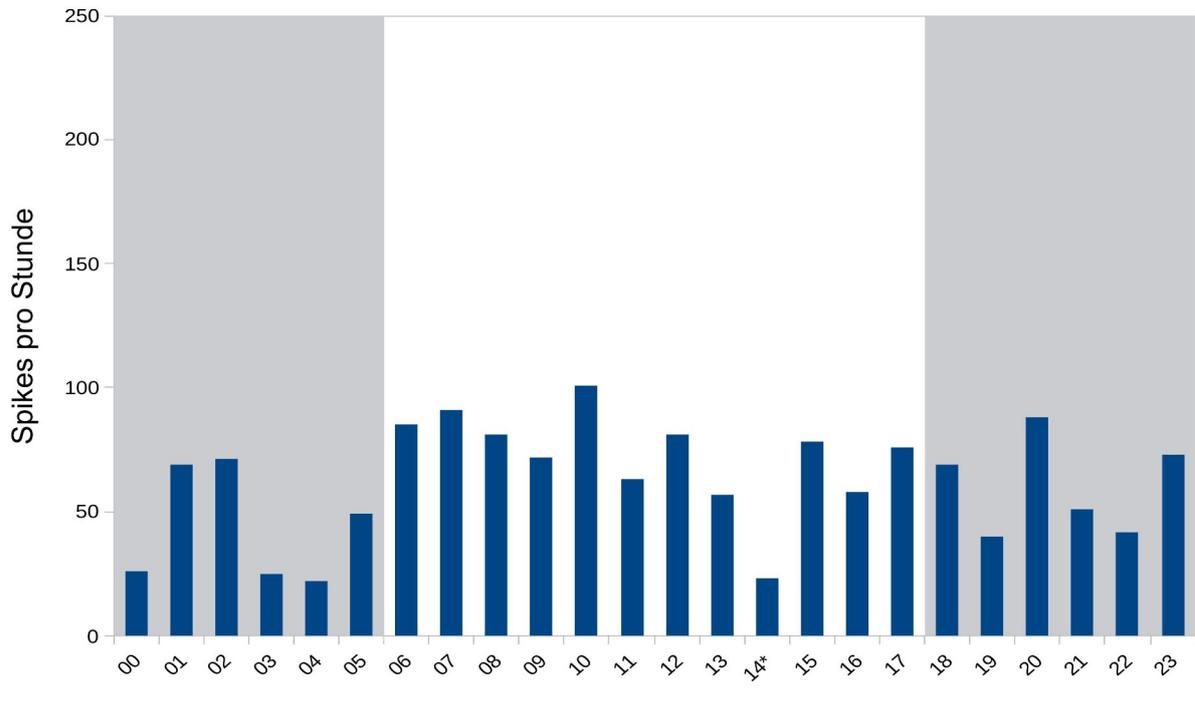
Abb. 12: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 in der Baseline-Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum.

Bei diesem Tier nahm der errechnete Median der aufgetretenen Spikes ebenfalls mit fortschreitender Dauer der Therapie ab. So betrug er während der Baseline-Phase 69, zu Beginn der Behandlung 55 und sank zum Ende der Betrachtung im präfinalen Zeitraum weiter auf 26,5. Auffällig ist die starke Streuung der Zahlenwerte im zweiten untersuchten Zeitraum, also nach dem Therapiebeginn, wobei große Ausreißer verzeichnet wurden.

Insgesamt war Tier 2 sehr ruhig, es bewegte sich während der Betrachtung kaum, sondern lag die meiste Zeit regungslos an der selben Stelle im Käfig. Dennoch traten viele Artefakte im EEG-Signal auf, die die Auswertung zum Teil erschwerten.

3.2.1 Baseline-Phase

Auf Abbildung 13 ist die Anzahl der aufgetretenen Spikes pro Stunde des zweiten Tieres im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase dargestellt.



- 9

Abb. 13: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.

Die Spikes waren gleichmäßig über den untersuchten Zeitraum verteilt. Insgesamt traten tagsüber mehr Spikes auf als während der Nacht (\bar{x} Tag = 72,2; \bar{x} Nacht = 52,0), wobei erneut zu beachten ist, dass ein Zeitraum von 24 Stunden keine allgemeine Aussage über die Tag-Nacht-Verteilung epilepsietypischer Potenziale erlaubt. Die geringe Anzahl von Spikes in der Stunde 14 des untersuchten Tages kommt ebenso wie bei Tier 1 durch eine etwa 40-minütige Unterbrechung der EEG-Aufzeichnung für den Start eines neuen Datensatzes zustande.

3.2.2 Beginn der Behandlung

Abbildung 14 zeigt die zeitliche Verteilung der Spikes des zweiten Tieres zu Behandlungsbeginn.

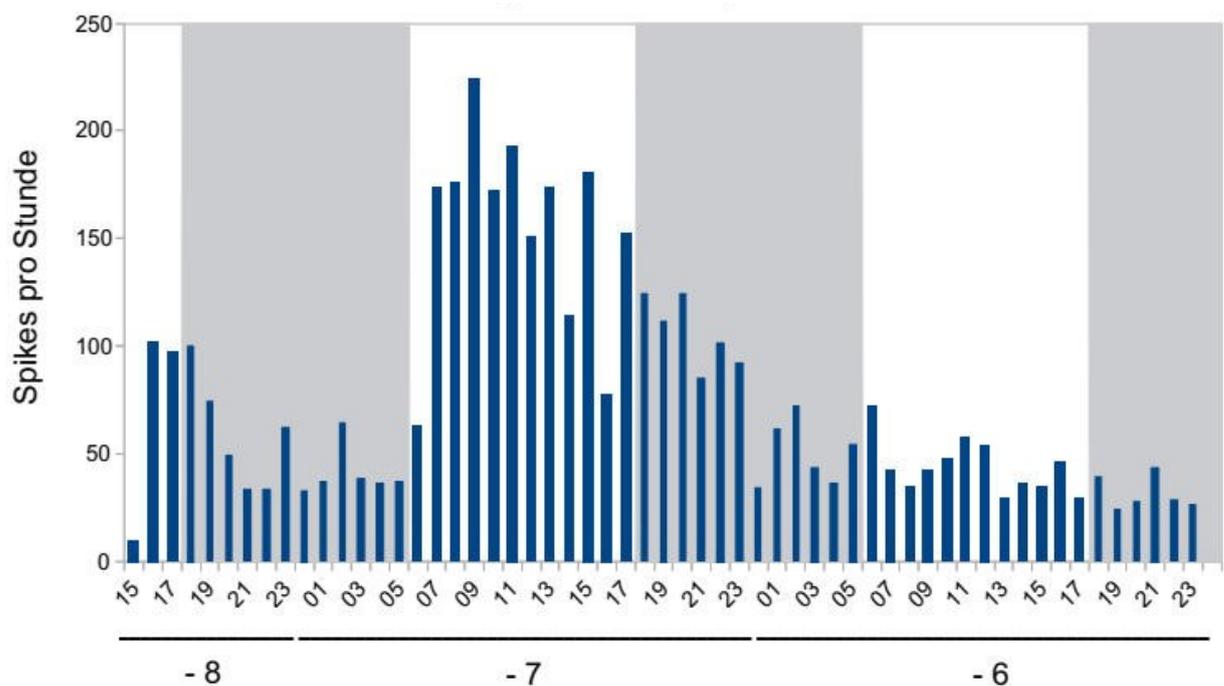


Abb. 14: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.

Der Median der Spikes des zweiten Tieres lag bei 55. Die Anzahl dieser schwankte stark über den beobachteten Zeitraum. Am ersten untersuchten Tag nach Behandlungsbeginn (- 8) und der darauffolgenden Nacht traten im Mittel $\bar{x} = 55$ Spikes auf. Am Morgen des nächsten Tages kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Spikerate, die ihren Höhepunkt mit 224 Spikes pro Stunde ab 9 Uhr hatte. Danach nahm die Häufigkeit über den Tag kontinuierlich ab. Am letzten untersuchten Tag (- 6) betrug der Mittelwert \bar{x} der aufgetretenen Spikes pro Stunde 43. Auch bei diesem Tier traten tagsüber mehr Spikes auf als nachts (\bar{x} Tag = 95,9; \bar{x} Nacht = 58,3), der Unterschied war in diesem Falle deutlich.

3.2.3 präfinaler Zeitraum

Auf Abbildung 15 ist die Anzahl der interiktalen Spikes des zweiten Tieres im zeitlichen Verlauf während des präfinalen Zeitraums abgetragen.

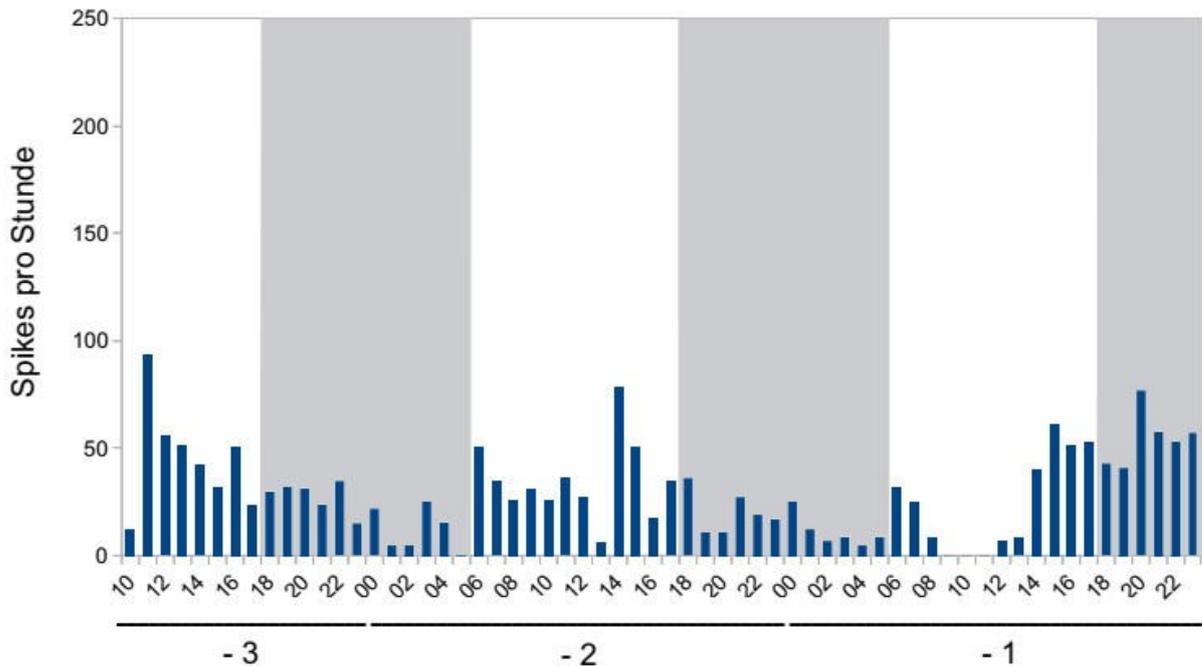


Abb. 15: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.

In der präfinalen Phase betrug der Median der Spikes 26,5. Insgesamt waren die epilepsietypischen Potenziale annähernd gleichmäßig über den beobachteten Zeitraum verteilt, auch zwischen dem Auftreten der Spikes tagsüber und nachts gab es nur geringfügige Unterschiede (\bar{x} Tag = 33,5; \bar{x} Nacht = 25,8). Auffällig sind einige unregelmäßig verteilte Stunden, in denen keinerlei Spikes aufgetreten sind, beispielsweise am Morgen des letzten untersuchten Tages (-1).

Auch bei Tier 2 wurde festgestellt, dass mit der Dauer der Behandlung die Spikerate insgesamt abnahm: der errechnete Median betrug während der Baseline-Phase 69 und war damit um den Faktor 2,6 größer als in der präfinalen Phase.

3.3 Tier 3

Abbildung 16 zeigt die Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde sowie die Verteilung bzw. Streuung der Daten für das dritte und letzte behandelte Tier in der Baseline-Phase, zu Beginn der Behandlung und im präfinalen Zeitraum.

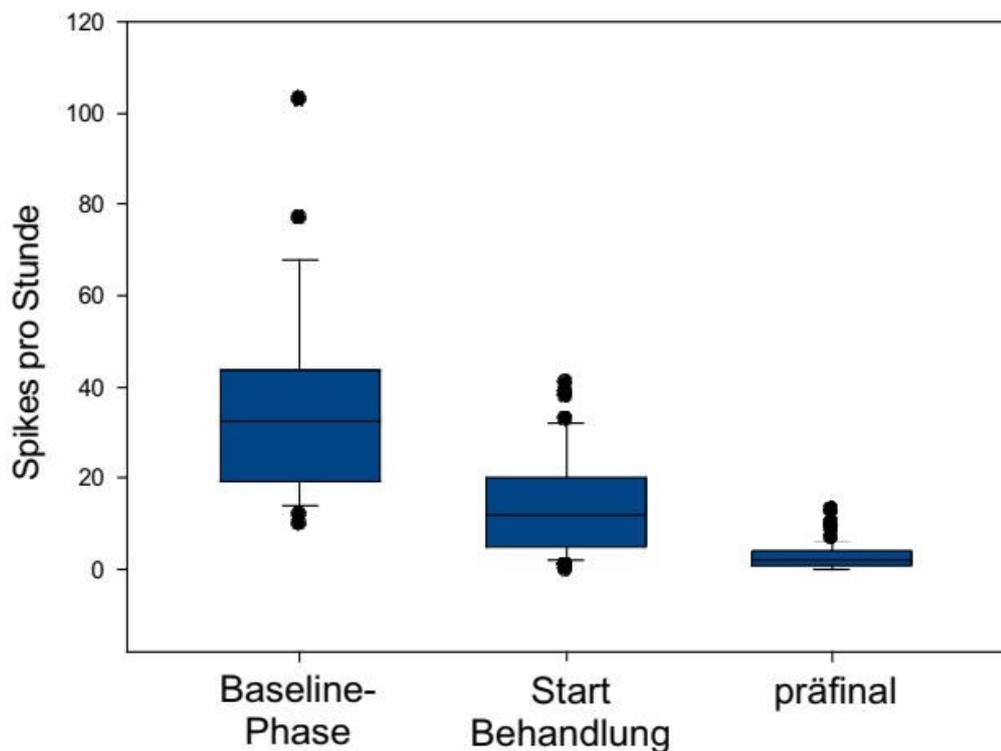


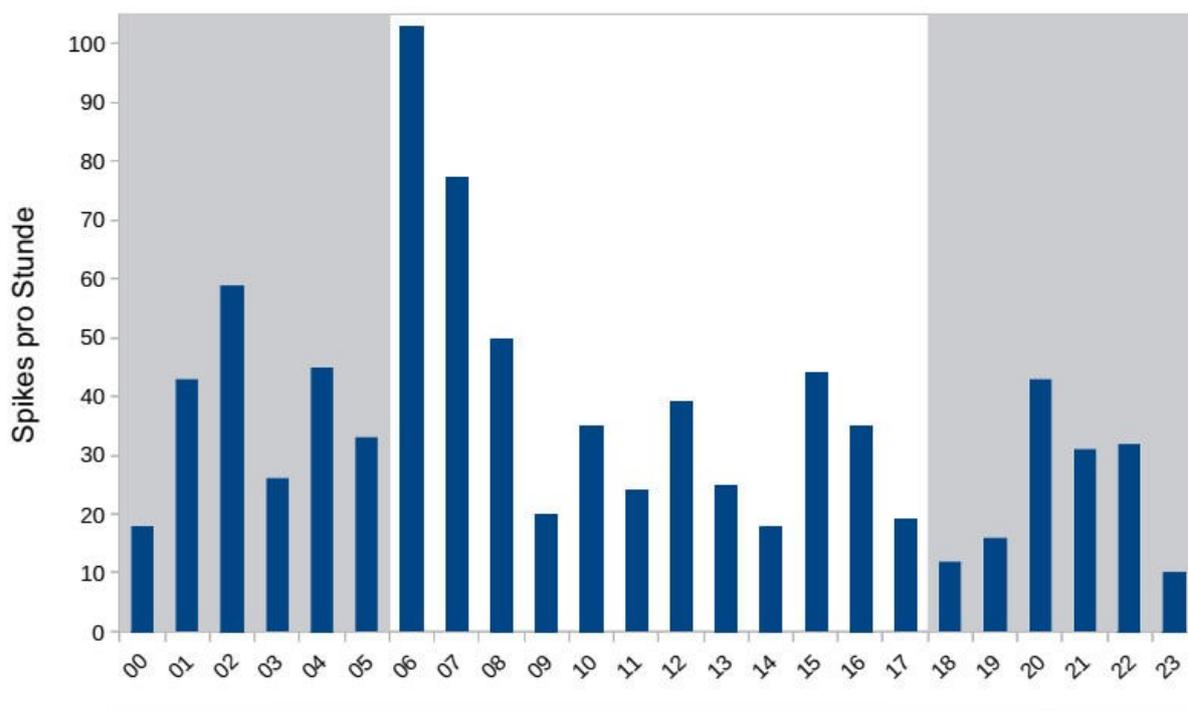
Abb. 16: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 in der Baseline-Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum.

Auch bei diesem Tier nahm der errechnete Median der aufgetretenen Spikes mit Voranschreiten der Behandlung ab: in der Baseline-Phase bezifferte er sich auf 32,5, sank zum Start der Therapie auf 12 und im präfinalen Zeitraum auf 2. Dieses Tier erlitt insgesamt im Vergleich mit den anderen behandelten Tieren also die mit Abstand wenigsten epilepsietypischen Potenziale.

Bei der Betrachtung des individuellen Verhaltens des dritten Tieres ließen sich keine besonderen Auffälligkeiten feststellen, es zeichnete sich weder durch intensive noch fehlende Aktivität aus, wobei erneut auf die technischen Bedingungen mit eingeschränkter Video-Beobachtungsdauer von 12 Stunden verwiesen werden muss.

3.3.1 Baseline-Phase

Abbildung 17 veranschaulicht die Anzahl der aufgetreten Spikes des dritten behandelten Tieres im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.



- 14

Abb. 17: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.

In den betrachteten 24 Stunden traten die Spikes unregelmäßig verteilt auf. Besonders in den frühen Morgenstunden kurz nach dem Anschalten des Lichtes zeigten sich mit 103 bzw. 77 Spikes die höchste Spikeraten. Erneut wurde tagsüber eine höhere Anzahl an Spikes verzeichnet als während der Nacht (\bar{x} Tag = 40,8, \bar{x} Nacht = 30,7).

3.3.2 Beginn der Behandlung

Auf Abbildung 18 ist die Anzahl der Spikes des dritten Tieres zu Behandlungsbeginn im zeitlichen Verlauf dargestellt.

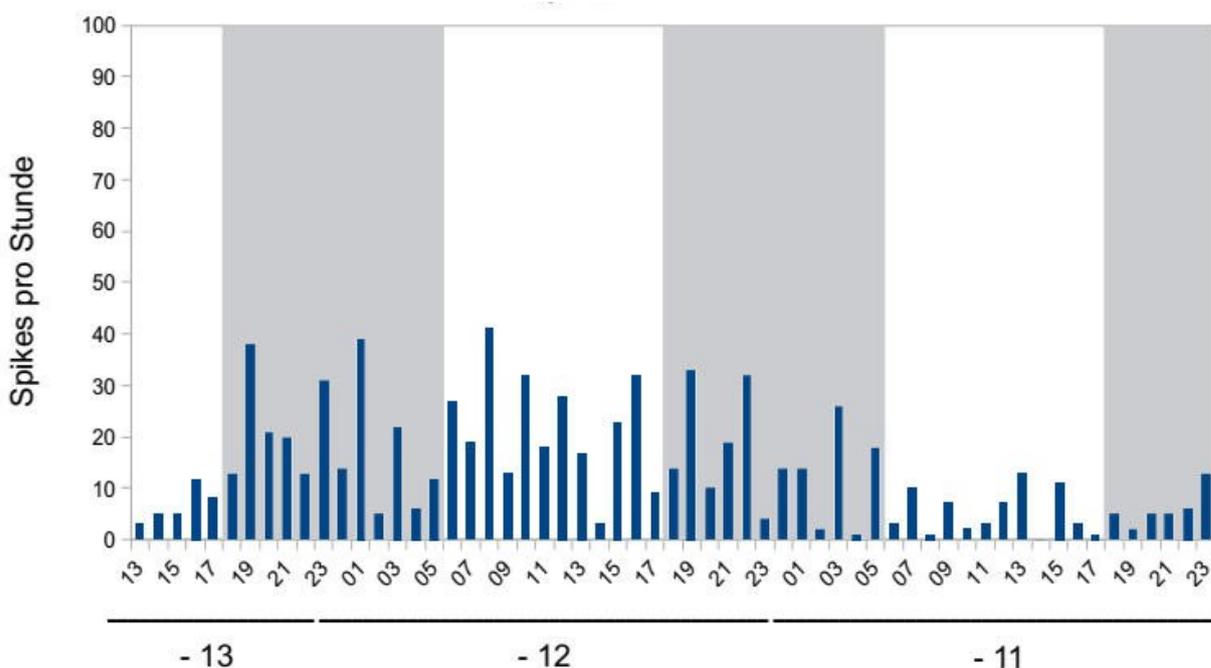


Abb. 18: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.

Zu Behandlungsbeginn betrug der Median der Anzahl der Spikes des dritten Tieres 12. Es lag eine ungleichmäßige Verteilung der wenigen aufgetretenen Spikes vor, insbesondere am

letzten betrachteten Tag (- 11) erlitt das Versuchstier weniger Spikes ($\bar{x} = 7,2$) als im Zeitraum davor ($\bar{x} = 18,3$).

Im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Tieren zeigte dieses während der Nacht mehr Spikes als tagsüber (\bar{x} Tag = 12,3; \bar{x} Nacht = 15,2).

3.3.3 präfinaler Zeitraum

Abbildung 19 zeigt die Anzahl und zeitliche Verteilung der Spikes des dritten Tieres im präfinalen Zeitraum.

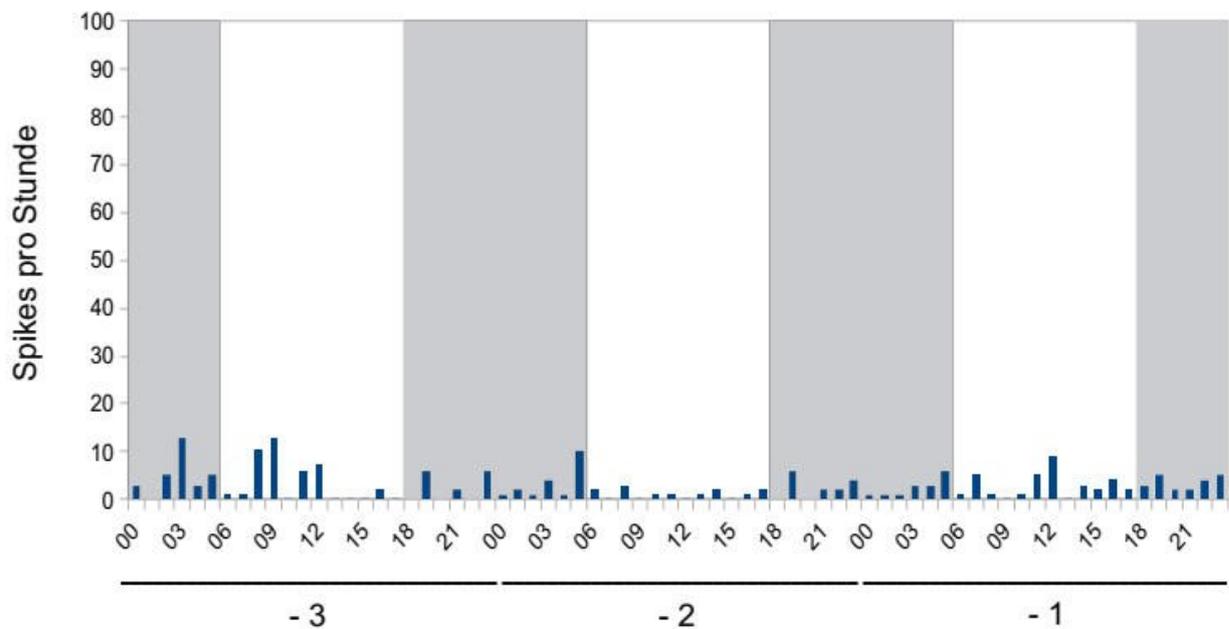


Abb. 19: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.

Im Median traten bei Tier 3 im präfinalen Zeitraum noch zwei Spikes auf. Die wenigen epilepsietypischen Potenziale waren relativ gleichmäßig über die untersuchte Zeitspanne verteilt. In über der Hälfte der betrachteten Stunden traten nur zwei oder weniger Spikes auf, auch Abschnitte komplett ohne Spikes wurden beobachtet.

Wie schon bei den vorherigen behandelten Tieren, traten auch bei Tier 3 mit Voranschreiten der Therapie weniger Spikes auf, wobei die Abnahme in diesem Fall am deutlichsten war: der errechnete Median der Spikes lag während der Baseline-Phase noch bei 32,5, war also um den Faktor 16,25 größer als im präfinalen Zeitraum.

3.4 Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren

3.4.1 Veränderung der Spikerate von der Baseline-Phase zum präfinalen Zeitraum

Um eine aussagekräftigere Angabe zur Wirksamkeit der Behandlung mit Perampanel machen zu können, wurden die Daten der drei behandelten Tiere mit den Ergebnissen aus dem präfinalen Zeitraum der Tiere 4 bis 7 verglichen, die keinerlei Behandlung erhalten hatten. Diese Daten wurden im Rahmen früherer Dissertationen erhoben (Tier 5 aus der Dissertation von Liebelt, Tiere 4, 6 und 7 aus der Dissertation von Boisserée, erweiterte Untersuchung durch Liebelt).

Auf Abbildung 20 sind die errechneten Medianwerte der Anzahl der Spikes pro Stunde im präfinalen Zeitraum dargestellt. Es erfolgte eine Gegenüberstellung der behandelten Tiere 1 bis 3 mit den unbehandelten Tieren 4 bis 7.

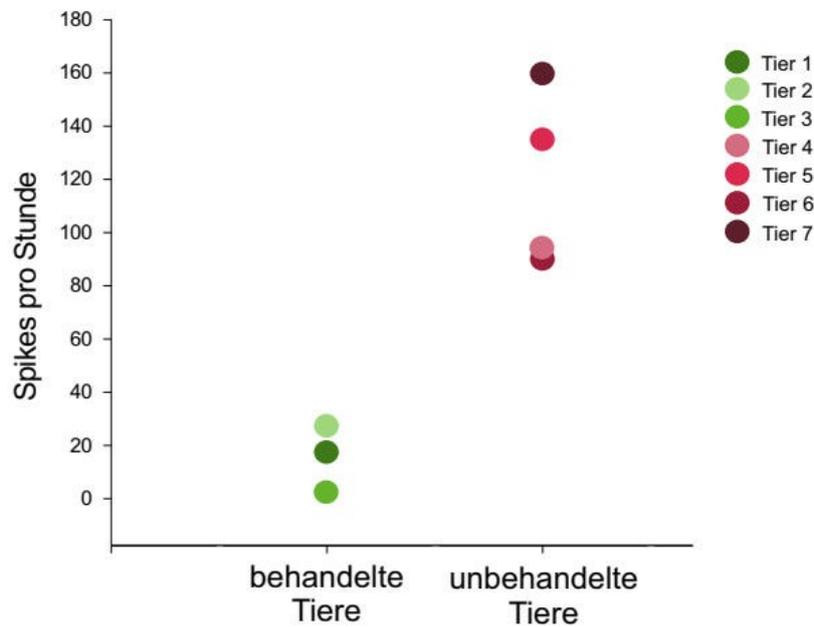


Abb. 20: Medianwerte der Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 im präfinalen Zeitraum.

Die Medianwerte sind als farbige Punkte abgetragen, wobei die verschiedenen Grüntöne für die behandelten Tiere 1 bis 3 und die Rottöne für die unbehandelten Tiere 4 bis 7 stehen. Die Betrachtung der absoluten Werte im präfinalen Zeitraum zeigt, dass die behandelten Tiere wesentlich geringere Medianwerte der aufgetretenen Spikes aufwiesen (zwischen 2 und 26,5) als die unbehandelten mit Medianwerten im Bereich zwischen 90 und 159.

Eine noch aussagekräftigere Darstellung ist die der Veränderung der Medianwerte der interiktalen Spikes pro Stunde zwischen der Baseline-Phase und dem präfinalen Zeitraum für jedes einzelne Tier. Dadurch kann der Anstieg bzw. Abfall der Spikerate beurteilt werden, Abbildung 21 zeigt diese Veränderungen.

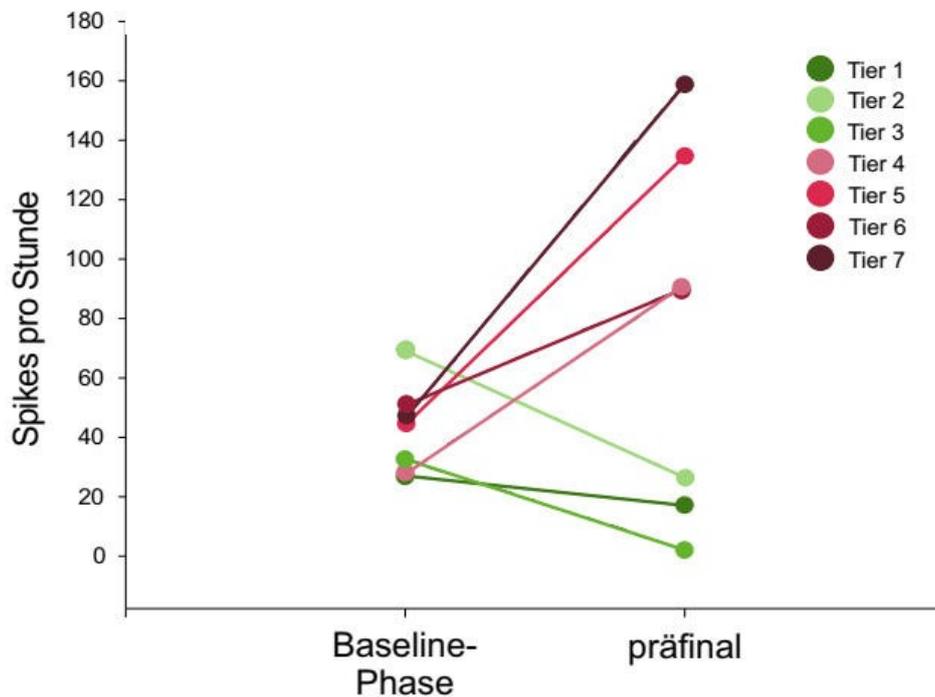


Abb. 21: Medianwerte der interiktalen Spikes je Stunde der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 während der Baseline-Phase und im präfinalen Zeitraum.

Auch hier stellen die farbigen Punkte die Medianwerte der aufgetretenen Spikes pro Stunde für jedes Tier dar, sowohl in der Baseline-Phase als auch im präfinalen Zeitraum, jeweils verbunden durch eine Linie. Es wird deutlich, dass die drei Linien in verschiedenen Grüntönen, also die der mit Perampanel behandelten Tiere, abfallen. Das bedeutet, dass es bei diesen Tieren im Median zu einer Abnahme der Spikerate kam, im präfinalen Zeitraum traten weniger interiktale Spikes pro Stunde auf als während der Baseline-Phase. Im Gegensatz dazu zeigen die Linien in Rottönen (unbehandelte Tiere) einen zum Teil steilen Anstieg, insbesondere bei Tier 7. Es sind also im präfinalen Zeitraum mehr Spikes beobachtet worden, die Spikerate nahm im Median mit fortschreitender Untersuchungsdauer zu.

Zusammengefasst traten bei den behandelten Tieren im Median präfinal weniger Spikes auf als während der Baseline-Phase, die unbehandelten Tiere erlitten dagegen mit voranschreitendem Krankheitsverlauf häufiger Spikes.

Abbildung 22 gibt einen Überblick über die Anzahl und Verteilung der aufgetretenen Spikes aller untersuchten Tiere nebeneinander im präfinalen Zeitraum.

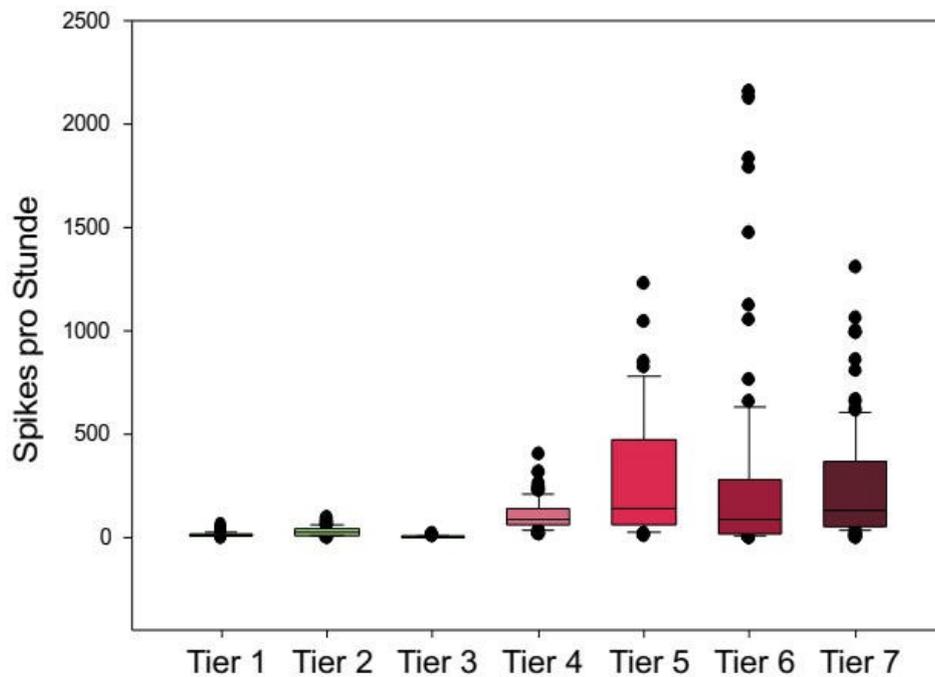


Abb. 22: Überblick über Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde aller untersuchten Tiere im präfinalen Zeitraum.

Auch diese Abbildung verdeutlicht, dass bei den unbehandelten Tieren 4 bis 7 präfinal mehr Spikes pro Stunde aufgetreten sind. Auffällig ist die weite Streuung der Werte, insbesondere bei den Tieren 5 bis 7. Bei Tier 6 schwankte die Anzahl der beobachteten Spikes pro Stunde im präfinalen Zeitraum zwischen 0 und 2158.

3.4.2 Lebensdauer

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, um die Effektivität der Hirntumorbehandlung mit Perampanel zu evaluieren, war die Lebensdauer der Tiere. Ein eventuell verlängertes Überleben nach der Operation zur Elektroden- und Gliomzellimplantation erlaubte Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Therapie.

Abbildung 23 zeigt die Lebensdauer nach der OP in Tagen, wobei erneut behandelte und unbehandelte Tiere miteinander verglichen wurden.

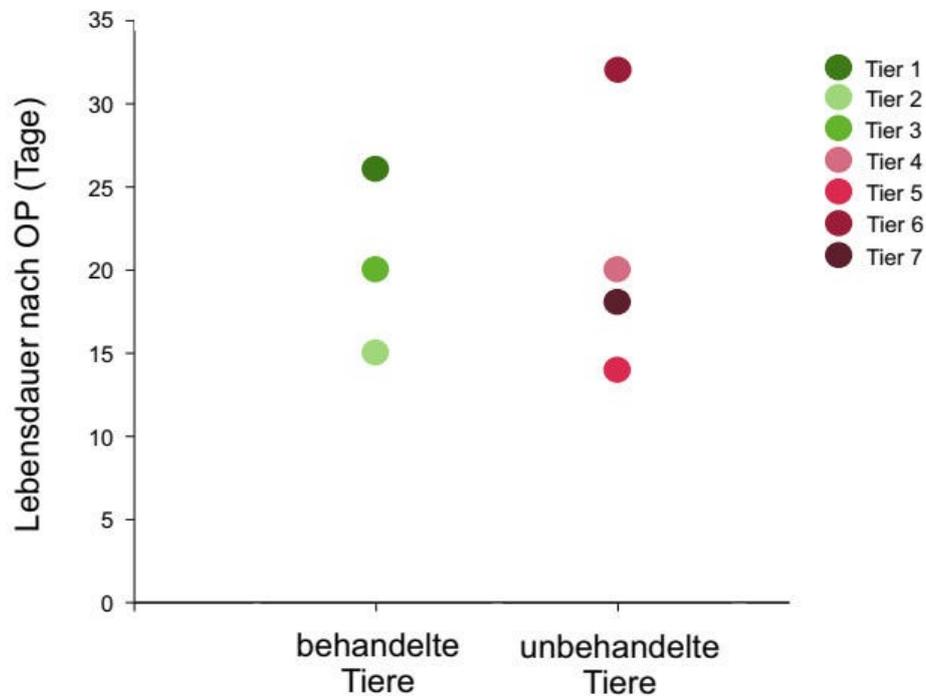


Abb. 23: Lebensdauer der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 in Tagen

Die Abbildung zeigt die inhomogene Verteilung der Lebensdauer der Versuchstiere. Am längsten lebte das unbehandelte Tier 6 mit 32 Tagen nach der OP, die weiteren unbehandelten Tiere überlebten maximal 20 Tage. Zwei der Tiere, die eine Behandlung erhalten hatten, überlebten 20 Tage oder länger. Das kürzeste Überleben, einen Zeitraum von

nur 14 Tagen nach der Operation, wies das unbehandelte Tier 5 auf. Tier 2 überlebte trotz Behandlung nur 15 Tage nach der Operation, fiel jedoch wie bereits beschrieben durch sein apathisches und weitgehend inaktives Verhalten während des gesamten Beobachtungszeitraumes auf.

Insgesamt zeigt die Grafik eine homogenere Verteilung der Lebensdauer bei den behandelten Tieren verglichen mit den unbehandelten.

3.5 Klinische EEGs

Bei der Betrachtung der EEGs von Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurologie Rostock lag das Augenmerk ebenfalls auf der Anzahl der epilepsietypischen Potenziale pro Minute. Neben den interiktalen Spikes wurden die Phasenumkehrungen gezählt. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Tab. 3: Anzahl der epilepsietypischen Potenziale in klinischen EEGs. Die Auswertung des EEGs von Patient 08 war aufgrund der klinischen Gegebenheiten erschwert.

Patient	Phasenumkehrungen pro Minute	Spikes pro Minute	Diagnose	OP-Lokalisation
04	2,25	0,50	GBM	links zentral
06	0,65	0,20	GBM	rechts frontal
08*	0,05	0,05	GBM	links temporal
15	-	-	GBM	-
19	1,10	0,10	GBM	rechts temporal
23	0,88	0,47	GBM	rechts frontal
11	0,89	0,72	Metastasen Bronchialkarzinom	rechts parietal und links temporal
14	0,69	0,44	Metastase Colonkarzinom	rechts frontal

Aus technischen Gründen war die Auswertung der EEG-Daten von Patient 15 nicht möglich. Die Untersuchung des EEGs des Patienten 08 war erschwert, da der Patient einen verlangsamten Grundrhythmus von ca. 8 Hz aufwies und im EEG-Signal sehr viele θ -Wellen auftraten. Daher ist die geringe Anzahl an Spikes und Phasenumkehrungen pro Minute bei diesem Patienten nicht repräsentativ.

Insgesamt traten bei allen Patienten im Verhältnis mehr Phasenumkehrungen, also die Darstellung der größten Elektronegativität zwischen zwei benachbarten Elektroden, als Spikes pro Minute auf.

Die Lokalisation der epilepsietypischen Potenziale im EEG korrelierte zum Teil mit der Lokalisation der pathologischen Läsionen, d. h. dem Glioblastoma multiforme oder den Metastasen (in Tabelle 3 angegeben als OP-Lokalisation). So erlaubte das EEG-Signal bei einigen Patienten Rückschlüsse auf das zu erwartende Ergebnis bildgebender Verfahren, da die Position der Phasenumkehrungen in den Ableitungen räumlich mit der Lage des Tumors bzw. der Metastase im Gehirn übereinstimmt. Abbildung 24 zeigt die Bildschirmansicht von Neuroworks, es handelt sich um einen Ausschnitt von etwa 7 Sekunden aus dem EEG des Patienten 04. Die beobachteten Phasenumkehrungen wurden markiert.

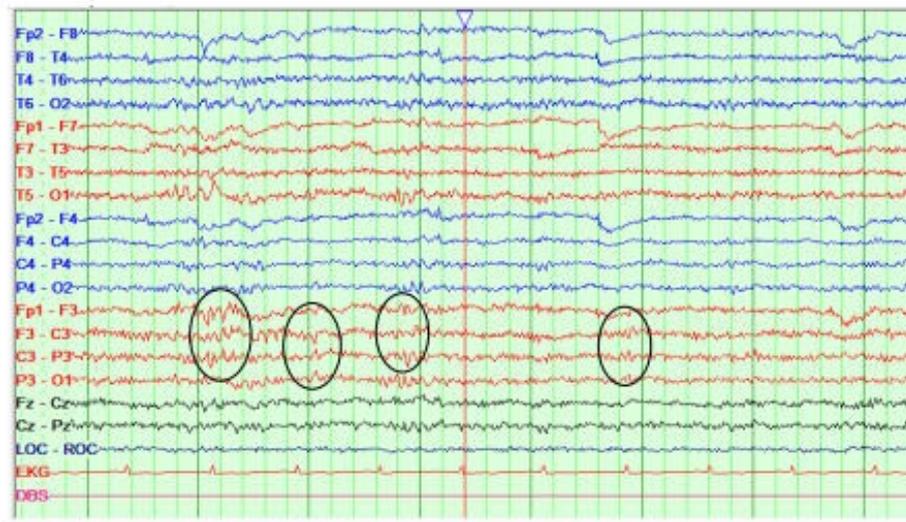


Abb. 24: Ausschnitt aus dem EEG des Patienten 04. Die schwarzen Ellipsen markieren aufgetretene Phasenumkehrungen.

Bei diesem Patienten traten die meisten Phasenumkehrungen im Bereich der nach dem 10-20-System zentral auf der linken Kopfseite gelegenen Elektrode C3 auf, wobei enge und weite Phasenumkehrungen beobachtet werden konnten. Teilweise traten gleichzeitig zu den Phasenumkehrungen Spikes an den benachbarten Ableitungen (z.B. F7-T3) auf. Die Lokalisation der epilepsietypischen Potenziale im Cortex stimmte also im Wesentlichen mit der Lage des Glioblastoms im Hirn überein.

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Gliom-Modell

Kirschstein & Köhling (2016) konstatierten, dass viele Aspekte der Tumor-assoziierten Epilepsie noch nicht erfasst worden sind und es experimentelle Modelle braucht, um alle Mechanismen dahinter erforschen und die je nach Tumorart vielversprechendste Behandlungsmöglichkeit bestimmen zu können. Dabei handelt es sich meist um Gliom- bzw. Glioblastom-Modelle.

Ein solches Gliom-Modell wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Tiere zu untersuchen, die unter Tumor-assoziiertes Epilepsie durch ein Glioblastoma multiforme litten, und zu analysieren, ob eine Therapie mit Perampanel das Auftreten epileptiformer Potenziale reduziert. Laut Senner et al. (2004) würde sich ein ideales Modell zur Untersuchung der Gliom-assoziierten Epileptogenese durch die folgenden Eigenschaften auszeichnen: erstens ein den menschlichen Gliomen sehr ähnliches histologisches Erscheinungsbild, inklusive umfassender Interaktion zwischen Tumorzellen und Glia. Zweitens wäre eine elektrophysiologische Abbildung des Ursprungs und der lokalen Ausbreitung der ictalen Aktivität möglich und drittens erfolgte nach der elektrophysiologischen Untersuchung eine histopathologische Analyse des Gewebes, um Zusammenhänge zwischen elektrophysiologischen und morphologischen bzw. molekularen Abweichungen zu eruieren. Die von Senner et al. (2004) beschriebenen Kriterien wurden in der vorliegenden Arbeit genutzten Gliom-Modell folgendermaßen berücksichtigt: um ein histologisch ähnliches Gliom mit entsprechendem Verhalten im Gewebe zu gewinnen, wurden wie von Kirschstein & Köhling (2016) beschrieben in einer stereotaktischen Operation Tumorzellen als Suspension in das Gehirn injiziert. Dadurch kam es innerhalb von 7 bis 15 Tagen zu einem Tumorwachstum auf 1 bis 2 mm Durchmesser. Senner et al. (2004) selbst stellten ebenfalls fest, dass die Injektion von Gliomzellen in den Neocortex in einigen Fällen

zum Wachstum eines Tumors im Hirn der Ratte führte. Wie bereits in Kapitel 1.4 geschildert, führte die Injektion der Zellen in den Neocortex zu Auffälligkeiten im EEG, epileptischen Anfällen und in vitro Übererregbarkeit (Köhling et al. 2006; Buckingham et al. 2011; Tönjes et al. 2013).

Das zweite von Senner et al. (2004) benannte Kriterium wurde durch die telemetrische Video-EEG-Überwachung der Tiere erfüllt. Die epilepsietypischen Potenziale wurden abgebildet und die Betrachtung des Videos erlaubte Rückschlüsse zum Zusammenhang zwischen dem EEG-Signal und dem Verhalten des Tieres.

Das F98-Ratten-Gliom-Modell ist etabliert, in seiner Dissertation wies Boisserée nach, dass ein durch die Injektion von F98-Zellen induziertes höhergradiges Gliom im Auftreten von epileptiformen Potenzialen und epileptischen Anfällen resultiert. Das Modell wurde ebenfalls in der Dissertation von Liebelt genutzt und erfolgreich angewendet.

4.1.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an Fischer-Ratten durchgeführt. Am Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der Universität Rostock sind bereits öfter Ratten für die Epilepsieforschung genutzt worden (Bajorat et al. 2011, 2016, 2018; Schulze et al. 2020). Köhling et al. (2006) und Mayer et al. (2020) beschrieben in ihren Ausführungen die Kultivierung der Gliomzellen und deren Injektion in das Hirn der Versuchstiere und somit die Verwendung von Ratten für ein Modell der Untersuchung der Gliom-assoziierten Epilepsie.

Bei der Auswahl der Ratten stellte sich die Frage, ob die injizierten Gliomzellen im Hirngewebe der Tiere einwachsen können und es zur Entwicklung eines Tumors kommt. Dabei gibt es nicht triviale Unterschiede zwischen den einzelnen Subspezies wie die individuelle Immunantwort der Tiere. So betrachteten Sandmeyer et al. (2008) in ihren Analysen jeweils verschiedene Gliomzell-Typen unter Verwendung verschiedener Unterarten: F98-Zellen wurden in Fischer-Ratten, C6-Zellen in Wistar-Ratten genutzt.

Für die Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit drei mit Perampanel behandelte Tiere in drei verschiedenen Zeiträumen untersucht, zum Vergleich wurden die im Rahmen vorheriger Dissertationen erhobenen Daten vierer unbehandelter Tiere aus zwei unterschiedlichen Zeiträumen gegenübergestellt. Somit ergab sich eine in der Neurophysiologie allgemein übliche und statistisch sinnvolle Anzahl an Stichproben, auch wenn durch die geringe Zahl an Versuchstieren die Ergebnisse lediglich beschränkt beurteilbar waren.

4.1.3 Auswertung der EEG-Daten

Voraussetzung für die Datenauswertung war die Bestimmung zweckmäßiger Zeiträume für die Analyse. Diese Zeiträume wurden für alle untersuchten Tiere gleich definiert, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Wie in Kapitel 2.1 bereits beschrieben, wurden die mit Perampanel behandelten Tiere 1 bis 3 in drei unterschiedlichen Zeiträumen (Baseline-Phase, Behandlungsbeginn, präfinal) untersucht, die im Rahmen vorheriger Dissertationen erhobenen Daten aus Baseline-Phase und präfinalem Zeitraum der unbehandelten Tiere 4 bis 7 wurden gegenübergestellt.

Dabei begann die Baseline-Phase frühestens zwölf Stunden nach der stereotaktischen Operation zur Gliomzellimplantation und dauerte bis zum Start der individuellen Therapie an.

Als präfinaler Zeitraum wurden die vier Tage vor dem Ende der Untersuchungen, also dem Tod des Versuchstieres, bezeichnet. Dieser wurde eingeleitet, wenn sich der Zustand stark verschlechterte und das Tier nach festgelegten Gesichtspunkten moribund war (vgl. Kapitel 2.1). Auch wenn der präfinale Zeitraum je nach Lebensdauer nach der Operation bei den Tieren zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten begann, war durch die fixen Kriterien für den moribunden Zustand und die Orientierung am Todestag für den Beginn der Betrachtung gewährleistet, dass die Tiere während der Analysen miteinander verglichen werden konnten.

Die festgelegten Zeiträume und definierten Kriterien für das Vorliegen epilepsietypischer Potenziale (z. B. das Verhältnis zur Grundaktivität, beschrieben in Kapitel 2.5.2) ermöglichten eine sorgfältige Datenauswertung. Dennoch hat die verwendete manuelle EEG-Analyse die Präzision betreffend Grenzen, da mit den festgelegten Charakteristika zwar die Abgrenzung von Artefakten, verursacht durch die Elektroden oder die Muskulatur, möglich war, jedoch keine absolute Definition getroffen werden konnte. So ist beispielsweise die für die Definition in Betracht gezogene Grundaktivität sowohl für jedes einzelne Tier individuell als auch innerhalb des untersuchten Zeitraumes veränderlich. Hilfreich war die neben der Betrachtung der EEG-Spur erfolgte Analyse der Videoaufnahmen der Tiere, welche aufgrund der Beleuchtung zwischen ca. 6 und 18 Uhr möglich war. Es kam mehrmals vor, dass aufgrund des Musters im EEG-Signal ein interiktaler Spike oder gar epileptischer Anfall vermutet wurde, dieser sich jedoch mit der Betrachtung des Videos aufgrund des beobachteten Verhaltens des Tieres als Artefakt erwies.

Insgesamt ist die manuelle EEG-Analyse anfällig für eine subjektive Beurteilung und Fehler (Sharanreddy & Kulkarni 2013), welche minimiert wurden, indem alle Auswertungen von der selben Person durchgeführt worden sind.

4.2 Auftreten interiktaler Spikes in der Baseline-Phase bei allen Tieren

Auch wenn die Versuchstiere während der Experimente unterschiedlich behandelt wurden, sie also entweder keinerlei Therapie oder Perampanel erhielten, wiesen während der Baseline-Phase alle Tiere übereinstimmend eine Gemeinsamkeit auf: sie litten an interiktalen Spikes (IEDs). Daraus ergibt sich, dass im Zeitraum zwölf Stunden nach der Operation zur Elektroden- und Gliomzell-Implantation bis zum Start der Behandlung sieben Tage später epileptiforme Potenziale auftraten, die weder mit der Therapie zusammenhingen, noch von den injizierten F98-Zellen ausgelöst werden konnten, da diese laut Buckingham et al. (2011) erst nach 14 bis 18 Tagen spontane Abweichungen im EEG verursachen. Den aufgetretenen Spikes lagen folglich andere Mechanismen zugrunde.

Einige Studien kamen bereits zu dem Ergebnis, dass keine Verbindung zwischen der Anzahl der registrierten Spikes und den klinischen Charakteristika der Epilepsie hergestellt werden kann (Selvitelli et al. 2010). Folglich kann es auch unter anderen Umständen zum Auftreten solcher Spikes kommen:

Vezzani et al. (2016) konstatierten, dass Infektionen im ZNS einen bedeutenden Aspekt bei der Entstehung von Anfällen und Epilepsie darstellen. Auch Neurotraumata oder ein Schlaganfall können durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die nachfolgende Entzündungsreaktion zu akuten Anfällen mit erhöhtem Risiko der Ausprägung einer Epilepsie einhergehen (Vezzani et al. 2011). Mit den traumatisch und durch Infektionen hervorgerufenen Anfällen setzten sich auch Weissberg et al. (2015) auseinander. Die Autoren nutzten den Begriff PIE (Epilepsie nach Verletzungen, engl.: post injury epilepsy) für die Beschreibung des nach Monaten oder sogar Jahren der Latenz auftretenden Phänomens. Dabei spielt die verletzungsbedingte Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine Schlüsselrolle (Weissberg et al. 2015). Auch das Albumin aus dem Blutserum, welches durch Gefäßverletzungen während der Operation freigesetzt worden ist, kann durch Aktivierung des TGF- β -Signalwegs in den Astrozyten den Autoren zufolge zum Auftreten epileptischer Anfälle führen. In ihren Untersuchungen wurde Mäusen über einen Zeitraum von sieben Tagen Albumin über eine osmotische Pumpe infundiert, um eine Fehlfunktion der Blut-Hirn-Schranke zu simulieren. Dies führte nach einer Latenzzeit von 72 Stunden zum Aufkommen

rezidivierender epileptischer Anfälle, die auch nach Entfernung der osmotischen Pumpe fort dauerten.

Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Friedman et al. (2009), sie fassten verschiedene Tierexperimente zu der Aussage zusammen, dass eine gestörte Funktion der BHS mit einer erhöhten Tendenz, Anfälle zu erleiden und Epilepsie zu entwickeln, assoziiert ist. Außerdem legten sie dar, dass ultrastrukturelle Untersuchungen von Hirngewebe epilepsiekranker Patienten Abnormalitäten in der BHS, beispielsweise eine geringere Anzahl von Mitochondrien in den Endothelzellen oder eine verdickte Basalmembran, vorweisen (Friedman et al. 2009).

Auch andere Faktoren können einen Einfluss auf das Auftreten interiktaler Spikes während der Baseline-Phase der Tiere haben. In ihren Untersuchungen beschäftigten sich Zhao und Wang (2014) mit dem Einfluss von Anästhesie auf die Epilepsie und kamen zu dem Schluss, dass epileptische Anfälle während dieser vorkommen können. Maranhão et al. (2011) beschrieben detailliert die Effekte verschiedener in der Anästhesie eingesetzter Medikamente und deren Wirkung in Bezug auf das Auftreten von epileptischen Anfällen. Den Autoren zufolge weisen zum Beispiel Midazolam und Barbiturate eine antikonvulsive Wirkung auf und können entsprechend sicher bei der Narkotisierung, auch von Epilepsiepatienten, eingesetzt werden. Andere Mittel dagegen zeigen unerwünschte, prokonvulsive Effekte. Maranhão et al. (2011) benennen hier unter anderem den kompetitiven Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil, der zur Narkosebeendigung eingesetzt wird und Etomidat, das zur Narkoseeinleitung genutzt wird und zwar hochdosiert antikonvulsiv, in üblichen klinischen Dosen eingesetzt jedoch gegenteilig wirkt. Auch das häufig im Rahmen der Anästhesie verwendete Ketamin, welches auch für die Narkose unserer Versuchstiere genutzt wurde, zeigt zwar in einigen Studien in Kombination mit GABAerg wirkenden Mitteln wie Benzodiazepinen und Propofol antikonvulsive Effekte, weist klinisch in üblichen Dosen eingesetzt jedoch ein signifikant epileptogenes Potenzial auf (Maranhão et al. 2011).

Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die in der Baseline-Phase aufgetretenen Spikes mit der Operation in Zusammenhang stehen. Dafür spricht zudem die nachlassende Zahl der interiktalen Spikes im zeitlichen Verlauf der Baseline-Phase, die bei den Tieren 1 und 3 beobachtet werden konnte. Das Versuchstier 2 zeigte währenddessen eine relativ gleichmäßige Verteilung der Potenziale, im Median ließen die registrierten Spikes über den gesamten betrachteten Zeitraum zwar nach. Allerdings wiesen die Werte eine hohe Streuung auf, insbesondere nach Beginn der Therapie. Dieser Aspekt und das insgesamt sehr ruhige bis apathische Verhalten des Tieres deuten darauf hin, dass die Auswirkungen der Operation, wie Gefäßverletzungen mit Austritt von Albumin, einen stärkeren Einfluss hatten als bei den anderen untersuchten Tieren.

4.3 Einfluss der Behandlung mit Perampanel auf die Lebensdauer

Um den Einfluss der Therapie mit dem AMPA-Rezeptor-Antagonisten Perampanel auf die Überlebensdauer zu untersuchen, wurden die so behandelten Versuchstiere 1 bis 3 mit den im Rahmen vorheriger Arbeiten des Physiologie-Instituts gewonnenen Daten der unbehandelten Tiere 4 bis 7 (Boisserée, Liebelt) verglichen.

Zunächst zeigte sich, dass die Überlebenszeit nach der Operation zur Zellimplantation bei den behandelten Tieren 1 bis 3 eine homogenere Verteilung aufwies als bei den unbehandelten. Auch wenn das unbehandelte Tier 6 mit 32 Tagen nach OP die längste Lebensdauer zeigte und das Tier 2 trotz Therapie nur 15 Tage überlebte, bestätigte sich insgesamt das erwartete Ergebnis, eine Lebenszeitverlängerung durch die Gabe von Perampanel. Das kurze Überleben des zweiten Tieres kann, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, auf stärkere Nebenwirkungen durch die OP zurückzuführen sein. Außerdem darf nicht vergessen werden, dass es sich bei den Versuchstieren um Individuen mit unterschiedlicher Grundkondition handelt, die durch die Injektion der F98-Gliomzellen unterschiedlich schwer erkranken und nicht immer gleich auf die Therapie ansprechen. Dieser Aspekt wird auch durch das unvorhergesehen lange Überleben des sechsten Tieres veranschaulicht.

In einer Studie mit nur zwölf Probanden analysierten Izumoto et al. (2018) die Wirkung von Perampanel bei Gliom-Patienten mit unbeherrschbarer Epilepsie. Von diesen Patienten erlangten sechs vollständige Anfallsfreiheit. Zusätzliche Untersuchungen zeigten eine Volumenreduktion des Tumors im MRT nach 6 Monaten bei erhöhtem Perampanel-Spiegel im Plasma (Izumoto et al. 2018).

Dagegen konnten Lange et al. (2020) und Mayer et al. (2020) in ihren in-vivo-Versuchen durch Perampanel keine zusätzlich lebensverlängernde Wirkung und keine Reduktion der Tumorgroße feststellen. Diese Effekte traten ausschließlich durch die Radiochemotherapie auf, wobei die Autoren anmerkten, dass durch die RCT allein bereits eine derart starke Wirkung erzielt wurde, dass keine zusätzlichen Effekte durch das Perampanel wahrgenommen werden konnten (Lange et al. 2020).

Die Gabe von Perampanel resultierte in vitro in einer Hemmung der Proliferation der Gliomzellen, zog, wie in Kapitel 1.3.6 beschrieben, einen geringeren extrazellulären Glutamat-Spiegel nach sich (Lange et al. 2019) und führte in vivo zu einer protektiven Wirkung auf das

gesunde peritumorale Gewebe (Lange et al. 2020), auf welche im Folgenden noch näher eingegangen wird. Davon ausgehend, dass die fortschreitenden Gliome für den Eintritt des moribunden Zustandes der Tiere und damit für die notwendige Dekapitation verantwortlich waren, kann von einer Lebensverlängerung durch die Reduktion der Tumorgroße gesprochen werden.

Das deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: die behandelten Tiere 1 bis 3 überlebten insgesamt etwas länger nach der Operation. Wenn man davon ausgeht, dass Tier 2 und Tier 6 aufgrund der weiter oben beschriebenen Umstände als Ausreißer zu betrachten sind, bleibt die Grenze von 20 Tagen nach der Operation, die die Tiere 1 und 3 im Gegensatz zu den unbehandelten 4, 5 und 7 überlebten. In vorangegangenen Arbeiten (Boisserée, Liebelt) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, allerdings wurden insgesamt zu wenige Tiere untersucht, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

4.4 Einfluss der Behandlung mit Perampanel auf die Lebensqualität

Einen entscheidenden Einfluss auf die Lebensqualität von Gliom-Patienten hat die damit einhergehende Epilepsie. Wie in Kapitel 1.3.1 angegeben, beträgt die Inzidenz speziell beim GBM 30 bis 62% (Kerkhof & Vecht 2013, Armstrong et al. 2016). Diese ist neben neurokognitiven Einschränkungen bei Patienten mit hochgradigen Gliomen und Glioblastomen verbreitet (Lange et al. 2020). Laut Dunn-Pirio et al. (2018) ist die Kontrolle der Anfälle bei Patienten, die an rezidivierenden niedriggradigen Gliomen leiden, der wichtigste Indikator für die Lebensqualität. Dementsprechend ist es wichtig, ein Antikonvulsivum zu finden, welches effektiv ist, ohne mit anderen erforderlichen Therapiemaßnahmen zu interagieren und ohne unerwünschte Nebenwirkungen wie kognitive Einschränkungen mit sich zu bringen (Dunn-Pirio et al. 2018). Auf die gesteigerte Glutamat-Freisetzung aus Gliomzellen (Armstrong et al. 2016; Dunn-Pirio et al. 2018; Fröscher et al. 2014) und das daraus resultierende Krankheitsbild der Epilepsie (Buckingham et al. 2011) wurde bereits in Kapitel 1.3.2 detailliert eingegangen.

Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass im F98-Ratten-Gliom-Modell interiktale Spikes im EEG auftreten. In der Dissertation von Boisserée wurde dieses erstmals beschrieben, in der

Arbeit von Liebelt bestätigt. Auch in anderen Studien des Institutes wurde im Tierversuch medikamentös der Status epilepticus induziert und in Video-EEG-Untersuchungen epileptische Anfälle und interiktale Spikes analysiert, beispielsweise durch Pilocarpin bei Wistar-Ratten (Bajorat et al. 2016). Das Vorhandensein der letzteren im EEG stützen die Epilepsie-Diagnose am meisten (Feyissa & Tatum 2019) bzw. stellen sie das Markenzeichen der Epilepsie dar (Pillai & Sperling 2006, s. Kapitel 1.3.5), weshalb die Anzahl und zeitliche Verteilung der interiktalen Spikes Hauptgegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war.

Zunächst wird die Entwicklung der Spikes der behandelten Tiere betrachtet: bei den Tieren 1 und 3 ließ die Spikerate im Median über die gesamte beobachtete Zeitspanne kontinuierlich nach. Die meisten epilepsietypischen Potenziale traten in der Baseline-Phase auf, zum Start der Perampanel-Gabe waren es weniger und im präfinalen Zeitraum schließlich wurde die geringste Anzahl registriert. Dieser Ablauf entsprach den erwarteten Ergebnissen, allerdings traten nicht bei allen Tieren eine gleiche absolute Anzahl Spikes im gleichen Zeitraum auf (Baseline-Phase: Tier 1 mit 760 Spikes in 24 Stunden, Tier 3 mit 857 Spikes in 24 Stunden; präfinal: Tier 1 im Mittel 292 Spikes in 24 Stunden, Tier 3 im Mittel 66 Spikes in 24 Stunden). Da sich die Versuchstiere individuell unterschieden, ist die Veränderung entscheidend. Bei den besagten Tieren ist der Trend eindeutig, mit zunehmender Therapiedauer nehmen die interiktalen Spikes pro Stunde ab. Auch bei Tier 2 ging die Spikerate über den beobachteten Zeitraum zurück, allerdings wiesen die Werte nach dem Start der Therapie eine starke Streuung auf. Insbesondere in den Morgenstunden des Tages nach Therapiebeginn kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Spikerate, welche bis zum Abend kontinuierlich nachließ. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Definition des Untersuchungszeitraumes: Es wird in der Literatur eine Dauer von 14 bis 18 Tagen nach der Gliomzellinjektion bis zur Entwicklung epilepsietypischer Potenziale angegeben (Buckingham et al. 2011). Da der Start der Medikation und damit der zweite betrachtete Zeitraum bereits sieben Tage nach der Operation zur Zellinjektion lag, waren die aufgetretenen Potenziale auf andere Ursachen zurückzuführen als die spontanen Entladungen durch die Gliom-assoziierte Epilepsie. Die Betrachtung dieses Zeitraumes erfolgte als Erweiterung der Untersuchungen von Boisserée und Liebelt, in welchen die Tiere ausschließlich während der Baseline-Phase und präfinal beobachtet worden sind. Die zusätzlich untersuchte Zeitspanne lieferte jedoch keine signifikanten Erkenntnisse, was zum Einen an der geringen Anzahl der Versuchstiere liegt und zum Anderen auf die zu kurze Zeit, welche seit der Operation vergangen ist, zurückzuführen ist. Zudem sollten auch die in den verschiedenen Zeiträumen auftretenden epileptischen Anfälle hinsichtlich Häufigkeit

und Dauer untersucht werden, auf das Fehlen dieser wird im Folgenden noch eingegangen. Anhand der untersuchten Tiere 1 bis 3 lässt sich zusammenfassend feststellen, dass durch die Behandlung mit Perampanel das Auftreten von interiktalen Spikes signifikant nachließ. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, in denen die antikonvulsive Wirkung des Perampanels bei Gliom-assoziiertes Epilepsie entweder im Ratten-Modell (Lange et al. 2020) oder bei Versuchen an kleinen Patientengruppen (Vecht et al. 2017; Izumoto et al. 2018) nachgewiesen wurde, zum Teil sogar bis hin zur vollständigen Anfallsfreiheit.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die im Rahmen vorheriger Dissertationen erhobenen Daten der Tiere 4 bis 7, die keinerlei Behandlung erhalten hatten, vergleichend gegenüber gestellt.

Betrachtet man die Veränderung der Medianwerte der beobachteten Spikes pro Stunde, zeigt sich ein signifikanter Anstieg der epilepsietypischen Potenziale von der Baseline-Phase zum präfinalen Zeitraum (s. Kapitel 3.4.1, Abbildung 21), während die Werte der Tiere 1 bis 3 abfallen. Dieses Ergebnis veranschaulicht zunächst, wie von Lange et al. (2020) bereits beschrieben, dass durch die Injektion der F98-Zellen im EEG epilepsietypische Potenziale interiktal vorkommen und somit das in der vorliegenden Arbeit genutzte Tiermodell geeignet war. Zudem konnten im Median bei den vier unbehandelten Tieren präfinal wesentlich mehr interiktale Spikes beobachtet werden, als während der Baseline-Phase. Dieses Resultat entspricht der Erkenntnis der Autoren, dass mit fortschreitendem Krankheitsverlauf mehr interiktale Spikes auftreten und diese ein subklinisches Kennzeichen der Epilepsie darstellen.

Im Tierversuch ist eine subjektive Befragung der Probanden zu ihrem kognitiven Zustand und möglichen Nebenwirkungen, wie sie beispielsweise von Vecht et al. (2017) in ihren klinischen Studien durchgeführt wurde, nicht möglich. Dennoch lässt sich durch die lebensverlängernde Wirkung, also das spätere Erreichen des moribunden Zustandes der behandelten Tiere, und die Abnahme der auftretenden epilepsietypischen Potenzialen im Verlauf der Behandlung zusammenfassen, dass durch die Therapie mit Perampanel eine Verbesserung der Lebensqualität bei Gliom-assoziiertes Epilepsie erreicht werden konnte.

Zu den beobachteten Nebenwirkungen, unter welcher die Hälfte der untersuchten Patienten in der genannten Studie litten, gehören Benommenheit und Schwindel. Auch andere Autoren gingen auf das mögliche Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen des Antikonvulsivums ein: Besag und Patsalos (2016) gaben an, dass zu den häufigsten Begleiterscheinungen der Perampanel-Gabe Schwindelgefühl, Erschöpfung und Schläfrigkeit gehörten. Brodie et al. (2016) berichteten von Aggression, Reizbarkeit und feindseligem Verhalten bei

Epilepsiepatienten, die mit Perampanel behandelt wurden, wobei die Nebenwirkungen mit höherer Dosis zunahmen.

Trotz dieser unerwünschten Wirkungen steht die Effektivität von Perampanel bei der Behandlung und Verhinderung epileptischer Anfälle im Vordergrund. Zudem wurde, wie oben angeführt, in vorangegangenen Studien die potenziell neuroprotektive Wirkung des Medikaments diskutiert. Lange et al. (2020) stellten einen Vergleich zwischen unterschiedlich behandelten F98-Gliom-Ratten (jeweils ausschließlich mit Radio-Chemotherapie oder Perampanel oder mit der Kombination beider Therapien) an und fanden heraus, dass durch die Kombination aus RCT und PER die Netzwerkaktivität im peritumoralen Gewebe des Rattenhirns aufrechterhalten wurde, während durch die einzelne Radiochemotherapie oder Perampanel-Gabe kein derartiger Effekt erzielt werden konnte. Die Messung der synaptischen Aktivität in Hirnschnitten der kombiniert behandelten Tiere ergab nahezu identische Werte wie bei gesunden Ratten, die eine PBS-Injektion anstatt der F98-Zellen erhalten hatten. Die Autoren stellten beim Vergleich der gesunden Tiere mit den F98-Ratten eine Verringerung der synaptischen Aktivität im den Tumor umgebenden Hirngewebe fest, welche auf eine Beschädigung der synaptischen Verbindungen hindeuten. Bei einer kombinierten Behandlung blieben diese erhalten, woraus die Autoren auf eine Reduktion der schädlichen Effekte auf die Synapsen im peritumoralen Gewebe durch die zusätzlich zur RCT vorgenommene Perampanel-Gabe schlossen. Auch wenn in dieser Studie der Autoren keine Hemmung des Tumorwachstums und keine Lebensverlängerung durch die Medikation ergänzend zur RCT erzielt werden konnte, lässt sich zusammenfassen, dass Perampanel durch die antikonvulsive Wirkung und die peritumorale Neuroprotektion, einhergehend mit der Verringerung kognitiver Beeinträchtigungen nach der Radiochemotherapie, zu einer Verbesserung der Lebensqualität von Gliom-Patienten beiträgt. In zukünftigen Untersuchungen sollte ein Augenmerk auf der kombinierten Anwendung der beiden Therapien zur Bestätigung der Ergebnisse von Lange et al. (2020) liegen.

Auch ein möglicher Einfluss der Tageszeit auf das Auftreten der epilepsietypischen Potenziale und Anfälle wurde in vorangegangenen Studien diskutiert. So konstatierten Lange et al. (2020), dass alle im Rahmen ihrer Arbeit untersuchten Tiere signifikant mehr Spikes während der Nacht aufwiesen, also wenn der Messplatz abgedunkelt war, als tagsüber. Im Gegensatz dazu konnten Bajorat et al. (2011) bei ihren Versuchstieren mit Pilocarpin-induziertem Status epilepticus keinen Zusammenhang zwischen dem durch die Beleuchtung simulierten zirkadianen Rhythmus und der Häufigkeit von Anfällen beobachten, tagsüber traten nur

minimal mehr auf als während der Perioden ohne Beleuchtung. Stattdessen wurden in Langzeit-Untersuchungen Tage mit gehäuftem Auftreten dieser im Wechsel mit längeren anfallsfreien Intervallen entdeckt. Auch wenn die Tiere in der vorliegenden Arbeit für einen weniger langen Zeitraum untersucht wurden, wurde die Verteilung der epilepsietypischen Potenziale über die gesamte Zeit beleuchtet. Dabei fiel auf, dass diese insgesamt relativ gleichmäßig vorkamen. Lediglich während der Baseline-Phase, also vor Beginn der Therapie, konnten bei allen drei Tieren tagsüber etwas mehr Spikes beobachtet werden als während der Nacht. Auf das Zustandekommen der Potenziale während dieser Periode wurde in Kapitel 4.2 bereits ausführlicher eingegangen. Tier 2 erlitt im Zeitraum nach dem Beginn der Behandlung tagsüber mehr Spikes als nachts, wobei der Unterschied nur in diesem Beobachtungszeitraum, der von einer hohen Streuung der Werte geprägt war, eindeutig ausfiel mit um den Faktor 1,6 reduzierten Spikes während der Nacht. Ansonsten waren die Spikes gleichmäßig oder nur geringfügig unterschiedlich verteilt. Somit konnte hier kein eindeutiger Einfluss der Tageszeit auf das Auftreten epilepsietypischer Potenziale nachgewiesen werden, wobei zu beachten ist, dass eine sehr geringe Anzahl von Tieren über einen kurzen Zeitraum analysiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollten wie oben angeführt neben dem Auftreten der interiktalen Spikes auch die epileptischen Anfälle der Tiere 1 bis 3 untersucht werden, allerdings wurden entgegen der Erwartungen keinerlei Anfälle beobachtet. Auch wenn die Beleuchtung des Messplatzes während der Nacht nicht aktiv war und die Tiere entsprechend nicht zu sehen waren, hätte die dauerhaft aufgenommene EEG-Spur diese erkennen lassen. Im Rahmen vorheriger Studien des Instituts konnten durch die betrachteten Anfälle Rückschlüsse gezogen werden, beispielsweise auf den Krankheitszustand der Tiere oder den Erfolg der Therapie. Allerdings wurden in den besagten Arbeiten neben kombiniert behandelten (RCT + PER) und unbehandelten Tieren (die Tiere 4 bis 7 dieser Dissertation entsprechen einigen dieser) auch Tiere untersucht, die ausschließlich eine Radiochemotherapie und nicht zusätzlich das Perampanel erhielten. Das Fehlen von Anfällen bei den hiermit behandelten Tieren 1 bis 3 bestätigt die antikonvulsive Wirkung des Perampanels bei Patienten mit Gliom-assoziierte Epilepsie. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bereits erwähnten Studien von Vecht et al. (2017) und Izumoto et al. (2018), in welchen die Autoren an einer geringen Anzahl von Gliom-Patienten mit unkontrollierbarer Epilepsie forschten und einen signifikanten Rückgang der Anfälle durch die Perampanel-Medikation beobachten konnten. Auch dieser Aspekt stellt einen positiven Einfluss der Behandlung auf die Lebensqualität von Patienten mit Gliom-assoziierte Epilepsie dar.

4.5 Ausblick

Für zukünftige Studien wäre es interessant, eine Möglichkeit zur digitalen Auswertung der EEGs mittels einer Software zu etablieren. So könnten die Untersuchungen effizienter vonstatten gehen, es könnten mehr Tiere bzw. Patienten und umfangreichere EEG-Daten analysiert werden, womit statistisch eindeutigere Aussagen mit weniger zeitaufwendigen Auswertungen möglich wären.

Dafür müssten klare Kriterien für das Vorhandensein epilepsietypischer Potenziale festgelegt werden, damit die digitale Datenerhebung gleichermaßen genau wie die manuelle verlaufen kann. Wie in Kapitel 2.5.2 bereits angegeben, gibt es keine absolute Definition eines interikalen Spikes, sondern Merkmale in der EEG-Spur, die unter Berücksichtigung der gegenwärtigen Grundaktivität epilepsietypische Potenziale von Artefakten unterscheiden lassen. Diese müssten bei einer automatisierten EEG-Untersuchung mit einbezogen werden, sodass schließlich mit weniger Aufwand mehr Szenarien, beispielsweise andere Therapien und Kombinationen dieser oder direkte Vergleiche von verschiedenen Tieren, betrachtet werden können. Durch eine Verbesserung der Technik zur Videoaufnahme könnte außerdem eine Erweiterung des Beobachtungszeitraumes erreicht werden, sodass die Tiere auch ohne Messplatzbeleuchtung von 18 bis 6 Uhr zusätzlich zur EEG-Spur direkt in Augenschein genommen werden könnten.

Auch die potenziell neuroprotektive Wirkung des Perampanel, dargelegt von Lange et al. (2020), ist ein Aspekt, welcher in zukünftigen Studien weiterführend untersucht werden sollte: Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, führte die Kombination der RCT mit der Gabe von Perampanel neben der Verhinderung von Anfällen zu dem Schutz der Synapsen im peritumoralen Gewebe und weniger Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten, also entscheidende Faktoren insbesondere für die betroffenen Patienten. Dieser Ansatz sollte unbedingt weiterverfolgt werden, da darin große Bedeutung für zukünftige Patienten liegen könnte.

Die Untersuchung der klinischen EEG-Daten stellt eine Weiterentwicklung der in bisherigen Studien durchgeführten Tierversuche dar. Bei der Analyse der an verschiedenen Entitäten (GBM oder Metastasen unterschiedlicher Primärkarzinome) leidenden Patienten wurde eine teilweise Korrelation zwischen der Lokalisation der epilepsietypischen Potenziale im EEG und der Lage der pathologischen Läsionen im Hirn der Probanden entdeckt. In der Literatur wird

angegeben, dass die Veränderungen im EEG bei Hirntumor-Patienten vom umliegenden Parenchym herrühren, da das Tumorgewebe elektrisch neutral ist und daher die Lokalisation im EEG, auch wenn die Lateralisation recht zuverlässig ist, in die Irre führen kann (Feyissa & Tatum 2019). Dennoch rufen laut den Autoren schnell wachsende intraaxiale Tumoren wie Glioblastome die auffälligsten Abweichungen im EEG-Signal hervor. Daher sollte auch dieser Ansatz bei der Untersuchung und Behandlung klinischer Patienten weiter mit einbezogen werden, wodurch womöglich Fortschritte in der Diagnostik oder gar der Entwicklung spezifischer Therapien erzielt werden könnten. Zudem könnten für die Forschung weitere Epilepsie-Modelle erarbeitet werden.

5. Zusammenfassung

Gliome machen 30 bis 40 % aller Hirntumoren aus, wobei es sich bei Erwachsenen in etwa der Hälfte der Fälle um Glioblastome handelt (Schneider et al. 2010). Bei dieser Tumorart beträgt die Inzidenz einer assoziierten Epilepsie 30 bis 60 % (Armstrong et al. 2016), bei fast einem Drittel der Patienten stellt ein epileptischer Anfall das erste klinische Symptom der Erkrankung dar (Dunn-Pirio et al. 2018). Obwohl die Tumor-assoziierte Epilepsie neben einigen unspezifischen Anzeichen zu den essenziellen Merkmalen des Krankheitsbildes gehört, ist die Pathophysiologie dahinter noch nicht vollständig geklärt (Kirschstein & Köhling 2016).

Die Zielsetzung der Arbeit lag in der Video-EEG-Analyse zur Untersuchung der Wirksamkeit der Medikation mit dem AMPA-Rezeptor-Antagonisten Perampanel auf die Gliom-assoziierte Epilepsie der Ratte. Hierfür wurde das F98-Ratten-Gliom-Modell genutzt, wobei den Versuchstieren im Rahmen einer Operation F98-Gliomzellen zur Entwicklung höhergradiger Gliome injiziert wurden. Durch die Implantation von Elektroden und der Einrichtung eines videoüberwachten Messplatzes konnten die Tiere mittels Video-EEG-Daten auf auftretende interiktale epilepsietypische Potenziale (Spikes) und potenzielle Anfälle hin untersucht werden, bis sie den moribunden Zustand erreicht hatten und die Versuche beendet wurden. Es wurden dabei drei verschiedene Zeiträume betrachtet und die Ergebnisse den im Rahmen vorheriger Dissertationen erhobenen Daten unbehandelter Tiere vergleichend gegenübergestellt. Abschließend wurde die Analyse erweitert, es wurden klinische EEG-Daten von Glioblastom- oder Hirnmetastasen-Patienten der Rostocker Klinik und Poliklinik für Neurologie ausgewertet. Die letztgenannten Untersuchungen ergaben eine teilweise Korrelation zwischen der Position der epilepsietypischen Entladungen im EEG und der klinischen Lokalisation der pathologischen Läsion. Zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gehört zudem die deutliche Abnahme von interiktalen epilepsietypischen Potenzialen pro Stunde im zeitlichen Verlauf bei den Versuchstieren, die eine Perampanel-Behandlung erhalten hatten, im präfinalen Zeitraum traten signifikant weniger Spikes pro Stunde auf als vor Beginn der Therapie. Im Vergleich dazu kam es bei den unbehandelten Tieren zu einer deutlichen Zunahme der Spikes pro Stunde mit Fortschreiten der Krankheit. Es wurden keine epileptischen Anfälle bei den behandelten Tieren beobachtet, entsprechend konnten Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen der Therapie auf Häufigkeit und Dauer dieser

nicht durchgeführt werden. Eine weitere Erkenntnis war, dass unabhängig von der Behandlung alle Tieren während der Baseline-Phase interiktale Spikes erlitten. Ein eindeutiger Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf das Auftreten epilepsietypischer Potenziale konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ergebnis war, dass die Tiere, die die Behandlung erhalten hatten, insgesamt eine längere Überlebensdauer nach der Operation aufwiesen. Des Weiteren ergab sich eine Verbesserung der Lebensqualität durch Perampanel bei Patienten, die an Gliom-assoziiertes Epilepsie leiden, da bei den entsprechend behandelten Tieren eine deutliche Abnahme der interiktalen Spikes, Anfallsfreiheit und ein späteres Erreichen des moribunden Zustandes beobachtet werden konnte.

Angesichts dieser Erkenntnisse und deren Perspektive für Patienten, die an Gliom-assoziiertes Epilepsie leiden sowie der potenziell neuroprotektiven Wirkung des AMPA-Rezeptor-Antagonisten (Lange et al. 2020), sind weitere detaillierte Untersuchungen zur Perampanel und der Kombination dessen mit der etablierten Radio-Chemotherapie notwendig.

6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Glutamatfreisetzung aus Gliazellen (in Anlehnung an Fröscher et al. 2014).....	14
Tab. 1: Übersicht der Versuchstiere.....	21
Abb. 2: Positionen der Bohrlöcher B1 und B2 für die Elektroden und Position des Bohrloches B3 für die Zellimplantation.....	22
Abb. 3: Intraoperative Aufnahme der F98-Zellimplantation.....	23
Abb. 4: Versuchstier postoperativ mit vernähter Wunde.....	24
Abb. 5: Bildschirmansicht der Software NeuroScore™.....	26
Abb. 6: Interiktaler Spike im EEG des untersuchten Tieres 3, Darstellung im Zeitfenster von fünf Sekunden.....	28
Tab. 2: Übersicht der Patienten.....	29
Abb. 7: Bildschirmansicht der Software Natus Neuroworks®.....	30
Abb. 8: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 in der Baseline- Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum.....	33
Abb. 9: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.....	34
Abb. 10: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.....	35
Abb. 11: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 1 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.....	36
Abb. 12: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 in der Baseline-Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum.....	37
Abb. 13: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.....	38
Abb. 14: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.....	39
Abb. 15: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.....	40
Abb. 16: Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 in der Baseline-Phase, zu Behandlungsbeginn sowie im präfinalen Zeitraum	41
Abb. 17: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 im zeitlichen Verlauf während der Baseline-Phase.	42

Abb. 18: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 3 im zeitlichen Verlauf zu Beginn der Behandlung.....	43
Abb. 19: Anzahl der Spikes pro Stunde des behandelten Tieres 2 im zeitlichen Verlauf im präfinalen Zeitraum.....	44
Abb. 20: Medianwerte der Anzahl der interiktalen Spikes pro Stunde der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 im präfinalen Zeitraum.....	45
Abb. 21: Medianwerte der interiktalen Spikes je Stunde der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 während der Baseline-Phase und im präfinalen Zeitraum....	46
Abb. 22: Überblick über Anzahl und Verteilung der Spikes pro Stunde aller untersuchten Tiere im präfinalen Zeitraum.....	47
Abb. 23: Lebensdauer der behandelten Tiere 1 bis 3 sowie der unbehandelten Tiere 4 bis 7 in Tagen.....	48
Tab. 3: Anzahl der epilepsietypischen Potenziale in klinischen EEGs. Die Auswertung des EEGs von Patient 08 war aufgrund der klinischen Gegebenheiten erschwert.....	50
Abb. 24: Ausschnitt aus dem EEG des Patienten 04. Die schwarzen Ellipsen markieren aufgetretene Phasenumkehrungen.....	51

7. Thesen

- 1) Es kam bei allen analysierten Tieren, unabhängig von deren Behandlung, zum Auftreten interiktaler Spikes während der Baseline-Phase.
- 2) Den zeitlichen Verlauf betrachtend traten bei den Tieren, die eine Behandlung erhalten hatten, im Median im präfinalen Zeitraum signifikant weniger Spikes pro Stunde auf als während der Baseline-Phase.
- 3) Dagegen kam es im Median bei den unbehandelten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Spikerate von der Baseline-Phase bis zum präfinalen Abschnitt.
- 4) Durch die Behandlung mit Perampanel zeigten die Tiere im Durchschnitt eine Verlängerung der Lebenszeit.
- 5) Es traten bei den behandelten Tieren keine epileptischen Anfällen auf, womit sich die antikonvulsive Wirkung des Perampanels zeigt.
- 6) Ein Einfluss der Tageszeit bzw. des zirkadianen Rhythmus der Tiere auf das Auftreten epilepsietypischer Potenziale konnte nicht nachgewiesen werden.
- 7) Durch die Art der Untersuchung kann nicht abschließend geklärt werden, welchen zusätzlichen positiven Effekte eine Kombination der Behandlung mit einer etablierten Radio-Chemotherapie auf die Tiere mit sich bringen könnte.

8. Literaturverzeichnis

Alfonso, J. C. L.; Talkenberger, K.; Seifert, M.; Klink, B.; Hawkins-Daarud, A.; Swanson, K. R. et al. (2017): The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 14 (136). DOI: 10.1098/rsif.2017.0490.

Armstrong, Terri S.; Grant, Robin; Gilbert, Mark R.; Lee, Jong Woo; Norden, Andrew D. (2016): Epilepsy in glioma patients: mechanisms, management, and impact of anticonvulsant therapy. In: *Neuro-oncology* 18 (6), S. 779–789. DOI: 10.1093/neuonc/nov269.

Bajorat, Rika; Goerss, Doreen; Brenndörfer, Linda; Schwabe, Lars; Köhling, Rüdiger; Kirschstein, Timo (2016): Interplay between interictal spikes and behavioral seizures in young, but not aged pilocarpine-treated epileptic rats. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 57 (Pt A), S. 90–94. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.01.014.

Bajorat, Rika; Porath, Katrin; Kuhn, Johannes; Goßla, Elke; Goerss, Doreen; Sellmann, Tina et al. (2018): Oral administration of the casein kinase 2 inhibitor TBB leads to persistent KCa2.2 channel up-regulation in the epileptic CA1 area and cortex, but lacks anti-seizure efficacy in the pilocarpine epilepsy model. In: *Epilepsy research* 147, S. 42–50. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2018.08.012.

Bajorat, Rika; Wilde, Marleen; Sellmann, Tina; Kirschstein, Timo; Köhling, Rüdiger (2011): Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm. In: *Epilepsia* 52 (9), e118-22. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03200.x.

Beaumont, A.; Clarke, M.; Whittle, I. R. (1996): The effects of malignant glioma on the EEG and seizure thresholds: an experimental study. In: *Acta neurochirurgica* 138 (4), S. 370–381. DOI: 10.1007/BF01420298.

Besag, Frank Mc; Patsalos, Philip N. (2016): Clinical efficacy of perampanel for partial-onset and primary generalized tonic-clonic seizures. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 12, S. 1215–1220. DOI: 10.2147/NDT.S83842.

Birnbaum, T. (2015): Tumoren des ZNS. In: Bender, A. & Birnbaum, T. (Hrsg.): *Kurzlehrbuch Neurologie*. 2. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer

Buckingham, Susan C.; Campbell, Susan L.; Haas, Brian R.; Montana, Vedrana; Robel, Stefanie; Ogunrinu, Toyin; Sontheimer, Harald (2011): Glutamate release by primary brain

tumors induces epileptic activity. In: *Nature medicine* 17 (10), S. 1269–1274. DOI: 10.1038/nm.2453.

Brodie, Martin J.; Besag, Frank; Ettinger, Alan B.; Mula, Marco; Gobbi, Gabriella; Comai, Stefano et al. (2016): Epilepsy, Antiepileptic Drugs, and Aggression: An Evidence-Based Review. In: *Pharmacological reviews* 68 (3), S. 563–602. DOI: 10.1124/pr.115.012021.

Campbell, Susan L.; Buckingham, Susan C.; Sontheimer, Harald (2012): Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. In: *Epilepsia* 53 (8), S. 1360–1370. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2012.03557.x.

Conti, Luca; Palma, Eleonora; Roseti, Cristina; Lauro, Clotilde; Cipriani, Raffaella; Groot, Marjolein de et al. (2011): Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. In: *Epilepsia* 52 (9), S. 1635–1644. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03111.x.

Coppola, Antonietta; Zarabla, Alessia; Maialetti, Andrea; Villani, Veronica; Koudriavtseva, Tatiana; Russo, Emilio et al. (2020): Perampanel Confirms to Be Effective and Well-Tolerated as an Add-On Treatment in Patients With Brain Tumor-Related Epilepsy (PERADET Study). In: *Frontiers in neurology* 11, Artikel 592. DOI: 10.3389/fneur.2020.00592.

Dunn-Pirio, Anastasie M.; Woodring, Sarah; Lipp, Eric; Herndon, James E.; Healy, Patrick; Weant, Mallika et al. (2018): Adjunctive perampanel for glioma-associated epilepsy. In: *Epilepsy & behavior case reports* 10, S. 114–117. DOI: 10.1016/j.ebcr.2018.09.003.

Faught, Edward; Karakis, Ioannis; Drane, Daniel L. (2018): The Impact of Interictal Discharges on Performance. In: *Current neurology and neuroscience reports* 18 (12), S. 88. DOI: 10.1007/s11910-018-0892-9.

Feyissa, Anteneh M.; Tatum, William O. (2019): Adult EEG. In: *Handbook of clinical neurology* 160, S. 103–124. DOI: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00007-2.

Fisher, Robert S.; Acevedo, Carlos; Arzimanoglou, Alexis; Bogacz, Alicia; Cross, J. Helen; Elger, Christian E. et al. (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. In: *Epilepsia* 55 (4), S. 475–482. DOI: 10.1111/epi.12550.

Fisher, Robert S.; Cross, J. Helen; French, Jacqueline A.; Higurashi, Norimichi; Hirsch, Edouard; Jansen, Floor E. et al. (2017): Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. In: *Epilepsia* 58 (4), S. 522–530. DOI: 10.1111/epi.13670.

- Friedman, Alon; Kaufer, Daniela; Heinemann, Uwe (2009): Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. In: *Epilepsy research* 85 (2-3), S. 142–149. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2009.03.005.
- Fröscher, W.; Kirschstein, T.; Rösche, J. (2014): Antiepileptikabehandlung bei Hirntumorbedingten epileptischen Anfällen. In: *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 82 (12), S. 678–690. DOI: 10.1055/s-0034-1385475.
- Ishiuchi, Shogo; Yoshida, Yukari; Sugawara, Kenichi; Aihara, Masanori; Ohtani, Toshiyuki; Watanabe, Takashi et al. (2007): Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (30), S. 7987–8001. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2180-07.2007.
- Izumoto, Shuichi; Miyauchi, Masaharu; Tasaki, Takayuki; Okuda, Takeshi; Nakagawa, Nobuhiro; Nakano, Naoki et al. (2018): Seizures and Tumor Progression in Glioma Patients with Uncontrollable Epilepsy Treated with Perampanel. In: *Anticancer research* 38 (7), S. 4361–4366. DOI: 10.21873/anticancer.12737.
- Janszky, Jozsef; Hoppe, M.; Clemens, Z.; Janszky, I.; Gyimesi, C.; Schulz, R.; Ebner, A. (2005): Spike frequency is dependent on epilepsy duration and seizure frequency in temporal lobe epilepsy. In: *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 7 (4), S. 355–359.
- Kerkhof, Melissa; Vecht, Charles J. (2013): Seizure characteristics and prognostic factors of gliomas. In: *Epilepsia* 54 Suppl 9, S. 12–17. DOI: 10.1111/epi.12437.
- Kirschstein, Timo; Köhling, Rüdiger (2016): Animal models of tumour-associated epilepsy. In: *Journal of neuroscience methods* 260, S. 109–117. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.06.008.
- Köhling, Rüdiger; Senner, Volker; Paulus, Werner; Speckmann, Erwin-Josef (2006): Epileptiform activity preferentially arises outside tumor invasion zone in glioma xenotransplants. In: *Neurobiology of disease* 22 (1), S. 64–75. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.10.001.
- Lange, Falko; Hartung, Jens; Liebelt, Clara; Boisserée, Julius; Resch, Tobias; Porath, Katrin et al. (2020): Perampanel Add-on to Standard Radiochemotherapy in vivo Promotes Neuroprotection in a Rodent F98 Glioma Model. In: *Frontiers in neuroscience* 14, S. 598266. DOI: 10.3389/fnins.2020.598266.
- Lange, Falko; Hörnschemeyer, Julia; Kirschstein, Timo (2021): Glutamatergic Mechanisms in Glioblastoma and Tumor-Associated Epilepsy. In: *Cells* 10 (5). DOI: 10.3390/cells10051226.

- Lange, Falko; Weißlau, Konrad; Porath, Katrin; Hörschemeyer, Julia; Bergner, Carina; Krause, Bernd Joachim et al. (2019): AMPA receptor antagonist perampanel affects glioblastoma cell growth and glutamate release in vitro. In: *PloS one* 14 (2), e0211644. DOI: 10.1371/journal.pone.0211644.
- Louis, David N.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K.; Burger, Peter C.; Jouvret, Anne et al. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. In: *Acta neuropathologica* 114 (2), S. 97–109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, David N.; Perry, Arie; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von; Figarella-Branger, Dominique; Cavenee, Webster K. et al. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Acta neuropathologica* 131 (6), S. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Maranhão, Marcius Vinícius Mulatinho; Gomes, Eni Araújo; Carvalho, Priscila Evaristo de (2011): Epilepsy and Anesthesia. In: *Brazilian Journal of Anesthesiology* 61 (2), S. 232–254. DOI: 10.1016/S0034-7094(11)70028-9.
- Mayer, Johannes; Kirschstein, Timo; Resch, Tobias; Porath, Katrin; Krause, Bernd Joachim; Köhling, Rüdiger; Lange, Falko (2020): Perampanel attenuates epileptiform phenotype in C6 glioma. In: *Neuroscience letters* 715, S. 134629. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134629.
- Mattle, H. & Fischer, U. (2021): Kurzlehrbuch Neurologie. 5., vollständig überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Kurzlehrbuch).
- Perucca, Emilio (2013): Optimizing antiepileptic drug treatment in tumoral epilepsy. In: *Epilepsia* 54 Suppl 9, S. 97–104. DOI: 10.1111/epi.12452.
- Robert, Stephanie M.; Sontheimer, Harald (2014): Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (10), S. 1839–1854. DOI: 10.1007/s00018-013-1521-z.
- Rosati, Anna; Poliani, Pietro Luigi; Todeschini, Alice; Cominelli, Manuela; Medicina, Daniela; Cenzato, Marco et al. (2013): Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. In: *Neuro-oncology* 15 (5), S. 618–625. DOI: 10.1093/neuonc/nos338.
- Sandmeyer, Lynne S.; Sheikh, Amber; Schültke, Elisabeth; Shültke, Elisabeth; Fournay, Daryl; Grahn, Bruce H. (2008): Chronic ocular lesions associated with bi-directional microbeam radiation therapy in an experimental rat study for therapy of C6 and F98 gliomas. In: *Veterinary ophthalmology* 11 (5), S. 290–298. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2008.00649.x.

Schneider, Thomas; Mawrin, Christian; Scherlach, Cordula; Skalej, Martin; Firsching, Raimund (2010): Gliomas in adults. In: *Deutsches Arzteblatt international* 107 (45), 799-807; quiz 808. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0799.

Schültke, E.; Bräuer-Krisch, E.; Blattmann, H.; Requardt, H.; Laissue, J. A.; Hildebrandt, G. (2018): Survival of rats bearing advanced intracerebral F 98 tumors after glutathione depletion and microbeam radiation therapy: conclusions from a pilot project. In: *Radiation oncology (London, England)* 13 (1), S. 89. DOI: 10.1186/s13014-018-1038-6.

Schulze, Felix; Müller, Steffen; Guli, Xiati; Schumann, Lukas; Brehme, Hannes; Riffert, Till et al. (2020): CK2 Inhibition Prior to Status Epilepticus Persistently Enhances KCa2 Function in CA1 Which Slows Down Disease Progression. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 14, S. 33. DOI: 10.3389/fncel.2020.00033.

Selvitelli, Megan F.; Walker, Linsey M.; Schomer, Donald L.; Chang, Bernard S. (2010): The relationship of interictal epileptiform discharges to clinical epilepsy severity: a study of routine electroencephalograms and review of the literature. In: *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* 27 (2), S. 87–92. DOI: 10.1097/WNP.0b013e3181d64b1e.

Senner, Volker; Köhling, Rüdiger; Püttmann-Cyrus, Sylvia; Straub, Heidrun; Paulus, Werner; Speckmann, Erwin-Josef (2004): A new neurophysiological/neuropathological ex vivo model localizes the origin of glioma-associated epileptogenesis in the invasion area. In: *Acta neuropathologica* 107 (1), S. 1–7. DOI: 10.1007/s00401-003-0771-5.

Sharanreddy, M.; Kulkarni, P. K. (2013): Automated EEG signal analysis for identification of epilepsy seizures and brain tumour. In: *Journal of medical engineering & technology* 37 (8), S. 511–519. DOI: 10.3109/03091902.2013.837530.

Stockhammer, Florian; Misch, Martin; Helms, Hans-Joachim; Lengler, Ulrike; Prall, Friedrich; Deimling, Andreas von; Hartmann, Christian (2012): IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. In: *Seizure* 21 (3), S. 194–197. DOI: 10.1016/j.seizure.2011.12.007.

Stupp Roger; Mason Warren P.; van den Bent Martin J.; Weller Michael; Fisher Barbara; Taphoorn Martin J.B. et al. (2005): Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. In: *The New England Journal of Medicine* 352 (10), S. 987–996.

Tönjes, Martje; Barbus, Sebastian; Park, Yoon Jung; Wang, Wei; Schlotter, Magdalena; Lindroth, Anders M. et al. (2013): BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid

catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. In: *Nature medicine* 19 (7), S. 901–908. DOI: 10.1038/nm.3217.

van Breemen, Mèlanie S. M.; Rijsman, R. M.; Taphoorn, M. J. B.; Walchenbach, R.; Zwinkels, H.; Vecht, Charles J. (2009): Efficacy of anti-epileptic drugs in patients with gliomas and seizures. In: *Journal of neurology* 256 (9), S. 1519–1526. DOI: 10.1007/s00415-009-5156-9.

van Breemen, Mèlanie S. M.; Wilms, Erik B.; Vecht, Charles J. (2007): Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. In: *The Lancet Neurology* 6 (5), S. 421–430. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70103-5.

Vecht, Charles; Duran-Peña, Alberto; Houillier, Caroline; Durand, Thomas; Capelle, Laurent; Huberfeld, Gilles (2017): Seizure response to perampanel in drug-resistant epilepsy with gliomas: early observations. In: *Journal of neuro-oncology* 133 (3), S. 603–607. DOI: 10.1007/s11060-017-2473-1.

Vezzani, Annamaria; Fujinami, Robert S.; White, H. Steve; Preux, Pierre-Marie; Blümcke, Ingmar; Sander, Josemir W.; Löscher, Wolfgang (2016): Infections, inflammation and epilepsy. In: *Acta neuropathologica* 131 (2), S. 211–234. DOI: 10.1007/s00401-015-1481-5.

Vezzani, Annamaria; Maroso, Mattia; Balosso, Silvia; Sanchez, Manuel-Alavez; Bartfai, Tamas (2011): IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. In: *Brain, behavior, and immunity* 25 (7), S. 1281–1289. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.018.

Wang, Zhuo; Yang, Guozi; Zhang, Yu-Yu; Yao, Yan; Dong, Li-Hua (2017): A comparison between oral chemotherapy combined with radiotherapy and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma: A systematic review and meta-analysis. In: *Medicine* 96 (44), e8444. DOI: 10.1097/MD.00000000000008444.

Weissberg, Itai; Wood, Lydia; Kamintsky, Lyn; Vazquez, Oscar; Milikovsky, Dan Z.; Alexander, Allyson et al. (2015): Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- β /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. In: *Neurobiology of disease* 78, S. 115–125. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.02.029.

Zhao, Xiaojuan; Wang, Xuefeng (2014): Anesthesia-induced epilepsy: causes and treatment. In: *Expert review of neurotherapeutics* 14 (9), S. 1099–1113. DOI: 10.1586/14737175.2014.948851.

9. Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Köhling, dem Institutsdirektor und Leiter der AG Neurophysiologie, für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Timo Kirschstein, der von der Themenvergabe, über anregende und konstruktive Ratschläge während der gesamten Arbeit bis hin zur Motivation über die ganze Zeit unterstützend zur Seite stand und dessen außergewöhnlich gute Betreuung unabdingbar für den Erfolg der Arbeit war.

Auch Herrn Dr. Falko Lange danke ich für seine Hilfsbereitschaft, Unterstützung und kompetente Beratung.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Oscar-Langendorff-Instituts für Physiologie Rostock für Ihre freundlichen Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Verlobten Maximilian für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in jedweder Hinsicht bedanken.

10. Lebenslauf

Zur Person

Name	Franziska Zessin
Geburtsdatum	04.07.1995
Geburtsort	Räckelwitz

Schulbildung

2002 – 2006	Grundschule „Otto Garten“ Elstra
2006 – 2014	Gotthold-Ephraim-Lessing-Gymnasium Kamenz
Juli 2014	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung an der Universität Rostock

2014 – 2018	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Zahnmedizin
März 2018	Zahnärztliche Vorprüfung
2018 – 2020	Klinischer Abschnitt des Studiums der Zahnmedizin
Oktober 2020	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)
2020 – 2021	Promotionsstudium am Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie

Posterpräsentation

September 2021	Gade, R.; Zessin, F.; Lange, F.; Porath, K.; Hartung, J.; Freiman, T.; Henker, C.; Schültke, E.; Köhling, R.; Kirschstein, T. (2021): Glutamate receptor expression in human brain tumors and perampanel action in rodent glioma
----------------	--

11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Franziska Zessin, eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Video-EEG-Analysen von Gliom-tragenden Ratten unter Behandlung mit Perampanel“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, den 08.12.2022

Unterschrift