

AUS DEM OSCAR-LANGENDORFF-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: UNIV.- PROF. DR. MED. R. KÖHLING

ROLLE VON Kv7-KALIUMKANÄLEN AUF DIE
GABAZIN-INDUZIERTER SPONTANAKTIVITÄT IM CHRONISCH EPILEPTISCHEN
HIPPOCAMPUSGEWEBE

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER ZAHNHEILKUNDE

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

DORA-CHARLOTTE HÜBNER | GEB. AM 13.10.1989 IN KÜHLUNGSBORN

AUS BAD DOBERAN OT HEILIGENDAMM

ROSTOCK | EINGEREICHT 06/2024 | VERTEIDIGT 12.03.2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005150

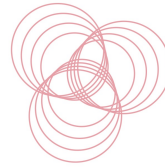


Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

DEKAN: UNIV.-PROF. DR. MED. E. REISINGER

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. TIMO KIRSCHSTEIN

EINRICHTUNG: OSCAR-LANGENDORFF-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: UNIV.-PROF. DR. MED. ASTRID BERTSCHE

EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR KINDER UND JUGENDMEDIZIN, UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD

DRITTGUTACHTER: UNIV.-PROF. DR. MED. THOMAS MITTMANN

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN MAINZ

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

INHALTSVERZEICHNIS

	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
	TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
I.	EINLEITUNG.....	1
1.1	EPILEPSIE.....	1
1.2	HIPPOCAMPUS.....	2
1.3	TEMPORALLAPPENEPILEPSIE (TLE).....	4
1.4	PILOCARPIN ALS CHRONISCHES EPILEPSIEMODELL	6
1.5	ROLLE VON KALIUMKANÄLEN BEI TLE.....	7
1.6	KETOGENE DIÄT	12
1.7	ZIELSTELLUNG.....	14
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	ERKLÄRUNG	15
2.2	VERSUCHSTIERE.....	15
2.3	MATERIALIEN.....	15
	2.3.1 GAS	15
	2.3.2 CHEMIKALIEN.....	16
	2.3.3 LÖSUNGEN	16
	2.3.4 PHARMAKA	18
	2.3.5 LÖSLICHKEITSHINWEISE UND KONZENTRATIONEN.....	18
	2.3.6 MEHR- UND EINMALMATERIAL.....	18
	2.3.7 GERÄTE UND SOFTWARE.....	19
2.4	METHODE.....	21
	2.4.1 PRÄPARATION.....	21
	2.4.2 SCHNITT	22
	2.4.3 AUFBAU MESSPLATZ.....	23
	2.4.4 FELDPOTENTIALMESSUNG.....	24
	2.4.5 PILOCARPIN MODELL.....	26
	2.4.6 VERSUCHSGRUPPEN.....	27

2.4.7	ANALYSE DER ERHOBENEN DATEN.....	28
2.4.8	STATISTIK.....	29
III.	ERGEBNISSE	31
3.1	GABAZIN-VERSUCHE.....	31
3.1.1	DER EFFEKT VON GABAZIN AUF KONTROLLTIERE.....	31
3.1.2	DER EFFEKT VON GABAZIN AUF KONTROLLTIERE UND PILOTIERE.....	34
3.2	XE991 VERSUCHE.....	35
3.2.1	DER EFFEKT VON XE991 AN KONTROLLTIEREN.....	35
3.2.2	DER EFFEKT VON XE991 AN PILOTIEREN.....	37
3.3	XE991 VERSUCHE MIT β -HYDROXYBUTYRAT	42
3.3.1	DER EFFEKT VON XE991 UND β -HYDROXYBUTYRAT AN KONTROLLTIEREN.....	42
3.3.2	DER EFFEKT VON XE991 UND β -HYDROXYBUTYRAT AN PILOTIEREN.....	44
3.4	INTERAKTIONEN ZWISCHEN XE991 UND BHB	47
IV.	DISKUSSION	51
4.1	LIMITATION.....	51
4.2	DIE ROLLE VON GABA _A -REZEPTOREN	52
4.3	DIE ROLLE VON KV7-KANÄLEN.....	54
4.4	DIE ROLLE VON KV7-KANAL-ÖFFNERN.....	56
4.5	AUSBLICK MIT KLINISCHER RELEVANZ.....	58
V.	ZUSAMMENFASSUNG	60
VI.	THESEN.....	61
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	62
VIII.	DANKSAGUNG	70
IX.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	71

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: TRISYNAPTISCHER ERREGUNGSWEG IM HIPPOCAMPUS	4
ABBILDUNG 2: HISTOLOGISCHER SCHNITT DES HIPPOCAMPUS IM EPILEPTISCHEN TIER	6
ABBILDUNG 3: AUFBAU EINES SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALIUMKANALS	9
ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT DER KALIUMKANÄLE	10
ABBILDUNG 5: ZEITSTRAHL EINES MESSTAGES	22
ABBILDUNG 6: DETAILAUFNAHME DER SCHNITTANFERTIGUNG	23
ABBILDUNG 7: FELDPOTENTIALMESSUNG	25
ABBILDUNG 8: ZEITSTRAHL ZUM ABLAUF DES PILOCARPIN-MODELLS	26
ABBILDUNG 9: ETP (EPILEPSIETYPISCHES POTENTIAL)	28
ABBILDUNG 10: BOXPLOT	30
ABBILDUNG 11: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN	31
ABBILDUNG 12: MITTELWERTE DER KONTROLLSCHNITTE DES GABAZIN-ZEITVERLAUFS	32
ABBILDUNG 13: ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 5 MIN	33
ABBILDUNG 14: ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 30 MIN	33
ABBILDUNG 15: ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 60 MIN	33
ABBILDUNG 16: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN+XE991	35
ABBILDUNG 17: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN	36
ABBILDUNG 18: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN UND XE991	36
ABBILDUNG 19: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER PILOCARPIN-TIERE MIT GABAZIN UND XE991 ..	37
ABBILDUNG 20: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN	38
ABBILDUNG 21: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN UND XE991	38
ABBILDUNG 22: BOXPLOT KONTROLLE VS. PILOCARPIN	40
ABBILDUNG 23: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN, BHB+XE991 42	
ABBILDUNG 24: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN UND BHB	43
ABBILDUNG 25: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN, BHB+XE991	43
ABBILDUNG 26: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER PILO-TIERE MIT GABAZIN, BHB+XE991	44
ABBILDUNG 27: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN UND BHB	45
ABBILDUNG 28: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN, BHB + XE991 ...	45
ABBILDUNG 29: BOXPLOT KONTROLLE VS. PILO UNTER BHB	46
ABBILDUNG 30: BOXPLOT MIT BHB VS OHNE BHB	50

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VERWENDETE GASE	15
TABELLE 2: VERWENDETE CHEMIKALIEN FÜR DIE LÖSUNGEN	16
TABELLE 3: ACSF-LÖSUNG	17
TABELLE 4: SUCROSE-LÖSUNG	17
TABELLE 5: VERWENDETE PHARMAKA	18
TABELLE 6: VERWENDETES MEHR- UND EINMALMATERIAL	18
TABELLE 7: VERWENDETE GERÄTE UND SOFTWARE	19
TABELLE 8: VERSUCHSGRUPPEN	27
TABELLE 9: FORMELSAMMLUNG	30
TABELLE 10: WEITERFÜHRENDE AUSWERTUNG DER XE991-VERSUCHE	41
TABELLE 11: INTERAKTIONEN DER FAKTOREN: TG, BHB, XE991	48
TABELLE 12: GRUNDLEGENDER EFFEKT DER KATEGORIEN	48
TABELLE 13: VERGLEICH VERSCHIEDENER AKUTER EPILEPSIEMODELLE	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACSF.....	Artificial cerebrospinal fluid
AED.....	engl. antiepileptic drugs
AHP.....	afterhyperpolarisation potential
BHB.....	β -Hydroxybutyrat
BK-Kanäle.....	engl. big conductance channel
CA.....	Cornu ammonis
EPSC.....	engl. excitatory postsynaptic currents
ETP.....	epilepsietypische Potentiale
fAHP.....	fast afterhyperpolarisation potential
fEPSP.....	engl. field excitatory postsynaptic potential = Feldpotential
GABA.....	engl. gamma-aminobutyric acid
GABA _A -Rezeptor.....	gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor
GD.....	Gyrus Dentatus
GZ.....	Gabazine; 2-(3-Carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl)pyridaziniumbromid
HC.....	Hippocampus
HCS.....	Hippocampusklerose
i.p.....	intraperitoneale Injektion
ILAE.....	engl. "International League Against Epilepsy"
IQR.....	interquartile Range
K _{2P}	engl. leak two pore domain potassium channel
K _{Ca}	engl. calcium activated potassium channel
KD.....	Ketogene Diät
K _{ir}	engl. inward rectifier potassium channel
K _v	engl. voltage gated potassium channel
LTP.....	engl. long-term potentiation
mAHP.....	medium afterhyperpolarisation potential
mTLE.....	mesiale Temporallappenepilepsie
Ncl.....	Nucleus
RED.....	engl. recurrent epileptiform discharges
RMP.....	Ruhemembranpotential

RT-PCR engl. reverse trascription polymerase chain reaction
s.c.....subkutane Injektion
S1-S6Segment 1-6
sAHP slow afterhyperpolarisation potential
SE Status epilepticus
SK-Kanäle.....engl. samll conductance channel
SRS..... engl. spontaneous recurrent seizures
TBB..... Tetrabromotriazol
TLE Temporallappenepilepsie
mTLE mesiale Temporallappenepilepsie
TM-Domäne..... Transmembrandomäne
ZNS.....Zentralnervensystem

I. EINLEITUNG

1.1 EPILEPSIE

Der Begriff „Epilepsie“ nimmt seinen Ursprung aus dem Altgriechischen επιληψία [epilepsia] und wird in deutscher Sprache als „Fallsucht“ übersetzt (Pschyrembel, 2014). Sie ist eine der am längsten bekannten Krankheiten und wurde schon in frühen Texten der Antike immer wiederkehrend erwähnt. Im Verlauf beschrieb Hippokrates erste organische Ursachen als Ätiologie der Epilepsie (Schneble, 2013). Definiert wird die Epilepsie als eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe von Funktionsstörungen des Gehirns. Diese Störungen entstehen in den Nervenzellverbänden des ZNS, durch Interaktion pathologischer Erregungsbildung und fehlender Erregungsbegrenzung. Der epileptische Anfall beschreibt eine klinische Manifestation als Ergebnis einer abnormen und exzessiven Entladung neuronaler Verbände im Gehirn (Robert S. Fisher, 2017).

Epilepsie ist die häufigste chronische neurologische Erkrankung im Kindes- und Erwachsenenalter. Sie betrifft 0,5 bis 1% der Bevölkerung weltweit (Håberg et al., 2018). Erstmanifestationen werden im Kindesalter sowie nach dem 60. Lebensjahr beschrieben (Hufschmidt et al., 2017). Die Epilepsie ist nach wie vor eine schwerwiegende, unzureichend kontrollierte neurologische Störung und rund 20% der diagnostizierten Epilepsien sind refraktär gegenüber Medikamenten (Manville et al., 2020; Shorvon, 1996).

Nach (Hufschmidt et al., 2017) sind verschiedene Ätiologien bekannt. Zum einen die *genetische Epilepsie* (früher: idiopathisch), die überwiegend polygen, seltener monogen vererbte Epilepsieformen und die *strukturell-metabolische Form* (früher: symptomatisch). Diese beschreibt eine lokalisationsbezogene, unspezifische Reaktion des Gehirns auf unterschiedliche Veränderungen von Hirnstruktur und -physiologie. Insbesondere Dysgenesien der Hirnrinde, hypoxische, ischämische, traumatische, entzündliche Schädigungen, intrazerebrale Blutungen, Tumore oder degenerative und metabolische Störungen sind mögliche Ursachen für die strukturell-metabolische Form. Der Begriff „kryptogen“, wird bei fehlendem Läsionsnachweis verwendet.

1.2 HIPPOCAMPUS

Der Hippocampus (HC) gehört zum limbischen System. Größtenteils setzt sich das limbische System aus paleo- und archikortikalen (=allokortikale) Strukturen zusammen. Der Paleocortex gehört zum phylogenetisch ältesten Teil der Großhirnrinde. Er bildet mit seinen Strukturen das Riechhirn. Der Begriff Limbus nimmt seinen Ursprung aus dem lat. und bedeutet *Saum*. Somit beschreibt das limbische System bestimmte Hirnareale, die sich wie ein Saum um den Balken und das Zwischenhirn herum lagern. Zum limbischen System gehören: die Hippocampusformation mit HC (einschließlich Gyrus Dentatus, GD) und Gyrus parahippocampalis mit Subiculum und Area entorhinalis, Fornix, Gyrus cinguli, Corpus amygdaloideum und Corpus mamillare. Die Afferenzen und Efferenzen des limbischen Systems bilden den Papez-Neuronenkreis. Eine seiner wichtigsten Funktionen ist die Überführung von Inhalten vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Kommt es zu Störungen innerhalb dieses Kreises, sind erhebliche Merkfähigkeitsstörungen die Folge.

Afferenzen erhält der HC via Tractus perforans aus der Area entorhinalis, welche im Gyrus parahippocampalis liegt. Diese Afferenzen modulieren sensorische Impulse aus dem Neocortex und dem Rhinencephalon. Weitere Afferenzen ziehen vom Thalamus, Gyrus cinguli, Corpus amygdaloideum und über den Fornix aus dem Septum. Nahezu alle Efferenzen des HC verlaufen im Fornix. Im Papez-Neuronenkreis projiziert der HC über den Fornix in das Corpus mamillare via Fasciculus mamillothalamicus in den Ncl. Anterior des Thalamus. Dieser projiziert, als „spezifischer“ Thalamuskern für limbische Cortexbereiche, in den Gyrus cinguli. Vom Gyrus cinguli ziehen Efferenzen in die Area entorhinalis (im Gyrus parahippocampalis) und über den Tractus perforans schließt sich der Kreis zurück zum HC (Trepel, 2022).

Makroskopisch liegt der HC im Temporallappen an der medialen Wand des Seitenventrikelunterhorns. Er zählt mit dem GD und Teile des Gyrus parahippocampalis sowie Gyrus cinguli zum Archicortex. Die mikroskopische Rindenstruktur des Archicortex zeigt im Vergleich zum Neocortex einen dreischichtigen Aufbau. Der Neocortex im Vergleich zeigt einen sechsschichtigen Aufbau. Morphologisch setzt sich der HC aus Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA1-CA4), auch Ammonshorn genannt und aus dem Subiculum zusammen. Innen ist der HC dem Ependym des Seitenventrikels zugewandt. Die Faserschichten, Fimbria hippocampi, führen eine Vielzahl efferente, wenige afferente Fasern. Nach außen schließen sich drei klassische

Archicortexschichten an: das Stratum oriens (Korbzellschicht), Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht) und Stratum moleculare (Molekularschicht). Im Stratum moleculare lassen sich das Stratum radiatum und Stratum lacunosum unterscheiden. Das sogenannte Stratum radiatum-lacunosum dient hauptsächlich der interneuronalen Verschaltung zwischen Pyramiden- und Korbzellen (Trepel, 2022). Vor allem die glutamatergen Pyramidenzellen bilden mit ihren langen Fortsätzen das efferente System des Archicortex. In der CA1 Region befinden sich besonders viele kleine Pyramidenzellen. Die CA2 Region zeichnet sich durch besonders große Pyramidenzellen aus, die in CA3 lockerer angeordnet sind. Das Cornu ammonis endet mit der CA4 Region, welche histologisch eine aufgelockerte Struktur zeigt. Der Gyrus Dentatus legt sich c-förmig um die CA4 Region. In ihm ist das Stratum pyramidale durch das Stratum granulosum ersetzt. Hier befinden sich entsprechend kleinere, körnerzellartige Neurone. Von den Körnerzellen verlaufen Axone als Moosfasern zu den CA3 Pyramidenzellen und zu den Interneuronen. Vom entorhinalen Cortex erhält der Hippocampus seinen neuronalen Zufluss.

Die Verschaltung des HC wird schematisch in Abb.1 dargestellt. Im Papez-Neuronenkreis projizieren die Pyramidenzellen der Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis über den Tractus perforans auf die Körnerzellen im GD. Diese wiederum ziehen mit ihren Axonen (den Moosfasern) auf die Pyramidenzellen der CA3 Region. Die Pyramidenzellen der CA3, CA2 und CA1 Region projizieren auf das efferente System via Alveus und Fimbria Hippocampi zum Septum und Corpora mamillare. Zugleich leiten Pyramidenzellen der CA3 Region über sogenannte Schaffer-Kollaterale direkt zu den Pyramidenzellen der CA1 Region, die zurück zum Subiculum und entorhinalen Cortex ziehen. Während dieser Zirkulation kommt es zur funktionellen Veränderung der Pyramidenzellen (Langzeitpotenzierung). Dies stellt eine funktionell-strukturelle Basis des Gedächtnisses dar (Trepel, 2022).

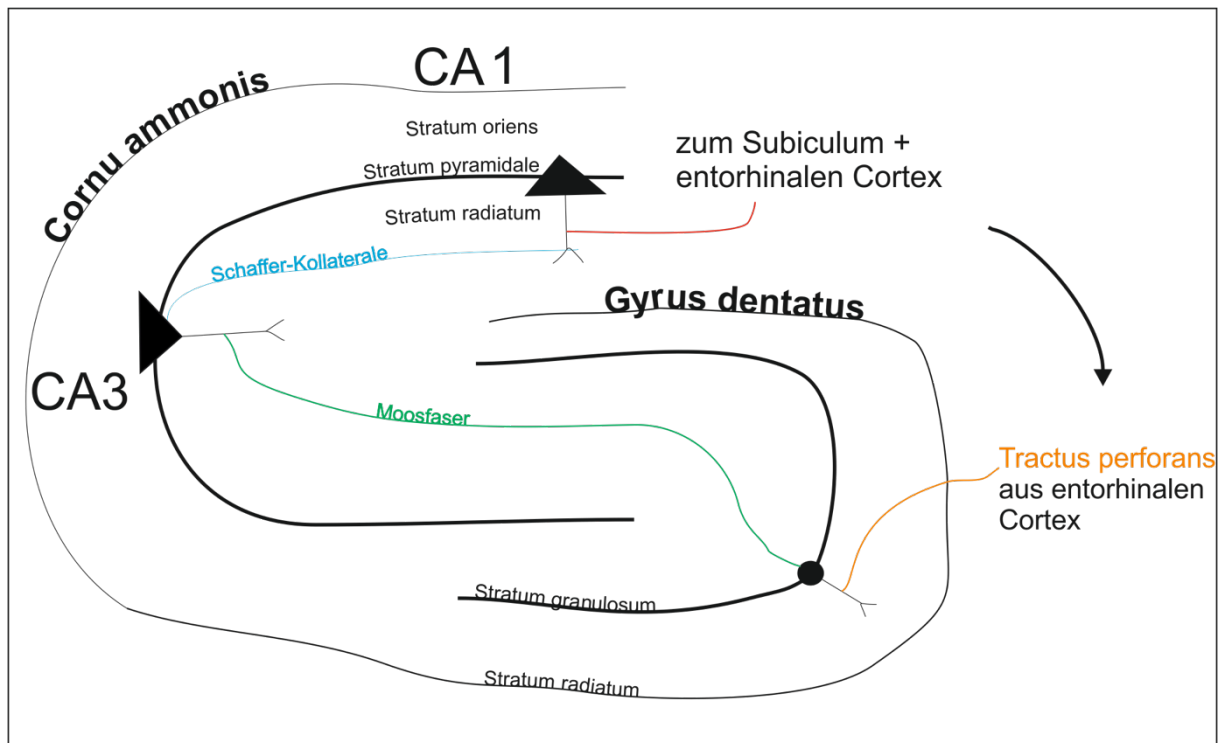


ABBILDUNG 1: TRISYNAPTISCHER ERREGUNGSWEG IM HIPPOCAMPUS

ERREGENDE SIGNALE GELANGEN AUS DEM ENTORHINALEN CORTEX VIA TRACTUS PERFORANS (ORANGE) ZU DEN KÖRNERZELLEN DES GYRUS DENTATUS. DIE KÖRNERZELLEN PROJIZIEREN ÜBER IHRE AXONE, MOOSFASERN (GRÜN), ZU DEN PYRAMIDENZELLEN DER CA3 REGION. ÜBER SCHAFFER-KOLLATERALE (BLAU) ERHALTEN DIE PYRAMIDENZELLEN DER CA1 REGION ERREGENDE SIGNALE. DIESE AXONE DER PYRAMIDENZELLEN WIEDERUM VERLAUFEN ZUM SUBICULUM, WELCHES ZURÜCK ZUM ENTORHINALEN CORTEX PROJIZIERT. HIER SCHLIEßT DER TRISYNAPTISCHE ERREGUNGSWEG.

1.3 TEMPORALLAPPENEPILEPSIE (TLE)

Die ILAE klassifiziert die Epilepsie 2018 als Anfälle mit fokalem (partiell), generalisiertem oder mit unbekanntem Beginn. Die Temporallappenepilepsie (TLE) zählt zu den fokalen Anfällen. Bei 35% aller Patienten mit Epilepsie (Erwachsene und Kinder), treten komplexe fokale Anfälle auf (Hauser, 1995). Nach der ILAE lässt sich die TLE heute in zwei Formen unterteilen. Bei der *mesialen* TLE beginnen die Anfälle in den medialen temporalen Strukturen und bei der *lateralen* und *neokortikalen* TLE beginnen die Anfälle in den übrigen Strukturen des Temporallappens (Siemes and Bourgeois, 2001).

Mit 90% Vorkommen zählt die *mesiale* TLE zu der häufigeren Form. Zu 50-70% liegt ihr eine Hippocampussklerose (HCS) zu Grunde (Blümcke et al., 2007).

Bei einer HCS kommt es hauptsächlich zum Neuronenverlust und Gliose des Hippocampus, einhergehend mit einer Sklerose und Schrumpfung des Gewebes, die zu einer abnormalen Bereitschaft zur spontanen, krankhaften Entladung von Neuronen führt. Es kommt zu einem

selektiven Neuronenverlust in den Sektoren der CA1 Region und im Prosubiculum sowie im Abschnitt CA4 und dem Hilus. Weitaus weniger betroffen sind die Sektoren der CA2, CA3 Regionen und das Subiculum. Neben der Sklerose des Hippocampus sind häufig auch noch weitere mesiale Strukturen des Temporallappens betroffen, wie der Mandelkern, Uncus und der parahippocampale Gyrus (Siemes and Bourgeois, 2001).

Die Pathogenese für eine HCS scheint multifaktoriell zu sein und ist bis heute noch nicht genau geklärt (Thom, 2014). Infolge von Entzündungen, Tumoren, Gefäßfehlbildungen oder Narben nach Durchblutungsstörungen kann eine HCS entstehen (French et al., 1993). Vor allem Fieberkrämpfe im Kindesalter zeigen mögliche Ursachen der Gliose und Sklerose. Die Hippocampusklerose verläuft zunächst einseitig und wird mit Hilfe einer Magnetresonanztomografie (MRT) diagnostiziert. In der T2-Wichtung lässt sich die Sklerose darstellen. In T1 gewichteten MRTs wird vor allem der Volumenverlust deutlich (Zettl and Sieb, 2021). Symptome der HCS sind häufig komplex fokale Anfälle. Störungen im Neuronenkreis GABAerger Interneurone im Hippocampus dienen hier als Schlüsselrolle.

Die Hippocampusklerose geht mit einer axonalen und synaptischen Reorganisation einher. Grundlage dieser Reorganisation sind unter anderem veränderte intra- und transzelluläre Mechanismen. Die synaptische Reorganisation lässt sich histologisch als Moosfasersprossung beobachten (Scheibel et al., 1974). Die Moosfasern der Körnerzellen im Gyrus dentatus ziehen nicht mehr wie ursprünglich in Richtung CA3 Region. Ihre Axone sprossen nun auch in Richtung des entorhinalen Cortex aus. Diese Moosfasern enthalten verstärkt Zink-Ionen, die mit der Färbemethode nach Timm sichtbar gemacht werden können (Timm, 1958). In Abb. 2 ist ein histologischer Schnitt, im chronisch epileptischen Gewebe, nach synaptischer Reorganisation, in der Färbemethode nach Timm dargestellt.

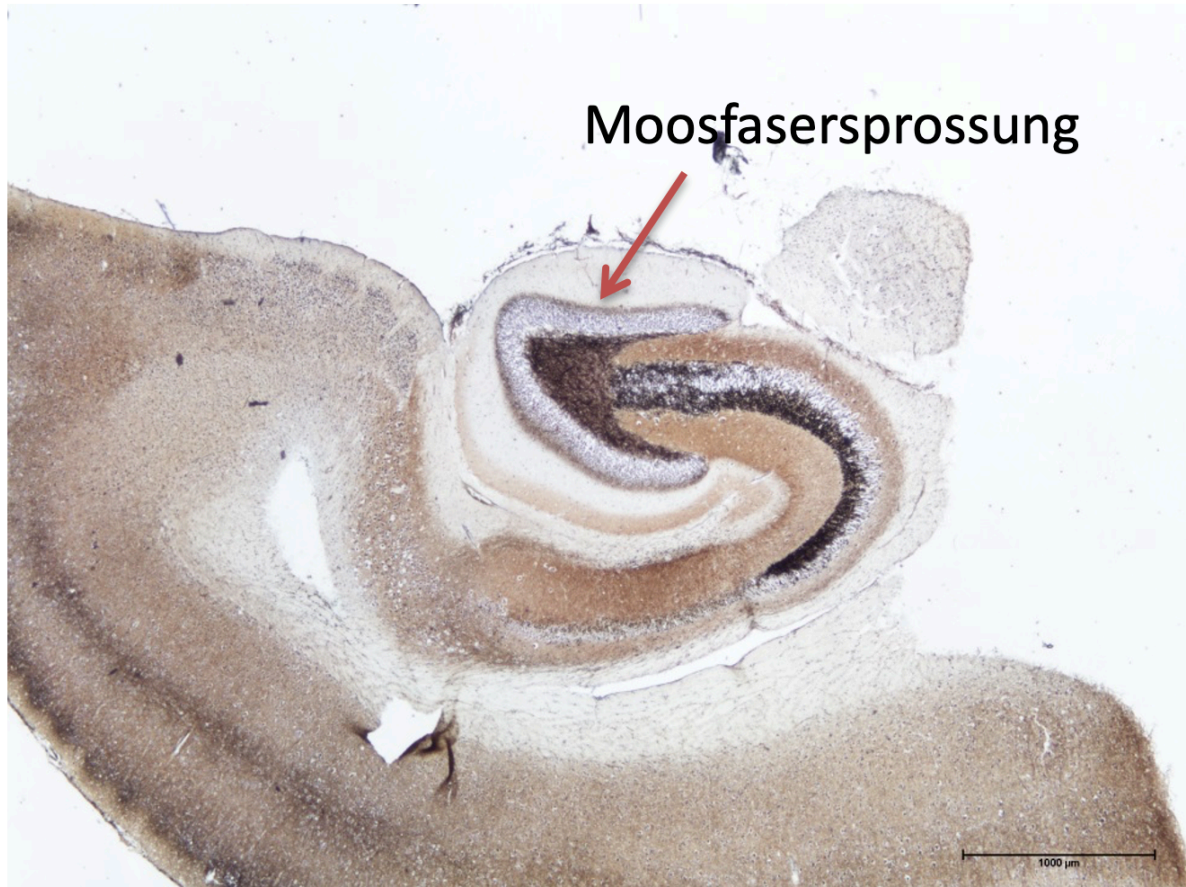


ABBILDUNG 2: HISTOLOGISCHER SCHNITT DES HIPPOCAMPUS IM EPILEPTISCHEN TIER

DARGESTELLT IST EIN HIPPOCAMPUSSCHNITT EINES MIT PILOCARPIN BEHANDELTEN TIERES (EPILEPTISCH), GEFÄRBT DURCH DIE FÄRBEMETHODE NACH TIMM. BEI EINEM EPILEPTISCHEN TIER ORGANISIEREN SICH DIE MOOSFASERN, DIE VON DEN KÖRNERZELLEN DES GYRUS DENTATUS ZU DEN PYRAMIDENZELLEN DER CA3 REGION ZIEHEN NEU UND STREUEN HIER BASAL IN RICHTUNG ENTORHINALEN CORTEX. DES WEITEREN KOMMT ES ZU EINER GERINGEREN ZELLKERNDICHTE IN DER CA1 REGION. DIE ZELLKERNE SIND HIER BLAU-VIOLETT ANGEFÄRBT.

DIESES BILD WURDE FREUNDLICHERWEISE VON FRAU DIPL.-BIOL. TINA SELLMANN (AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄT ROSTOCK) ZUR VERFÜGUNG GESTELLT.

1.4 PILOCARPIN ALS CHRONISCHES EPILEPSIEMODELL

Um die menschliche TLE im Tiermodell nachzuahmen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Modelle entwickelt. Mit Hilfe der chemischen Substanz Kainsäure, wurde Tieren im Kainat-Modell intraamygdaloidal, intrahippocampal oder systemisch Kainsäure appliziert. Dieser Vorgang musste über mehrere Stunden wiederholt werden, um einen Status epilepticus zu induzieren (Ben-Ari et al., 1979). Im Kindling-Modell wurden wiederkehrende elektrisch induzierte Stromimpulse genutzt, um Verhaltensveränderungen und lokale Anfallsentladungen

zu induzieren (Goddard, 1967). Dieses Vorgehen, wie auch das Kainat-Modell, waren sehr zeitintensiv und es zeigte wenig histopathologische Veränderungen, die im Zuge der menschlichen mesialen Temporallappenepilepsie (TLE) deutlich werden (Sharma et al., 2007).

Ein weiteres Chemokonvulsivum stellt das Pilocarpin dar, welches den Tieren in der vorliegenden Arbeit verabreicht wurde, um die humane mesiale TLE experimentell zu imitieren. Im Vergleich zum Kainat-Modell überzeugt das Pilocarpin-Modell mit einer hohen Zuverlässigkeit im Auftreten der Anfälle. Eine einzige intraperitoneale Injektion von 340 mg Pilocarpin/kg Körpergewicht, kombiniert mit einem peripheren Muscarinantagonisten, einem liquorgängigen Methylscopolamin, provoziert schließlich einen Status epilepticus (Turski et al., 1983). Nach einer Latenzzeit treten wiederholend spontane Anfälle auf, ausgehend von einer cerebralen Läsion (Leite et al., 1990). Wie bei der humanen mesialen TLE kommt es nach dem Einsetzen eines SE zu einer HCS. Dies verursacht eine Umstrukturierung des neuronalen Netzwerkes, einhergehend mit einer synaptischen Reorganisation (Wieser, Heinz Georg, 2004). Akut kommt es unter der Applikation von Pilocarpin zu einem Status epilepticus, welcher langfristig eine HCS hervorruft (Turski et al., 1983).

1.5 ROLLE VON KALIUMKANÄLEN BEI TLE

Eine wesentliche Rolle im Bereich der Ursachenforschung von Epilepsie spielen die verschiedenen Gen-Mutationen von Kaliumkanälen. Aufgrund ihrer Vielzahl an Genen lassen sie weiterhin viel Raum für Forschung.

Kaliumkanälen werden mehrere regulatorische Aufgaben innerhalb der Zelle zugesprochen. Zum einen kontrollieren sie die neuronale Erregbarkeit direkt durch das Gleichgewicht des Ionenpotentials, als auch indirekt durch den Stoffwechsel. Kaliumkanäle kommen in allen biologischen Zellen vor (Köhling and Wolfart, 2016). Sie bestimmen Form und Dauer des Aktionspotentials, steuern das Membranpotential und haben einen modulierenden Einfluss auf die Hormonsekretion (González et al., 2012). Diese facettenreichen Aufgaben sind nur durch ihre enorme Vielfalt möglich. Mittlerweile sind bis zu 80 Kaliumkanal-Typen bekannt, von denen 10% mit Epilepsie bei Menschen in Verbindung gebracht werden.

Kaliumkanäle sind mit intrazellulären negativ geladenen membraninpermeablen Proteinen und der elektrogenen Na/K-Pumpe für das Ruhemembranpotential (RMP) verantwortlich. Aufgrund unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Verteilung von Natrium-, Kalium- und Chlorid-Ionen, beträgt das RMP von Nervenzellen -60 bis -70 mV. Die genaue Ionenverteilung intrazellulär liegt bei Kalium (120-150 mmol/l), Natrium (5-15 mmol/l) und Chlorid (4-5 mmol/l). Die Kaliumkanäle werden durch eine Depolarisation aktiviert. Der Kalium-Auswärtsstrom steigt im Vergleich zum Natrium-Einstrom nur langsam an. Sein Maximum erreicht er erst, wenn der Natrium-Einstrom bereits zurückgeht. Aufgrund dieser langsamen Inaktivierung des Kaliumkanals kommt es vor der Repolarisation zu einer zeitweisen Hyperpolarisation (Speckmann and Alzheimer, 2013).

Es gibt verschiedene Gene, die für die Codierung der Kaliumkanäle relevant sind. Seit der ersten Kaliumkanal-Klonierung sind bis heute etwa 70 menschliche Gene bekannt, die für die verschiedenen Untereinheiten codieren. Kaliumkanäle bestehen aus vier Untereinheiten (I-IV=Tetramer) und jede Untereinheit aus weiteren zwei bis sechs Segmenten (S1-S6); α -Helices. Die einzelnen Segmente sind in die Doppellipidschichtmembran, als Transmembran-Proteinelemente eingelagert und gehen durch extra- sowie intrazelluläre Aminosäureketten ineinander über (Speckmann and Alzheimer, 2013). Abb. 3 zeigt ein Tetramer eines spannungsabhängigen Kaliumkanals, bestehend aus sechs Segmenten.

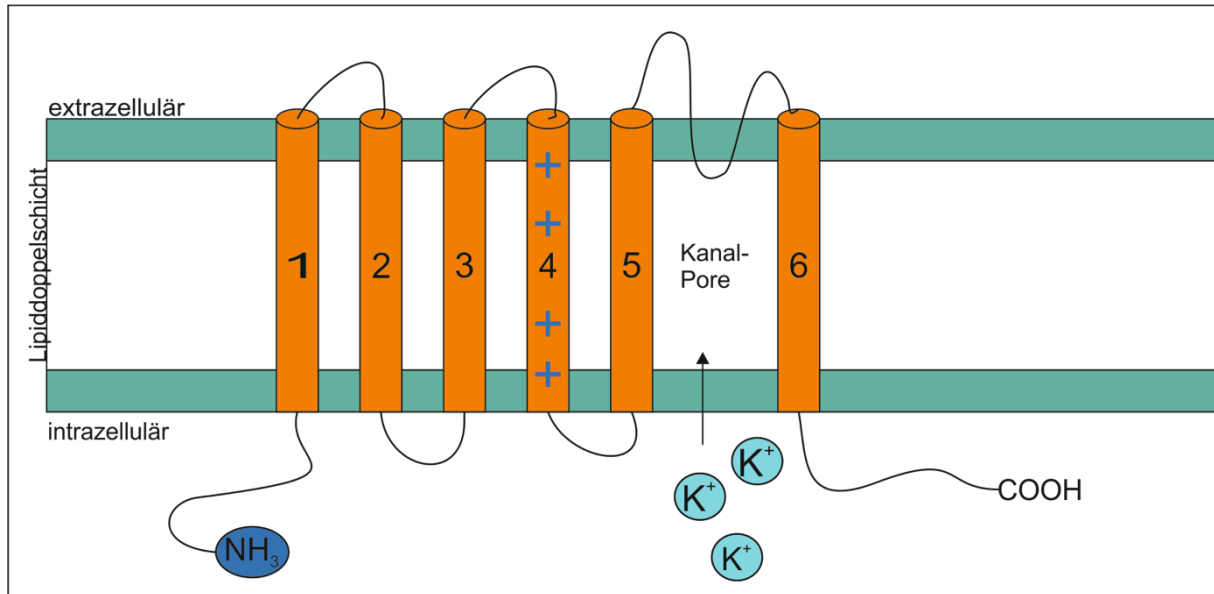


ABBILDUNG 3: **AUFBAU EINES SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALIUMKANALS**

SPANNUNGSABHÄNGIGER KALIUMKANAL MIT SECHS TRANSMEMBRANDOMÄNEN. HIER AUFGEFALDET DARGESTELLT: EINE VON VIER ALPHA-UNTEREINHEITEN, WELCHE SICH ZU EINEM TETRAMER ZUSAMMENLAGERN.

DIE VIER ALPHA-UNTEREINHEITEN BILDEN EINEN RING IN DER DOPPEL-LIPIDMEMBRAN UND DIENEN ALS SELEKTIVFILTER. NUR K⁺-IONEN KÖNNEN DIE KANALPORE PASSIEREN. DER BEREICH ZWISCHEN S5 UND S6 KLEIDET DIE KANALPORE AUS UND WIRD DURCH DIE SOGENANNT P-SCHLEIFE, WELCHE EXTRAZELLULÄR VERLÄUFT, VERBUNDEN. DAS POSITIV GELADENE S4 SEGMENT HAT EINE AMPHIPHILE EIGENSCHAFT UND BILDET DEN SPANNUNGSSENSOR. KOMMT ES ZU EINER DEPOLARISATION, ROTIERT S4 LEICHT IN DEN EXTRAZELLULÄREN RAUM, EINE MECHANISCHE KONFORMATIONSÄNDERUNG FINDET STATT. DER KALIUMKANAL ÖFFNET BIS ZUR REPOLARISATION. DAS N-TERMINALE ENDE DER SECHS SEGMENTE BILDET DIE PROTEINDOMÄNE UND LIEGT INTRAZELLULÄR. DURCH DIE BINDUNG DER PROTEINDOMÄNE AN EINEN REZEPTOR IN DER PORENWAND, KANN DER KANAL BLOCKIERT WERDEN (JAN AND JAN, 1992).

Unterteilt werden die Kaliumkanäle nach Anzahl der Segmente. Besteht die α -Untereinheit aus zwei Transmembrandomänen (TM-Domäne), werden sie funktionell auch als „inward rectifire“ bezeichnet, die K_{ir} -Familie. In einer weiteren Gruppe wird die α -Untereinheit der Pore aus vier Transmembrandomänen gebildet. Diese Gruppe wird als „leak **two pore domain**“, K_{2P} definiert. Sind sechs TM-Domänen an der Segmentbildung beteiligt, werden sie als „voltage-gated“ Kanäle, K_v deklariert. Diese spannungsabhängigen K⁺-Kanäle stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und sollen im Verlauf näher betrachtet werden. Zu dieser dritten Familie der Kaliumkanäle zählen auch die Calcium aktivierten Kaliumkanäle, K_{Ca} (Köhling and Wolfart, 2016). Abb. 4 zeigt eine Übersicht der drei Kaliumkanalfamilien.

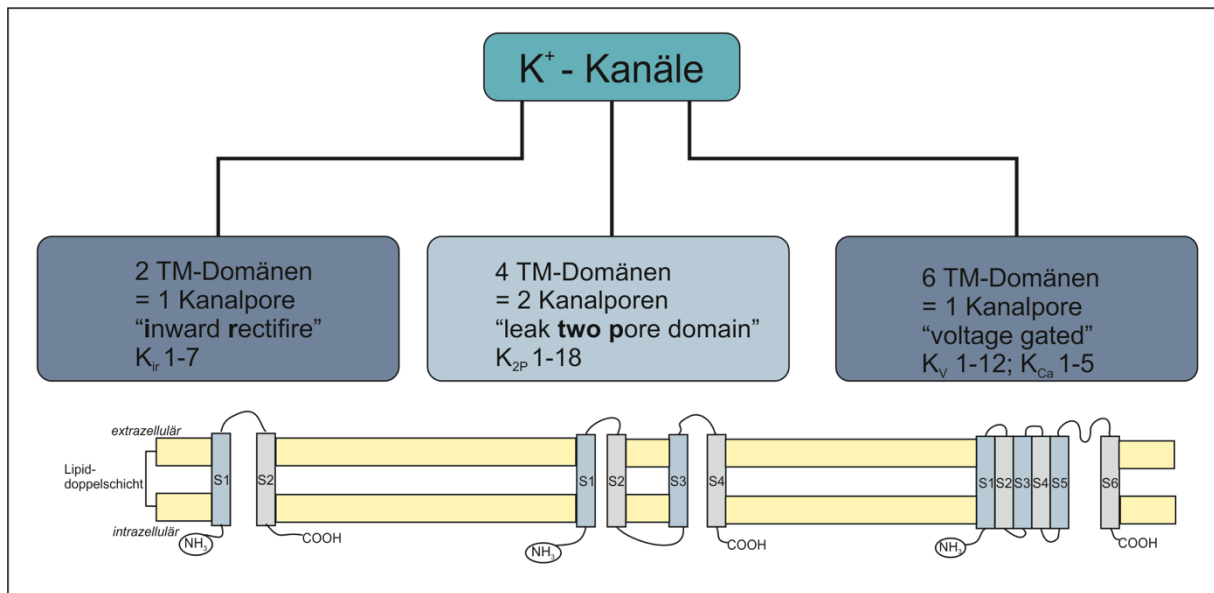


ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT DER KALIUMKANÄLE

SCHEMATISCH LASSEN SICH DIE VIELZAHL DER KALIUMKANÄLE IN DREI GROÙE GRUPPEN EITEILEN. UNTERSCHIEDEN WIRD DIE ANZAHL DER TRANSMEMBRANDOMÄNEN, DIE DIE KANALPORE BILDEN. BESTEHT DIE ALPHA -UNTEREINHEIT AUS **ZWEI** TRANSMEMBRANDOMÄNEN (2TM-DOMÄNEN), BEZEICHNET MAN SIE AUCH ALS „INWARD RECTIFIER“, DIE K_{IR} -FAMILIE. HIER SIND DIE KANÄLE K_{IR} 1-7 BEKANNT. IN EINER WEITEREN GRUPPE WIRD DIE ALPHA -UNTEREINHEIT DER PORE AUS **VIER** TRANSMEMBRANDOMÄNEN GEBILDET (4 TM-DOMÄNEN), MAN DEFINIERT SIE AUCH ALS „LEAK **TWO** PORE DOMAIN“, **K_{2P}**. BEKANNTE VERTRETER SIND K_{2P} 1-18. SIND SECHS TRANSMEMBRANDOMÄNEN (6 TM-DOMÄNEN) AN DER SEGMENTBILDUNG BETEILIGT SPRICHT MAN VON „VOLTAGE-GATED“ KANÄLEN, K_V . ZU DIESER DRITTEN FAMILIE DER KALIUMKANÄLE ZÄHLEN AUCH DIE CALCIUM AKTIVIERTEN KALIUMKANÄLE, K_V 1-12 UND K_{Ca} 1-5.

Einen großen Einfluss auf die Erregbarkeit von Nervenzellen hat das calciumabhängige Nachpotential, welches durch verschiedene Kaliumkanäle getragen wird. In der englischsprachigen Literatur ist der Begriff **afterhyperpolarisation potential (AHP)** gebräuchlich. Unterschieden wird das schnelle (fast, fAHP), endet nach wenigen ms, das mittlere (medium, mAHP) endet nach 100-300 ms und das langsame (slow, sAHP), endet nach bis zu mehreren s. Das fAHP wird häufig durch die BK-Kanäle getragen. Die BK-Kanäle zeigen eine große Leitfähigkeit (big conductance) für Calcium, wohingegen das mAHP durch SK-Kanäle, mit einer geringen Leitfähigkeit (small conductance) für Calcium, ausgelöst wird. Unter anderem seien auch hier die BK-Kanäle, sowie die KCNQ-Kanäle (=K_v7-Kanal) beteiligt. Die Gene KCNQ2 und KCNQ3 sowie ihre Genprodukte, K_v7.2 bzw. K_v7.3, erregten große wissenschaftliche Aufmerksamkeit, nachdem ihre Rolle bei idiopathischen Epilepsien entdeckt worden war (Biervert et al., 1998). Am wenigsten erforscht ist derzeit das sAHP (de Sevilla et al., 2006). Eine Arbeitsgruppe um (Schulz et al., 2012) fand heraus, dass das sAHP stark SK2-Kanal, heute K_{Ca}2.2. genannt, vermittelt wird. Ausschlaggebend dafür war ein signifikant reduzierter, SK2-Kanal vermittelter, Auswärtsstrom im chronisch epileptischen Gewebe. Dieser geht mit der Abnahme des sAHPs einher. Zusätzlich zeigte eine RT-PCR die Herunterregulation des SK2-Kanal-Transkripts. So

führte eine weitere Reduzierung von SK2-Kanälen zu einer Netzwerkdekompensation. Mehrere Arbeitsgruppen haben das sAHP genauer betrachtet, aber noch immer lässt es Raum für weitere Forschung. Eine Arbeitsgruppe um (Brehme et al., 2014) untersuchte die Wirkung des oral wirksamen Caseinkinase-2-Inhibitors Tetrabromotriazol (TBB) auf die Nachhyperpolarisation. Chronische orale TBB-Verabreichung verstärkt den langsamen Kaliumstrom. So kamen sie zum Ergebnis, dass das sAHP nach längerer Depolarisation ein wichtiger intrinsischer Mechanismus der neuronalen Hemmung ist. Dabei dämpft es die Erregbarkeit für bis zu 2 s. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass eine veränderte sAHP-Funktion anfällig für übererregbare Zustände wie Epilepsie sein könnte. Die derzeitige medikamentöse Therapie ist vorwiegend anfallshemmend und nicht antiepileptogen. Eine weitere Gruppe um (Schulze et al., 2020) untersuchte den antiepileptogenen Effekt von TBB. Sie fanden heraus, dass die TBB-Vorbehandlung das Auftreten von Anfällen nach Pilocarpin verzögerte und das Fortschreiten der Krankheit während der Epileptogenese verlangsamte. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass TBB behandelte epileptische Tiere deutlich weniger Caseinkinase-2 (CK2) enthielten, als TBB-behandelte Kontrollen. Des Weiteren verhinderte TBB sogar epileptische Aktivität im 0-Magnesium Modell. (Müller et al., 2018) stellte sich die Frage, ob es zu einem direkten Abbau von $K_{Ca}2.2$ -Proteinen kommt und welcher Signalweg hier beteiligt ist. Dazu verabreichten sie Gabazin (GZ) allein oder Gabazin zusammen Inhibitoren der proteasomalen und lysosomalen Proteinabbauwege, Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132) bzw. Chloroquin (CQ). In der Western-Blot-Analyse zeigte sich hier eine signifikante Abnahme des Gesamtproteingehaltes von $K_{Ca}2.2$ in den mit GZ behandelten Scheiben. Gleichzeitig konnte durch Inkubation mit den Inhibitoren MG132 und CQ, einer Abnahme des Proteingehaltes entgegengewirkt werden. Epileptiforme Nachentladungen wurden durch die gleichzeitige Anwendung von Hemmstoffen des Proteinabbaus nahezu verhindert.

(Kernig et al., 2012) untersuchte den genauen Signalweg und fand heraus, dass das sAHP, nach einer Folge von Aktionspotenzialen durch akut induzierte epileptiforme Aktivität, aufgrund eines Phosphorylierungsprozesses, vermutlich unter Beteiligung der ProteinkinaseA, rasch unterdrückt wird.

Als innovatives Ziel zur medikamentösen Behandlung der TLE untersuchte (Tiwari et al., 2019) den $K_{Ca}3.1$ -Kanal. Auch dieser zeigt sich im chronisch epileptischen Gewebe runterreguliert, mit einem reduzierten sAHP, weshalb es zu einer erhöhten Spikeausgabe kommt. Auch hier

ist die cAMP abhängige ProteinkinaseA beteiligt. Wird diese gehemmt, kommt es zur Normalisierung des Spike Outputs. (Greene et al., 2018) untersuchten den M-Strom, welcher durch $K_v7.2$ erzeugt wird. Die Neurotransmitter induzierte Unterdrückung des M-Stroms, welches die Verhaltensanfälle verschlimmerte. Eine rasche Wiederherstellung des M-Stroms, nach dem Status epilepticus (SE), beugte jedoch einem neuronalen Tod und wiederkehrenden Anfällen vor. Dies stellt einen großen therapeutischen Nutzen zur Behandlung der Epilepsie dar.

1.6 KETOGENE DIÄT

Die ketogene Diät (KD) wurde bereits Anfang der 1920er Jahre angewandt, um eine krampflösende Wirkung zu erzielen. Die krampflösende Wirkung ketogener Diäten korreliert positiv mit der Serumkonzentration von β -Hydroxybutyrat (BHB) im Blut. BHB ist einer der primären Ketonkörper, der bei der Ketose entsteht (Manville et al., 2020).

Die KD stellt eine wirksame Behandlung bei Epilepsie dar. Sie ist eine fettreiche und kohlenhydratlimitierte, aber protein- und energiebilanzierte Diät, die den Hungerstoffwechsel in verschiedenen Aspekten imitiert. Die klassische KD besteht in der Regel aus einem Makronährstoffverhältnis von 4:1 (4 g Fett auf je 1 g Protein und Kohlenhydrate zusammen). Die vorherrschende Kalorienquelle verlagert sich hier von Kohlenhydraten auf Fette. Niedrigere Verhältnisse von 3:1, 2:1 oder 1:1 werden als modifizierte ketogene Diät bezeichnet. Sie können je nach Alter, individueller Verträglichkeit, Grad der Ketose und Proteinbedarf Anwendung finden. Um die Compliance, meist junger Patienten, zu erhöhen, wurden weitere *entspannte* Varianten entwickelt. Darunter die modifizierte Atkins-Diät, die Behandlung mit einem niedrigem glykämischen Index und die ketogene Diät in Kombination mit mittelkettigem Triglyceridöl (McDonald and Cervenka, 2018).

Trotz neuer medikamentöser Therapieansätze, gibt es immer noch Kinder und Erwachsene, deren Anfälle refraktär auf modernste Therapie sind (Kwan and Brodie, 2000). Glucose, die bei ausgewogener Ernährung eine Hauptenergiequelle für die neurologische Aktivität im Gehirn darstellt, wird dem Körper bei der ketogenen Diät entzogen. Bei kohlenhydratreicher und fettreicher Ernährung wandeln die Hepatozyten in der Leber verstärkt Fette in Fettsäuren und Ketonkörper um, die über die Blut-Hirn-Schranke in das neuronale Gewebe gelangen (Löffler, 2007). Die Ketonkörper ersetzen die Glucose als vorherrschenden neuronalen Energieträger.

Eine kontrollierte Ketose reduziert nachweislich die Häufigkeit von Anfällen (Kinsman et al., 1992). Eine Metaanalyse von sieben Studien zur klassischen ketogenen Diät bei Jugendlichen und Erwachsenen ergab, dass die Diät bei der Hälfte der behandelten Patienten zu einer Verringerung der Anfälle um 0,50% führte, und 13% der Patienten, die auf die Diät ansprachen, waren anfallsfrei (Payne et al., 2011).

1.7 ZIELSTELLUNG

Epilepsie ist trotz intensiver Forschung eine uns immer noch dominierende Krankheit, die bisher ausschließlich symptomatisch therapiert wird. Nur 40% der Patienten mit TLE sprechen auf eine medikamentöse Therapie an. Daher gibt es immer noch offene Fragen bezüglich pharmakologischer Wirkung von Antikonvulsiva.

Der spannungsgesteuerte KCNQ-Kanal/ K_v7 -Kanal ist unter den genetischen Formen der Epilepsie am häufigsten betroffen und wurde in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet. Die K_v7 -Kanal-Varianten sind je nach ausgewählter Population für 1-13% der genetisch diagnostizierten Epilepsiepatienten verantwortlich (Ritter et al., 2021).

Ein etablierter Kaliumkanalblocker ist XE991 (Sato et al., 2022). Durch pharmakologische Hemmung mit XE991 konnte festgestellt werden, dass das sAHP durch K_v7 - und K_{ir6} -Kanäle vermittelt wird. Das langsame nachhyperpolarisierende Potential hemmte die neuronale Erregbarkeit für Sekunden und prägt das Entladungsverhalten eines Neurons maßgeblich (Laker et al., 2021).

Aufgrund der vorangestellten Überlegungen soll die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantworten:

- 1a:** Führt eine $GABA_A$ -Rezeptor Blockade zu Spontanaktivität im lebenden Hirnschnitt?
- 1b:** Ist diese Spontanaktivität zwischen gesunden und mit Pilocarpin behandelten Ratten unterschiedlich?
- 2:** Gibt es Veränderungen in der Spontanaktivität durch den KCNQ Kanal Blocker XE991?
- 3:** Wird die akute, im Schnitt ausgelöste, Spontanaktivität durch einen putativen Kalium Kanal Agonisten, β -Hydroxybutyrat (BHB), reduziert?

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 ERKLÄRUNG

Die vorliegende Studie wurde im Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling durchgeführt. Entsprechend der geltenden gesetzlichen Bestimmungen zum Tierschutz, wurden die Tötung, sowie die Narkose der Tiere, ausschließlich durch geschulte Mitarbeiter des Institutes der Physiologie, unter der laufenden Tierversuchsgenehmigungsnummer (7221.3-1.1-054/18) durchgeführt. Alle weiteren Schritte, wie Organentnahme, Schnitthanfertigung und Messungen, wurden eigenständig durchgeführt.

2.2 VERSUCHSTIERE

Für die gesamten Versuche wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, bezogen von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere konnten in separaten Käfigen gehalten werden. Nahrung und Wasser standen ihnen ad libitum zur Verfügung. Der Tierstall wurde täglich durch einen Mitarbeiter des Instituts gereinigt, zugleich konnten die Tiere täglich auf Unversehrtheit kontrolliert werden. Der Tierstall war zu jeder Zeit klimatisiert und von sechs bis 18 Uhr beleuchtet (Tag-Nacht-Rhythmus).

2.3 MATERIALIEN

2.3.1 GAS

TABELLE 1: VERWENDETE GASE

Gas	Hersteller
Carbogen 95% O ₂ , 5% CO ₂	Linde, D-Wiesbaden

Das Carbogen stellt einen physiologischen pH-Wert bei 7,4 in der ACSF-Lösung ein. Durch kontinuierliche Begasung der Lösung unterstützt das Gas die Vitalerhaltung des Gewebes und ist somit obligat.

2.3.2 CHEMIKALIEN

Alle Substanzen wurden mit einer Analysewaage abgewogen und vollständig mit destilliertem Wasser in Lösung gebracht. Mit Hilfe eines pH-Meters wurde der pH-Wert gemessen und überprüft. Je nach Zugabe von HCl und NaOH wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Die Osmolarität der Lösungen wurde mit Hilfe eines Osmometers ermittelt.

TABELLE 2: VERWENDETE CHEMIKALIEN FÜR DIE LÖSUNGEN

Chemikalie	Hersteller, Bestellnummer	MW [g/mol]
NaCl	Sigma, D/S-7653	58,44
NaHCO ₃	Sigma, D/S-5812	84,01
KCl	Merck, D/1.04936.1000	74,56
NaH ₂ PO ₄	Sigma, D/S-8282	120
CaCl ₂	Sigma, D/C-5667	111
MgCl ₂	Sigma, D/M-8266	95,22
Glucose	Sigma, D/G-3782	180,16
Sucrose	Sigma, D/S-5254	342,3

2.3.3 LÖSUNGEN

ACSF-Lösung

Die ACSF-Lösung (artificial cerebrospinal fluid) dient der Vitalerhaltung der akuten Hirnschnitte. Es handelt sich hierbei um eine mit Bicarbonat gepufferte Salzlösung. In ihrer Zusammensetzung entspricht sie der cerebrospinalen Flüssigkeit. Vor Verwendung musste die Lösung mindestens für eine halbe Stunde mit Carbogen begast werden, damit sich ein physiologischer pH-Wert von 7,4 einstellt und eine Sauerstoffsättigung vorliegt. Die Begasung der Lösungen wurde im gesamten Experiment beibehalten.

Nachdem die 400 µm Schnitte im Vibratom (Integraslice 7000 smz; Campden Instruments, UK) angefertigt wurden, konnten sie in ein Gefäß mit begaster ACSF-Lösung umgelagert werden. Dort equilibrierten sie bei Raumtemperatur für 1h. Die ACSF-Lösung durchfloss auch die Mess-

kammer und sorgte somit für eine optimale Ernährung der Hirnschnitte. Hier wurde die Lösung zusätzlich auf Körpertemperatur, 37°C, erwärmt. Die gelösten Ionen in der Lösung ermöglichen eine elektrische Leitung in der Kammer.

TABELLE 3: ACSF-LÖSUNG

Chemikalien	MW [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	125
NaHCO ₃	84,01	26
KCl	74,56	3
NaH ₂ PO ₄	120	1,25
CaCl ₂	111	2,5
MgCl ₂	95,22	1,3
Glucose	180,16	10
<i>pH-Wert</i> <i>Osmolarity [mosmol]</i>	7,4 306-314	

Sucrose-Lösung

Die Sucrose-Lösung wurde direkt nach der Präparation verwendet. Dazu wurde die Sucrose-Lösung auf 0°C herunter gekühlt. Der Sauerstoffbedarf des Gewebes wird somit reduziert, um eine bei Raumtemperatur vorhandene Hypoxie zu vermeiden.

TABELLE 4: SUCROSE-LÖSUNG

Chemikalien	MW [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	125
NaHCO ₃	84,01	26
KCl	74,56	3
NaH ₂ PO ₄	120	1,25
CaCl ₂	111	2,5
MgCl ₂	95,22	1,3
Glucose	180,16	10
Sucrose	342,3	75
<i>pH-Wert</i> <i>Osmolarity [mosmol]</i>	7,4 326-328	

2.3.4 PHARMAKA

TABELLE 5: VERWENDETE PHARMAKA

Pharmakon	Hersteller
Diethylether 74,12 g/mol	J.T. Baker, NL
β -Hydroxybutyrat	Sigma, D
Gabazine (Hydrobromide)	Tocris, UK
XE991 (Dihydrochloride)	Bio-Techne GmbH, D
Pilocarpin	Bio-Techne GmbH, D
N-Methyl-Scopolamin	Sigma, D
Diazepam	Ratiopharm, D

2.3.5 LÖSLICHKEITSHINWEISE UND KONZENTRATIONEN

Gabazine (Hydrobromide) **5mM**, XE991 (Dihydrochloride) **20 mM** sowie das β -Hydroxybutyrat **100 mM** wurden als separate Stammlösungen angesetzt, aliquotiert, bei -20°C bis zur Verwendung gelagert und konnten frisch zum jeweiligen Experiment mit folgenden Endkonzentrationen in die ACSF-Lösung pipettiert werden:

- Gabazine **5 μM**
- XE991 **20 μM**
- β -Hydroxybutyrat **100 μM .**

2.3.6 MEHR- UND EINMALMATERIAL

TABELLE 6: VERWENDETES MEHR- UND EINMALMATERIAL

Material	Hersteller
Glasflasche, 500ml	Schott, D
Glasflasche, 1000ml	Schott, D
Glasflasche, 2000ml	Schott, D
Guillotine (small animal decapitator)	Stoelting, US
Infusionssysteme	Braun, D
Messkolben, 500ml	Hirschmann, D
Messkolben, 1000ml	Hirschmann, D

Messkolben, 2000ml	Hirschmann, D
Objektträger	Bresser, D
Pipette, 10µl - 100µl	Eppendorf, D
Pipette, 100µl - 1000µl	Eppendorf, D
Pipettenspitzen, versch. Größen	Greiner Bio-One, A
Rasierklingen, Stahl	Campden Instruments, GB
Rundfilterpapier, 55mm Ø	Carl Roth, D
Sekundenkleber	UHU, D
Silberdraht 0,005 Zoll	Science Products, D

2.3.7 GERÄTE UND SOFTWARE

TABELLE 7: VERWENDETE GERÄTE UND SOFTWARE

Gerät/Software	Hersteller
Analog-Digital-Verstärker, Power 1401	CED, UK
Aufbewahrungskammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, D
Bad Haake 5P	Thermo, D
Badthermostat Haake C 10	Thermo, D
CorelDRAW X6	Corel, D
Faradaykäfig, Eigenbau	IPHYS, Rostock, D
Interfacekammer, BSC-HAT	Havard Apparatus, US
Kaltlichtquelle, KL 1500 LCD	Schott, D
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, D
Magnetrührer, RET-GS	IKA, D
Magnetrührer, RH basic 2	IKA, D
Mikroskop, Leica MZ6	Leica, D
Microsoft Office Excel 2019	Microsoft, D
MacBook Pro (13-inch, M1, 2020)	Apple, USA
Osmometer, Osmomat 030	Gonotec, D
PC	Inter Core i5, Windows 7, HP, D
pH-Meter, CG840, Omnilab	Schott, D
Pipettenpuller, PIP5	HEKA Elektronik, D

Rollerpumpe, Perimax	Spetec, D
Schnittkammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, D
Signal 2.16	CED, UK
SigmaStat	Systat Software Inc., USA
Temperaturregler, TC-10	npi electronic, D
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, USA
Verstärker, EXT-08 und DPA-2FX	Npi electronic, D
Vibratom, Integraslice 7000 smz	Campden Instruments, UK
Waage, MC-1 Analytic AC 120S	Sartorius, D

2.4 METHODE

2.4.1 PRÄPARATION

Vor Beginn der Präparation wurde ein Tier aus der laufenden Versuchsreihe im gewohnten Käfig in den Präparationsraum transportiert. Unter dem Chemikalienabzug wurde nun der Tierkäfig von einem geschulten Mitarbeiter des Institutes platziert und das Tier erhielt eine Narkose mit Hilfe von 20 ml Diethylether. Das Narkosemittel wurde auf Papiertüchern über dem Käfig positioniert. Die Wirkung des Diethylethers wurde mit mehrmaligen Schmerzreizen am Fuß des jeweiligen Versuchstieres überprüft. Erst beim Fehlen einer Antwort auf den Reiz des Tieres konnte schnellstmöglich mit der Dekapitation, durch einen geschulten Mitarbeiter des Institutes, begonnen werden. Um der, nach dem Tod eintretenden, Hypoxie entgegenzuwirken, wurde umgehend mit der Präparation begonnen. Als erstes erfolgte ein medianer Hautschnitt mit Hilfe eines Skalpells entlang der Sutura sagittalis von frontal nach occipital. Damit das Periost sichtbar wird, musste das Fell nach frontal gezogen werden. Es folgten drei knöcherne Schnitte mit Hilfe einer Präparationsschere. Zwei lateral des Canalis vertebralis und ein medianer Schnitt beginnend am Foramen magnum entlang der Sutura sagittalis bis zur Höhe der Sutura coronalis. Die Schädelkalotte ließ sich nun nach lateral zur jeweiligen Seite mit einer Pinzette aufbrechen. Überschüssige Anteile der Dura mater wurden vorsichtig entfernt. Das Cerebellum wurde mit einem Skalpell sauber abgetrennt. Im letzten Präparationsschritt erfolgte das Herauslösen des Cerebrums, indem die Nervi optici mit einem Spatel entlang der Schädelbasis durchtrennt wurden. Nach dem Umdrehen des Kopfes konnte das Großhirn aus der offenen Calotte vorsichtig herausgeholt werden. Schnellstmöglich wurde das Großhirn in die Sucrose-Lösung umgelagert. Um der Hypoxie weiterhin entgegen zu wirken, wurde die Lösung schon 15-30 min vor der Dekapitation auf ca. 0 °C runtergekühlt und mit Carbogen begast. Vom Schnitt der Guillotine bis zum Herauslösen des Cerebrums vergingen maximal 60 s. Bei länger andauernden Präparationen, ist davon auszugehen, dass das Hirngewebe zu viel Schaden genommen hat und die Schnitte somit nicht mehr verwendet werden können.

2.4.2 SCHNITT

Am Vibratom wurde eine Schnittstärke von 400 μm und eine Geschwindigkeit von 0,1 mm/s eingestellt. Eine Klinge wurde in das Vibratom eingespannt. Der Präparationsschlitten wurde mit Crushed-Eis extern gekühlt und mit begaster Sucrose-Lösung vorbereitet. Nun musste das Cerebrum aus der Sucrose-Lösung herausgeholt und auf Rundfilterpapier getrocknet werden, damit es anschließend mit Sekundenkleber auf dem Magnetsockel des Präparationsschlitten geklebt werden konnte. Dieser Arbeitsschritt erfolgte mit hoher Präzision, aber sehr zügig, um der Hypoxie entgegen zu wirken. Geklebt wurde kranial auf den Cortex. Anschließend wurde der Sockel mit dem Cerebrum im Präparationsschlitten platziert, das occipitale Ende zeigte dabei in Richtung Klinge. Der Präparationsschlitten wurde mit Sucrose-Lösung aufgefüllt und mit Carbogen begast (Abb. 6).

Um an den Hippocampus zu gelangen, wurde der kaudale Teil des Cerebrums mit einem ersten Schnitt horizontal auf Höhe der A. cerebri media abgetrennt. Nach dem Entfernen des basalen Anteils wurden die Strukturen der beiden Hippocampi sichtbar und die Schnitthanfertigung konnte beginnen. Um einen kortikalen Einfluss auf die epileptische Aktivität auszuschließen, wurden die feinen 400 μm Schnitte mit 90° abgewinkelten s.c. Injektionskanülen vom Cortex befreit und vorsichtig mit einer Transferpipette in ein Schnittgefäß, welches mit ACSF-Lösung versehen war, transferiert. Dort equilibrierten die Schnitte für mindestens 60 min unter Carbogenbegasung, bevor die Messungen beginnen konnten. In Abb. 5 wurde der Ablauf eines Messtages skizziert.

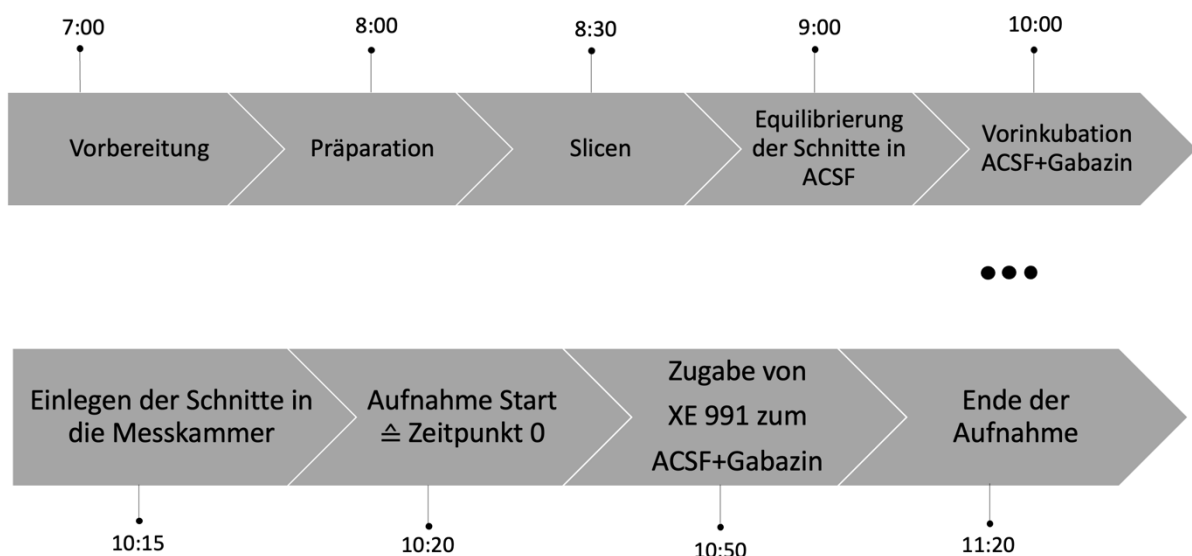


ABBILDUNG 5: ZEITSTRAHL EINES MESSTAGES

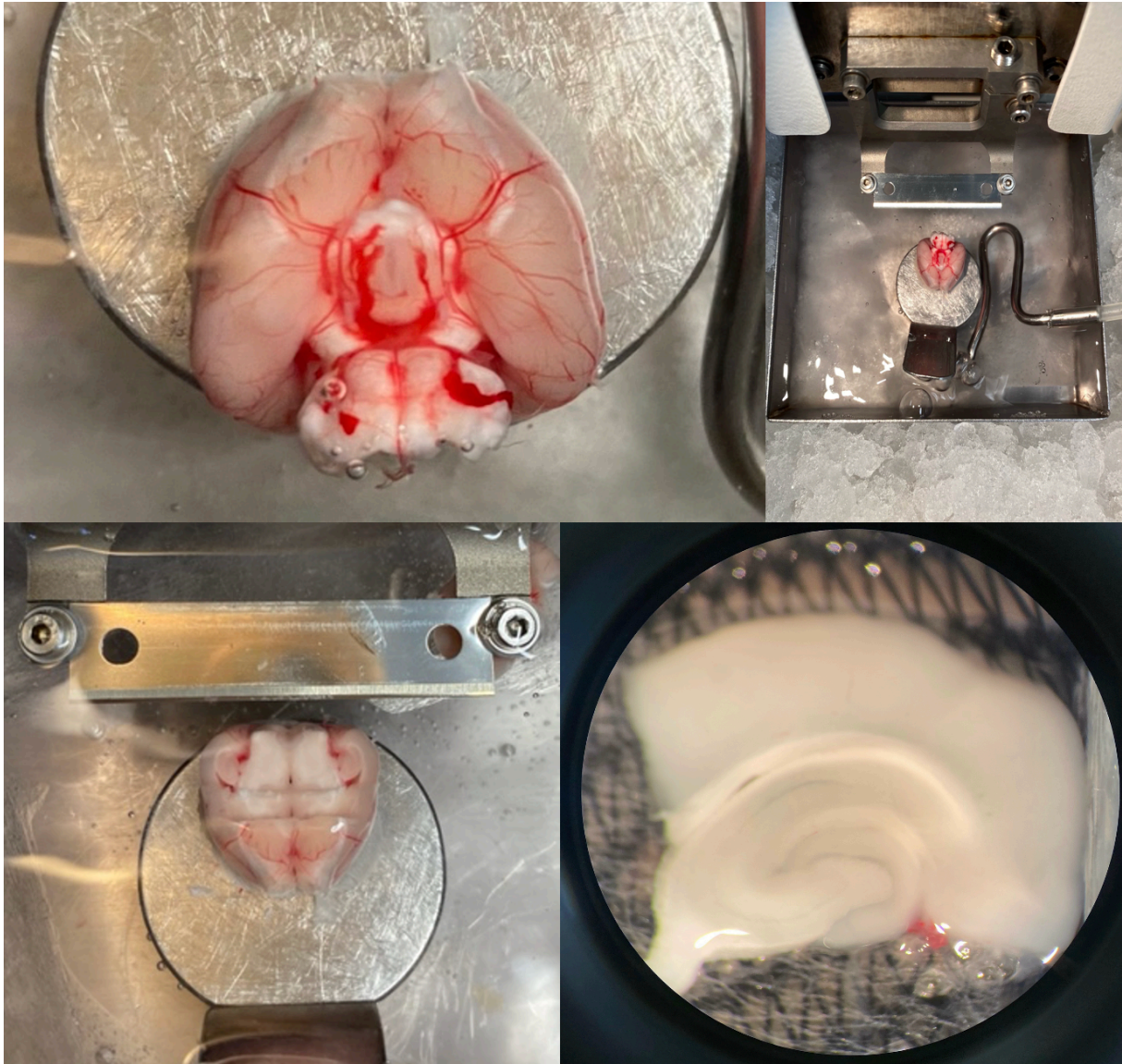


ABBILDUNG 6: **DETAILAUFNAHME DER SCHNITTANFERTIGUNG**

OBEN LINKS - CEREBRUM MIT CEREBELLUM FIXIERT AUF EINEM PRÄPARATIONSSCHLITTEN; **OBEN RECHTS** – PRÄPARATIONSSCHLITTEN MIT CEREBRUM IN EISGEKÜHLTER SUCROSE-LÖSUNG UND BEGAST MIT CARBOGEN; **UNTEN LINKS**- HORIZONTALER SCHNITT AUF HÖHE DER A. CEREBRI MEDIA, BEIDE HIPPOCAMPI WERDEN SICHTBAR; **UNTEN RECHTS** - 400 µM SCHNITT EINES HIPPOCAMPUS MIT ANGRENZENDEM CORTEX

2.4.3 AUFBAU MESSPLATZ

Das Herzstück des Messplatzes ist eine Harvard Apparatur, die sogenannte Messkammer. Sie wird umgeben von einem Faraday-Käfig und in ihr liegen die Hirnschnitte. Des Weiteren befinden sich in dem Faraday-Käfig zwei Ableitelektroden auf jeweils einem separaten Stativ. Der Schnitt wurde über die Messkammer mit Carbogen versorgt, kontinuierlich mit ACSF-Lösung durchflossen und durch eine eingebaute Heizung wurde eine Körpertemperatur von 37°C nachempfunden. Die ACSF-Versorgung erfolgte von extern. Diese stand in einem 37-40 °C war-

men Wasserbad und wurde permanent mit Carbogen begast. Durch eine Rollerpumpe gelangte die ACSF-Lösung über Infusionsschläuche unter gleichbleibendem Druck in die Kammer und in den Schnitt. Nach komplettem Durchfluss lief die Lösung in einen Auffangbehälter ab. Die Temperatur in der Messkammer wurde durch einen Temperatursensor überwacht. Je nach Differenz ließ sich der optimale Sollwert von 37 °C einstellen.

Im Messbereich der Kammer befanden sich zwei mit einem Nylonnetz unterfütterte Flächen. Hier wurden die Hirnschnitte platziert. Das Nylonnetz diente als fixierende Unterlage, auf ihm sollte stets ein Flüssigkeitsspiegel zu sehen sein.

Für die Signalaufzeichnung der beiden Schnitte dienten zwei Ableitelektroden. Diese Silberdrahtelektroden wurden in Glaspipetten platziert. Vor Beginn eines jeden Messtages wurden die Glaspipetten mit einem Pipettenziehgerät neu angefertigt und anschließend mit ACSF-Lösung befüllt. Nur so konnte eine elektrische Leitung gewährleistet werden.

Die spontan ausgelösten epilepsietypischen Potentiale (ETP) wurden als Feldpotentiale in der Ableitelektrode aufgenommen und durch einen Verstärker bzw. Vorverstärker, sowie einem Analog-Dialog-Wandler verarbeitet und mit dem Programm Signal© 2.16 aufgezeichnet. Alle Geräte, sowie der Messplatz an sich, wurden mit dem Faraday Käfig geerdet, um das Rauschen während der Ableitung auf ein Minimum zu reduzieren.

2.4.4 FELDPOTENTIALMESSUNG

Vor Beginn einer jeden Messung wurde der Messplatz vorbereitet. Während die Hippocampischnitte in der ACSF-Lösung inkubierten (1h), konnte das gesamte Schlauchsystem des Messplatzes mit 50 ml destilliertem Wasser gespült werden, um Lösungsreste aus vorangegangenen Messungen auszuschließen. Der Computer, die Heizung, das Wasserbad sowie die gesamte Apparatur wurden eingeschaltet. Sobald die Schläuche ausreichend durchspült wurden, konnte die ACSF-Lösung angeschlossen werden. Erreichte die Messkammer eine Temperatur von 37 °C, wurden zwei Hirnschnitte gleichzeitig in der Kammer platziert. Hier inkubierten sie für weitere 5 min (siehe Zeitstrahl Abb. 5). Währenddessen konnten die Glaspipetten, mit Hilfe des Pipettenpuller, gezogen werden.

Nach vollständiger Inkubationszeit wurden zwei Ableitelektroden im Schnitt in Höhe der CA1-Region Stratum pyramidale platziert (Abb. 7). Ein Auflichtmikroskop diente hier der genauen Orientierung im Schnitt, sowie der optimalen Eindringtiefe in das Gewebe.

Sobald beide Ableitelektroden im Schnitt exakt saßen, konnte die Aufzeichnung für eine Stunde starten und das Rauschen wurde im Programm Signal© auf ein Minimum reduziert (hier Zeitpunkt=0; Beginn der Aufzeichnung). Die Spontanaktivität wurde mit Hilfe von Gabazin ausgelöst. Gabazin wirkt als GABA_A-Rezeptor-Antagonist konvulsiv auf das Nervensystem, durch Blockade des inhibitorischen Chloridstroms über den GABA_A-Rezeptor an der Synapse (Silbernagel 1994). Eine inhibitorische Hyperpolarisation wird somit verhindert. Demnach kann Gabazin eine exzitatorische Wirkung zugeschrieben werden.

Nachdem die Hippocampusschnitte 1h nach Schnittanfertigung in der ACSF-Lösung bei Raumtemperatur equilibrierten, konnten sie nachfolgend in eine mit Gabazin versetzte ACSF-Lösung mit finaler Konzentration von 5 µM transferiert werden. Nach 30 min Inkubation im Messbecher und weiteren 30 min in der Messkammer konnte davon ausgegangen werden, dass ausreichend GABA_A-Rezeptoren blockiert wurden, um Spontanaktivität aufzuzeichnen.

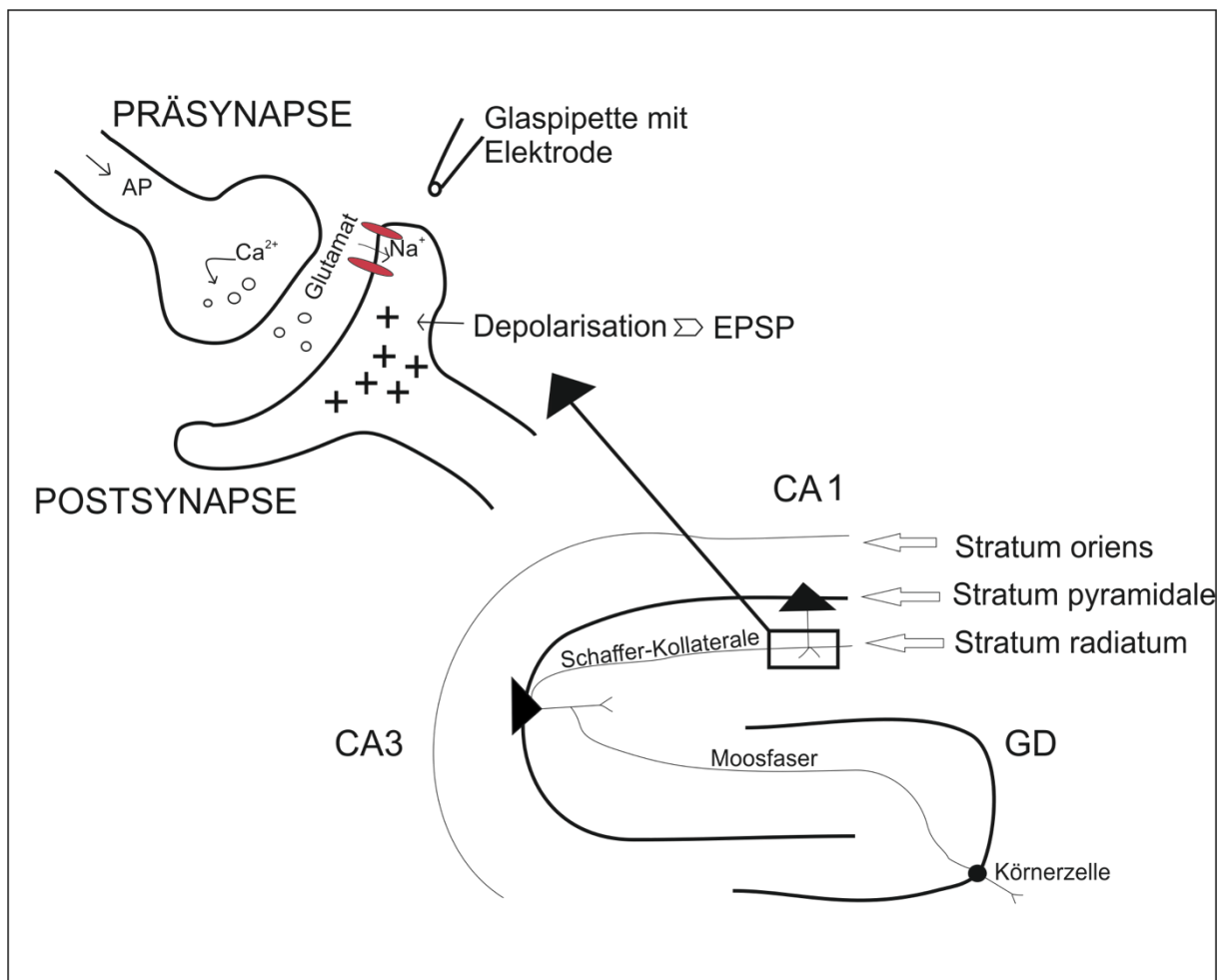


ABBILDUNG 7: FELDPOTENTIALMESSUNG

2.4.5 PILOCARPIN MODELL

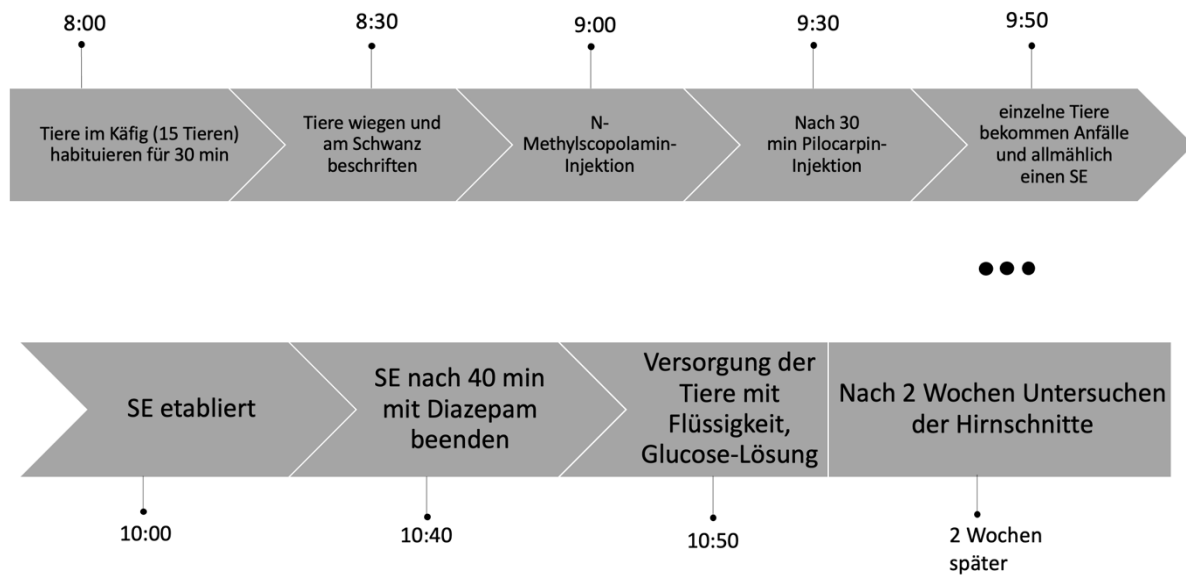


ABBILDUNG 8: ZEITSTRAHL ZUM ABLAUF DES PILOCARPIN-MODELLS

Das Pilocarpin-Modell ist ein weit verbreiteter Versuchsansatz und wurde in einer Reihe von Laboren modifiziert (Curia et al., 2008). Ursprünglich wurde das Modell von der Arbeitsgruppe um Turski 1983 entwickelt. Pilocarpinhydrochlorid (340 mg/kg KG) wurde im Versuch verwendet, um einen verlängerten Status Epilepticus (SE) zu induzieren (Brehme et al., 2014).

Im angewandten Modell wurden 45 männliche Wistar Ratten, Charles River, im Alter von 30 Tagen, 100-130 g schwer untersucht. 15 Kontrollratten erhielten Natriumchlorid 0,9% anstelle von Pilocarpin. Alle Tiere bekamen als peripheren Muskarinantagonist N-Methyl-Scopolamin (1mg/kg KG), um eine periphere cholinerge Wirkung und die Letalität von Pilocarpin zu verringern (Brehme et al., 2014).

In dem Zeitstrahl in Abb. 8 wurde der Ablauf der Pilocarpin-Behandlung veranschaulicht. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in einem großen Tierkäfig zu je 15 Tieren in einen ruhigen Raum gebracht. Dort habituieren sie für 20-30 min. Nach der Gewöhnung folgte die Dokumentation. Jedes Tier wurde für eine genaue Dosierung gewogen und am Schwanz mit einer Nummer versehen. Es folgte die Injektion von N-Methyl-Scopolamin i.p. (intra peritoneal) bei allen Tieren. N-Methyl-Scopolamin diente hier als peripherer Muskarinantagonist. Nach 30 min folgte die Pilocarpin-Injektion bei 30 Tieren, die Kontrolltiere erhielten Natriumchlorid 0,9%. Unter präziser Beobachtung zeigten die Tiere nach 20-30 min einzelne motorische An-

fälle, die sich im Abstand von 10 min 3–4-mal wiederholten. Nach weiteren 30-40 min etablierte sich diese Anfälle zum Status Epilepticus (SE). Die Kontrolltiere zeigten keine Veränderung.

Nach 40 min SE-Dauer wurden die Krämpfe durch Diazepam-Applikation (4 mg/kg, i. p., b.B. wiederholt) unterdrückt. Anschließend wurden die Tiere wiederholt mit 5%iger Glucoselösung gefüttert (Brehme et al.,2014) und in einzelne Käfige verteilt. Nach zwei Wochen konnten die Hirnschnitte untersucht werden. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigten nun epileptiforme Aktivität, vor allem im Hippocampus (Turski et. al., 1983).

2.4.6 VERSUCHSGRUPPEN

Für diese Arbeit wurden zwei Tiergruppen miteinander verglichen: *Kontrolltiere*=nicht epileptisches, gesundes Gewebe und *mit Pilocarpin behandelte Tiere*=chronisch epileptisches Gewebe (Tab. 8). Innerhalb dieser Gruppen liefen Zeitkontrollaufnahmen über eine Stunde. Begonnen wurde für 30 min mit Gabazin. Im Verlauf wurde nach 30 min dem Gabazin XE991 hinzugefügt. Dieses Procedere wurde **mit** vorheriger BHB Inkubation durchgeführt und **ohne** BHB. Aus diesen Abläufen ergeben sich folgende Versuchsgruppen, wobei sich die Zeitkontrollaufnahmen nochmals in **mit** und **ohne** XE991 unterteilen lassen:

TABELLE 8: VERSUCHSGRUPPEN

Kontrolltiere		Pilotiere	
n=17		n=18	
1.-30. min	30.-60. min	1.-30. min	30.-60. min
Gabazin	Gabazin+XE991	Gabazin	Gabazin+XE991
n=17		n=19	
1.-30. min	30.-60. min	1.-30. min	30.-60. min
Gabazin+BHB	Gabazin+BHB+XE991	Gabazin+BHB	Gabazin+BHB+XE991

2.4.7 ANALYSE DER ERHOBENEN DATEN

Die Aufzeichnung der Messung erfolgte mit dem Programm Signal© (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Vereinigtes Königreich). Das Tabellenkalkulationsprogramm MS Office Excel 2019 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) diente der Verarbeitung der Datensätze und anschließenden Auswertung.

In Abb. 9 ist ein epilepsietypisches Potential (ETP) zu sehen. In der vorliegenden Arbeit wird Abb. 9 als ein Event gewertet. Während des gesamten Events sind mehrere einzelne Spikes zu sehen. Das Membranpotential fällt hier nicht dauerhaft auf 0 mV. Erst am Ende des Events nivelliert sich das MP auf 0mV.

Mit dem Excel-Programm wurden nachfolgend die Häufigkeiten der ETPs pro Minute gezählt. Damit sollte der Einfluss von XE991 auf die Häufigkeit der ETPs im akuten Hirnschnitt untersucht werden.

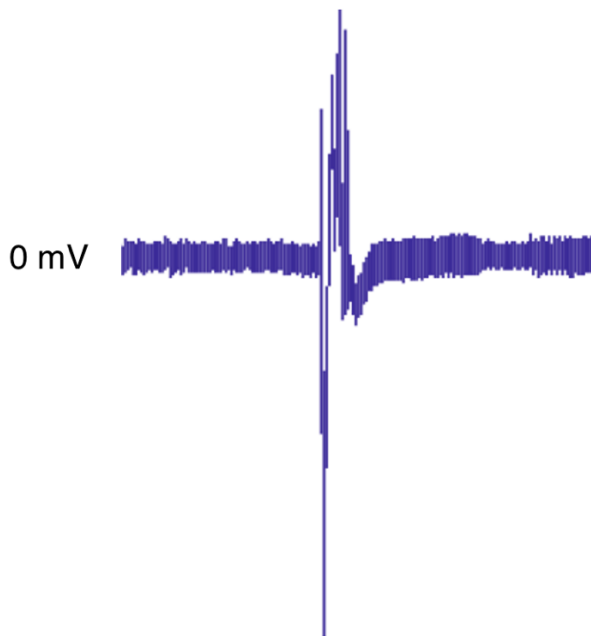


ABBILDUNG 9: **ETP (EPILEPSIETYPISCHES POTENTIAL)**

DARGESTELLT IST EIN ETP. WÄHREND DES GESAMTEN EVENTS SIND MEHRERE EINZELNE SPIKES ZU SEHEN. DAS MEMBRANPOTENTIAL FÄLLT ZWISCHENZEITLICH NICHT DAUERHAFT AUF 0 mV. ERST AM ENDE DES EVENTS NIVELLIERT SICH DAS MP AUF 0mV, WIE VOR BEGINN DES ETPs.

2.4.8 STATISTIK

Anschließend erfolgte die Auswertung der erhobenen Daten. Mittelwert und Standardfehler wurden in MS Office berechnet. Die Visualisierung von Diagrammen und Abbildungen erfolgte mit dem Grafikprogramm CorelDRAW X6. Um eine repräsentative Analyse der Daten zu erhalten, wurden alle erfassten Häufigkeiten in Form des arithmetischen Mittels mit zusätzlicher Angabe des Standardfehlers und der Standardabweichung angegeben. Die jeweiligen Formeln wurden in Tab. 9 zusammengefasst. Die gesamte Dissertation wurde mit Microsoft Word 2019 verfasst.

Nach Kontrolle der Normverteilung, konnte die statistische Signifikanz durch den gepaarten t-Test, sowie die dreifaktorielle Varianzanalyse, mit Hilfe des SigmaStat-Programms berechnet werden. Wurde die Abbildung mit einem Stern (*) markiert, konnte ein Fehler mit $p < 0,05$ als signifikanter Unterschied angenommen werden. Für $p < 0,01$ wurden zwei Sterne (**) und für $p < 0,001$ drei Sterne (***) verwendet.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

In der 3-Way-ANOVA (dreifaktorielle Varianzanalyse) wurde die Varianz der berechneten Mittelwerte verschiedener Gruppen verglichen, um einen möglichen Unterschied zwischen den einzelnen Mittelwerten der unterschiedlichen Gruppen zu zeigen. In der abgebildeten Tabelle (s. Ergebnisse Kapitel 3.4. Interaktionen zwischen XE991 und BHB, Tab. 11) sind alle Daten der dreifaktoriellen Varianzanalyse zusammengefasst. Neben dem **P**-Wert wurde unter anderem **DF** (degrees of freedom) angegeben, dieser beschreibt die Anzahl der Freiheitsgrade, beziehungsweise wie viele Werte frei variieren dürfen. **SS** (sum of squares) ist die Quadratsumme und gibt die Summe der quadrierten Abweichung der Messzahlen vom Mittelwert an. **MS** (mean squares) definiert den mittleren quadratischen Fehler und **F** (ratio) entspricht der Testgröße.

Die Daten im Ergebnisteil wurden in Boxplots graphisch dargestellt. Dabei wurde der Wert IQR, die interquartile Range eines jeden Boxplots genauer betrachtet. Des Weiteren wurden die Median-Werte miteinander verglichen (Abb. 10).

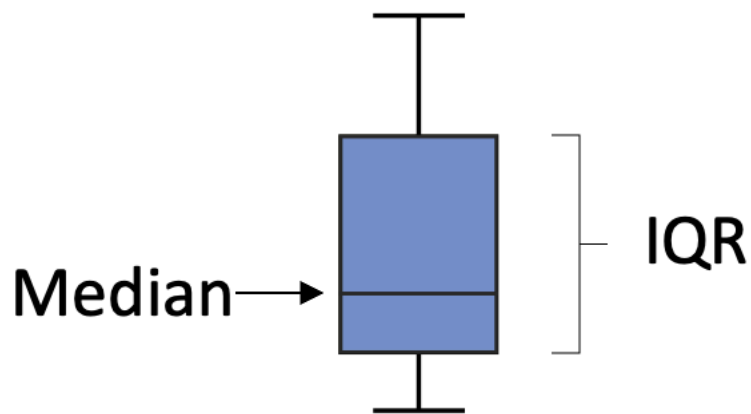


ABBILDUNG 10: **BOXPLOT**
DARGESTELLT IST EIN BOXPLOT MIT DEM MEDIAN-WERT, SOWIE DER IQR

TABELLE 9: **FORMELSAMMLUNG**

Formelsammlung	
Arithmetisches Mittel	$\bar{X} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i$
Standardabweichung (Standard deviation; SD)	$SD = \sqrt{\frac{1}{1-n} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$
Standardfehler (Standard error of the mean; SEM)	$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

III. ERGEBNISSE

3.1 GABAZIN-VERSUCHE

3.1.1 DER EFFEKT VON GABAZIN AUF KONTROLLTIERE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse einzelner Versuche präsentiert. Zunächst wurden die Gabazin-Versuche, folgend von den XE991 Versuchen und zuletzt die Versuche mit β -Hydroxybutyrat vorgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zusammen mit den Daten von Mitdotorandinnen veröffentlicht werden (Müller et al., 2024).

Führt eine GABA_A-Rezeptor Blockade zu Spontanaktivität im lebenden Hirnschnitt? - diese Frage steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Um dies beantworten zu können, wurde in der vorliegenden Dissertation mit naiven Wistar Ratten (Kontroll-Tier) eine Langzeitaufnahme von recurrent epileptiform discharges (REDs) aufgenommen und ausgewertet. Dieser Versuch diente als Pilotversuch, um mit dem Versuchsaufbau vertraut zu werden. Der Hirnschnitt wurde in ACSF-Lösung mit 5 μ M Gabazin für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert und während der einstündigen Aufnahme konnte er mit derselben Lösung, bei 37°C, versorgt werden.

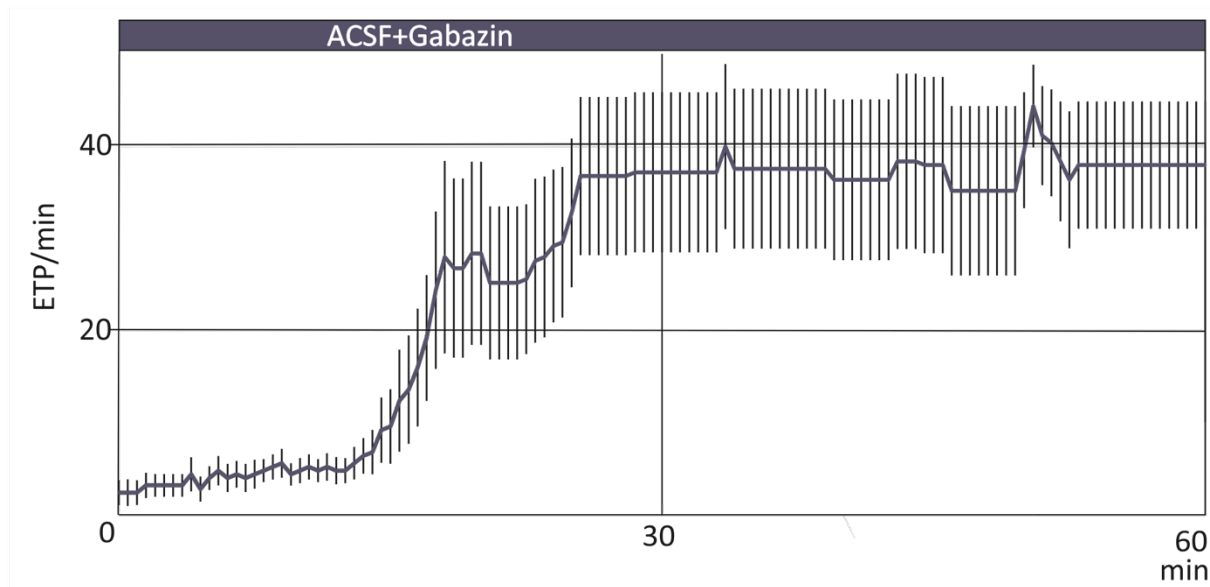


ABBILDUNG 11: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN

DARGESTELLT IST DIE AUSWERTUNG VON 5 VERSUCHEN (N=5), 15-20 MIN INKUBATION MIT GABAZIN.

AUFGETRAGEN WURDEN DIE ANZAHL DER ETP/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT IN MIN. ABGEBILDET WURDEN DER MITTELWERT UND DER STANDARDFEHLER. DIE MESSPUNKTE WURDEN ALLE 30 S AUFGETRAGEN.

In Abb.11 ist die Auswertung von 5 Versuchen zu sehen. Kurz nachdem der Schnitt in der Messkammer lag, zeigten sich vereinzelte ETPs, deren Häufigkeit in den nächsten 15 min konstant bei 6 ETP/min lag. Hier wurde angenommen, dass es ungefähr eine Viertelstunde dauerte, bis die endgültige Konzentration von 5 μ M Gabazin (GZ) und die physiologische Temperatur von 37°C im Schnitt anwesend waren. Nach 15 min kam es zu einer rapiden Steigerung. Wie Abb. 11 zeigt nahm die Häufigkeit bis Minute 25 zu, danach kam es zu einem Plateau mit gleichbleibender Häufigkeit an ETPs. In Abb.11 wird deutlich, dass das akute Epilepsiemodell zeitabhängig ist. Das akute Epilepsiemodell, ausgelöst durch Gabazin, ein GABA_A-Rezeptor-Antagonist ist ein konstantes in vitro Modell (Kernig et al., 2012; Williamson and Wheal, 1992). Mit zunehmender Dauer der Inkubation durch Gabazin, nahm die Spontanaktivität stetig zu. Daher wurden im Verlauf der folgenden Versuche, alle weiteren Experimente immer parallel mit und ohne Pharmakon durchgeführt.

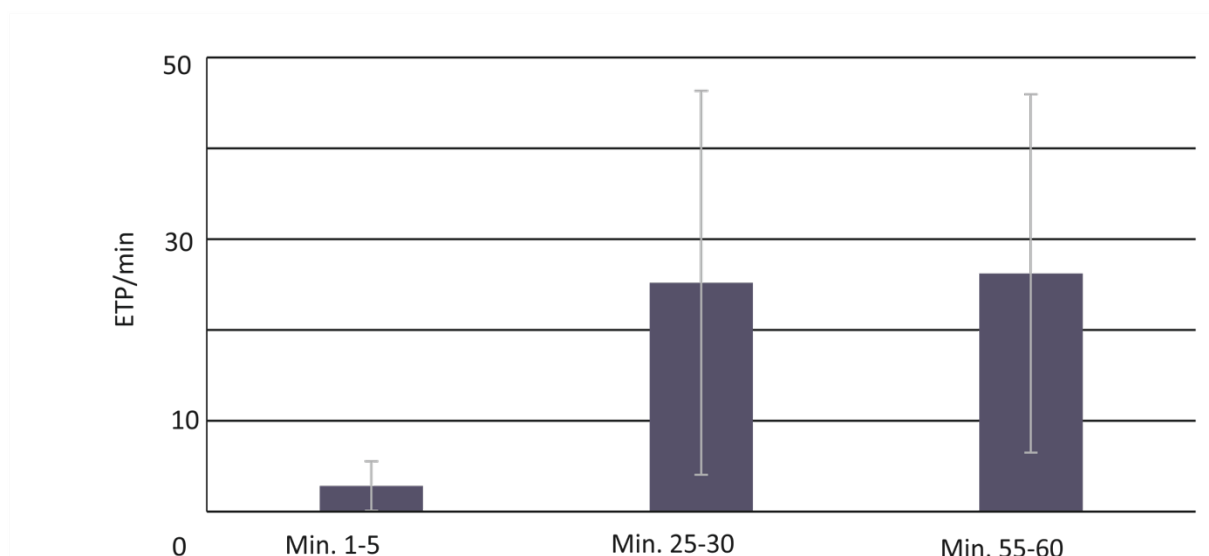


ABBILDUNG 12: MITTELWERTE DER KONTROLLSCHNITTE DES GABAZIN-ZEITVERLAUFS
MITTELWERTE MIT STANDARDFEHLERN DER ETP/MIN IM PILOTVERSUCH NACH 5 MIN, 30 MIN UND NACH 60 MIN.

Das Balkendiagramm (Abb. 12) zeigt, dass das in vitro Modell ein widerstandsfähiges Modell darstellt. Es entsteht immer epileptische Aktivität unter Gabazin-Gabe. Die oben abgebildeten Fehlerbalken zeigen die Ausreißer während dieser einstündigen Aufnahme. In Abb. 13-15 sind einzelne repräsentative Originalregistrierungen aus den angegebenen Referenzminuten dargestellt. Zusammenfassend wird aus Abb. 12 ersichtlich, dass es unter einer GABA_A-Rezeptor-Blockade, hier durch Gabazin, zu einer Spontanaktivität im lebenden Hirnschnitt kommt. Zumal die zeitliche Komponente hierbei eine große Herausforderung für die Vergleichbarkeit der Versuche spielte. Um den Einfluss von weiteren Substanzen (XE991 und β -Hydroxybutyrat) auf

Kontrolltiere und mit Pilocarpin behandelten Tiere in dieser Arbeit besser vergleichen zu können, wurde in den weiteren Versuchen mit Zeitkontrollaufnahmen gearbeitet (s. Tab. 8; Kapitel 2.4.6. im Methodenteil).



ABBILDUNG 13: **ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 5 MIN**
ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 3 ETPs NACH 5 MIN AUFNAHME.

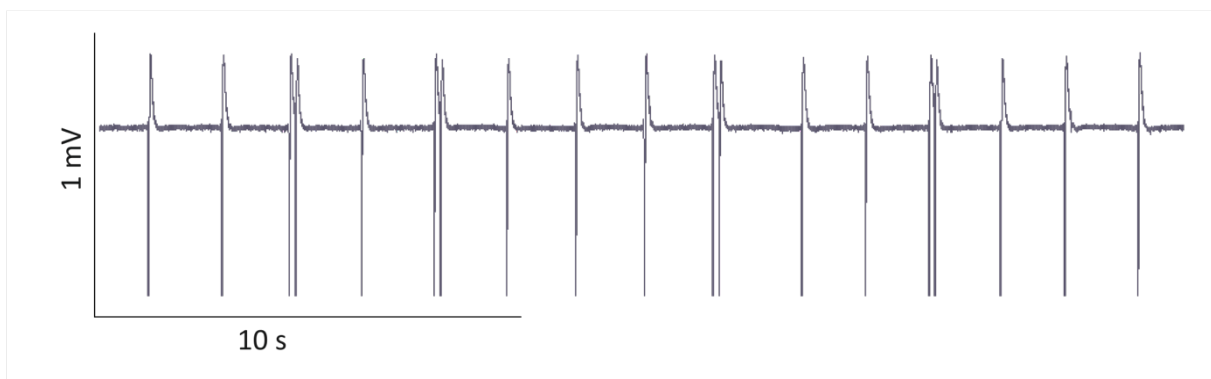


ABBILDUNG 14: **ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 30 MIN**
ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 15 ETPs NACH 30 MIN AUFNAHME.

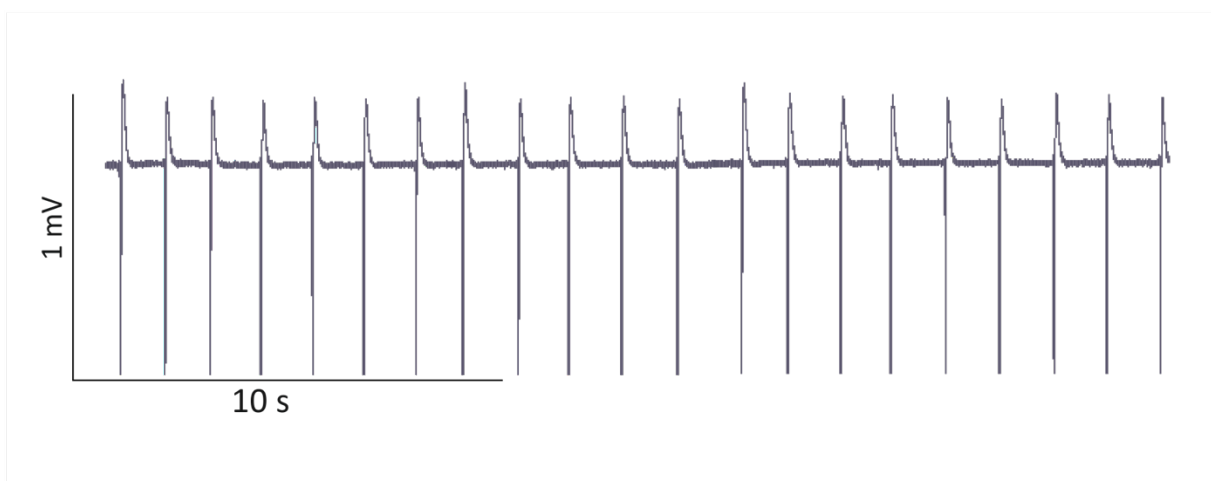


ABBILDUNG 15: **ORIGINALREGISTRIERUNG NACH 60 MIN**
ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 21 ETP NACH 60 MIN AUFNAHME

3.1.2 DER EFFEKT VON GABAZIN AUF KONTROLLTIERE UND PILOTIERE

Um auf den zweiten Teil der einleitenden Frage einzugehen: *Ist die oben beschriebene Spontanaktivität zwischen Naiven und mit Pilocarpin behandelten Ratten (Pilotiere) unterschiedlich*, wurden im Folgenden zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen. In Abb. 16 wurden die Auswertungen der Kontrollgruppe, denen mit Pilocarpin behandelten Tieren gegenübergestellt. Während es in der Kontrollgruppe zu einem raschen Anstieg in den ersten 15 min kam, verzeichneten den Pilotiere einen linearen Anstieg an ETP/min in den ersten 15 min. Nach einer Aufnahmezeit von 30 min kam es in der Pilogruppe zu einem weiteren Anstieg an ETP/min, im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Hier stagniert die Zunahme an ETPs und erreicht ein Plateau auf Höhe von 6 ETPs/min. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere erreichten einen Wert von 10 ETPs/min. Aufgrund der geringen n-Zahl, von n=3 in der Kontrollgruppe zu n=8 in der Pilocarpingruppe, konnte zwischen den zwei verschiedenen Versuchsgruppen kein Unterschied festgehalten werden, daher kam es in Abb. 16 zu einer deutlich sichtbaren Überlagerung der Standardfehler. Hier wurde lediglich deutlich, dass das akute Epilepsiemodell mit Hilfe von Gabazin an beiden Tiergruppen anwendbar war.

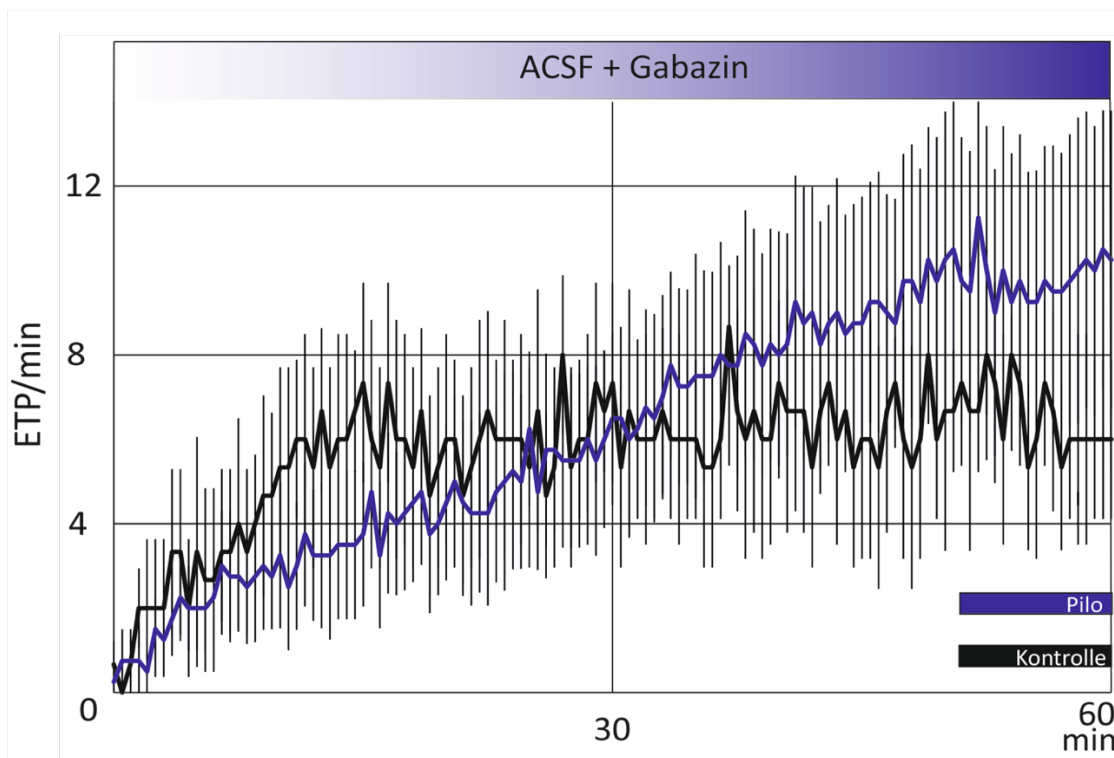


ABBILDUNG 16: ZEITVERLAUF PILO VS. KONTROLLE MIT GABAZIN ÜBER 60 MIN

ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER ETP-RATE (ETP/MIN). AUSWERTUNGEN DER KONTROLLGRUPPE (N=3, SCHWARZ) UND DER MIT PILOCARPIN BEHANDELTE TIERE (N=8, BLAU). AUFGETRAGEN WURDEN DIE ANZAHL DER ETP/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT. DARGESTELLT WURDEN DER MITTELWERT UND DER STANDARDFEHLER.

3.2 XE991 VERSUCHE

3.2.1 DER EFFEKT VON XE991 AN KONTROLLTIEREN

Grundlegend beschäftigt sich diese Dissertation mit der Fragestellung: *Spielt der Kv7-Kanal bei erworbener Epilepsie eine Rolle?* In den folgenden Versuchen wurde XE991 (20 μ M) als etablierter K⁺-Kanal-Blocker eingesetzt. Die Kontrollversuche konnten mit n=17 Hirnschnitten, das entsprach 5 Tieren, durchgeführt werden. Hier sollte geprüft werden, ob Veränderungen in der Spontanaktivität durch den Kv7-Kanal-Blocker XE991, verzeichnet werden können. Basierend auf Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe, konnte davon ausgegangen werden, dass unter den Kontrolltieren noch alle Kv7- Kanäle vorhanden sind. Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Pilocarpin behandelten Ratten angenommen, dass die Kalium-Kanäle hier weniger exprimiert vorlagen (Karthaus, 2021). Die 60-minütige Aufnahme der Spontanaktivität erfolgte nach demselben Schema, wie im Methodenteil beschrieben.

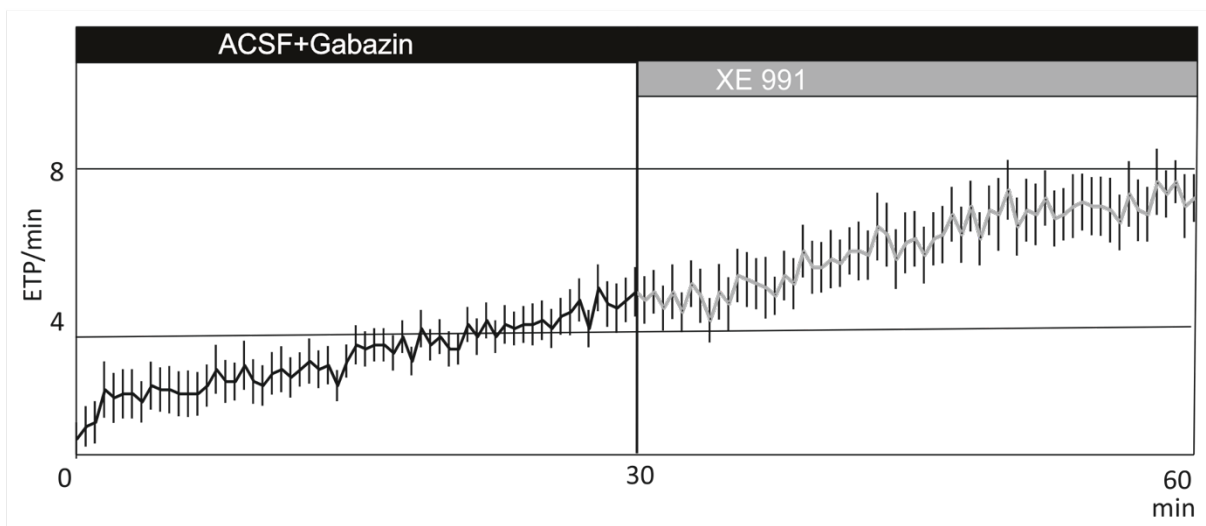


ABBILDUNG 16: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN+XE991

AUSWERTUNG VON 17 VERSUCHEN (N=17). AUFGETRAGEN WURDE DIE ANZAHL DER ETPS/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT. DARGESTELLT WURDEN DER MITTELWERT UND DER STANDARDFEHLER. DIE MESSPUNKTE WURDEN ALLE 30 S AUFGETRAGEN. 1.-30. MINUTE UNTER ACSF+ GZ (SCHWARZ), UND 30.-60. MINUTE UNTER ACSF+GZ+XE991 (GRAU).

In Abb. 16 ist die Auswertung von 17 Versuchen dargestellt. Kurz nachdem GZ, bei nun 37°C im Schnitt anwesend war, zeigten sich vereinzelte ETPs, deren Häufigkeit in den nächsten 15 min weiter zunahm. Nach 15 min wurde die Konzentration von 5 μ M Gabazin erreicht. Nach 10 min kam es zu einer verlangsamtsten Steigerung. Offenkundig nahm die Häufigkeit zwar verlangsamt aber chronisch zu. An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob das GZ sättigt oder nicht. Anzunehmen war, dass es nach 60 min zu einer Sättigung zu einer Plateauphase kam, mit gleichbleibender Häufigkeit an ETPs. Um sicher zu gehen, dass es nicht mit dem XE991 Effekt

interferierte, wurden parallele Versuche mit und ohne XE991 während der Minute 30 und 60 durchgeführt. So konnten beide Zeitkontrollen direkt miteinander verglichen werden. In Abb. 16 zeigt sich, dass nach 30 min, hier das Ende der reinen GZ-Applikation, im Mittel 5 ETPs zu sehen waren. Ein repräsentatives Beispiel für den Mittelwert nach 30 min zeigt Abb. 17. Nach der Zugabe von XE991 (10 μ M) und Beobachtung über eine halbe Stunde, zeigte sich eine weitere Zunahme der Frequenz, sodass am Ende nach 60 min im Mittelwert 7,8 ETPs/min verzeichnet werden konnte. Eine repräsentative Originalregistrierung nach 55 Minuten wurde in Abb. 18 dargestellt.

Nach 55 min nivellieren sich die ETPs/min bei durchschnittlich 6,6-7,6/min. Im t-Test mit einem $p=0,003$ stellt dies ein signifikantes Ergebnis dar.

Demzufolge hat XE991 einen signifikanten Effekt auf die ETPs im akuten Hirnschnitt eines gesunden Kontrolltiers. Dieser Effekt zeigt sich konsistent zu den Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe. (Karthaus, 2021) hatte herausgefunden, dass in Pilocarpin-behandelten Tieren Kv7.2/7.3 reduziert und Kir6.1 hochreguliert vorliegen.

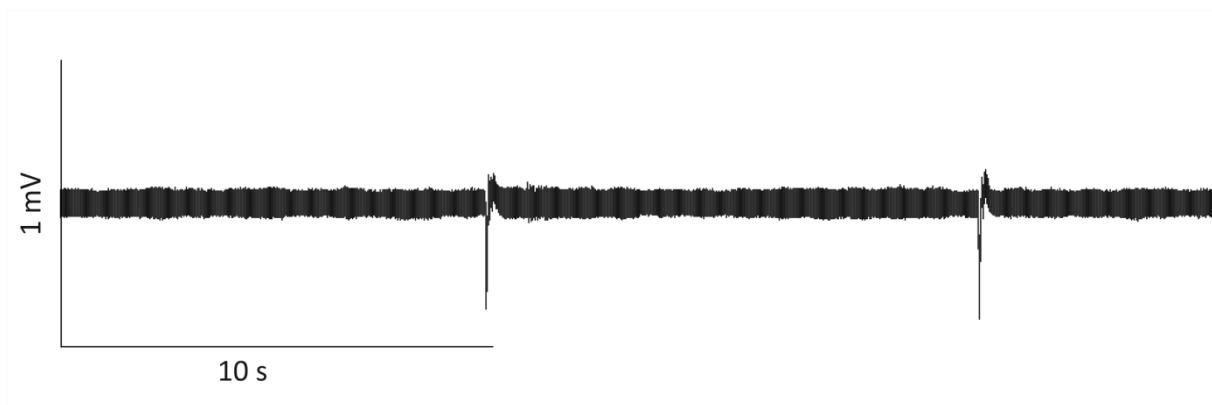


ABBILDUNG 17: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 2 ETP NACH 25 MIN AUFNAHME IN SCHWARZ (ACSF+GZ)



ABBILDUNG 18: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN UND XE991

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 4 ETP NACH 55 MIN AUFNAHME IN GRAU (ACSF+GZ+XE991).

3.2.2 DER EFFEKT VON XE991 AN PILOTIEREN

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass ein Kv7-Kanalblocker Einfluss auf nicht geschädigtes Hirngewebe hat, wurde im Folgenden der Einfluss von XE991 auf chronisch epileptisches Hirngewebe untersucht.

Die Versuchsreihe der mit Pilocarpin behandelten Tiere setzte sich aus n=18 Hirnschnitten zusammen. Das entsprach 6 Tieren. Der Ablauf erfolgte stets in selber Reihenfolge. Nach 15-20 min Vorinkubation mit 5 μ M Gabazin, erfolgte das Einlegen der Hirnschnitte in die Messkammer, ebenfalls mit 5 μ M Gabazin. Nach 5 min Equilibrieren in der Messkammer konnte die Aufzeichnung der Spontanaktivität für 60 min starten, wobei nach 30 min der Kv7-Kanal-Blocker XE991 hinzugegeben wurde.

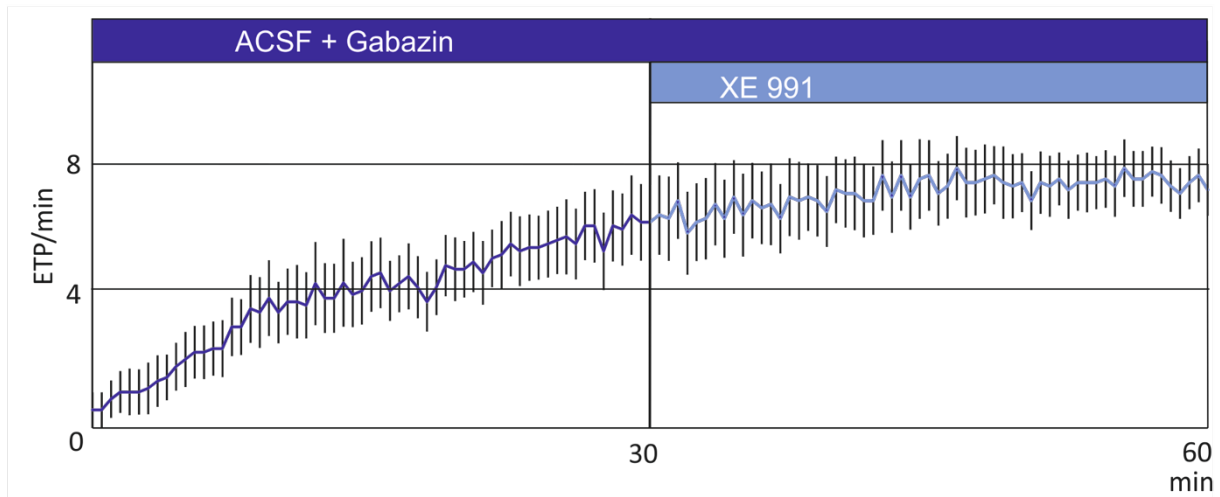


ABBILDUNG 19: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER PILOCARPIN-TIERE MIT GABAZIN UND XE991

AUSWERTUNG VON 18 VERSUCHEN (N=18). AUFGETRAGEN WURDEN DIE ANZAHL DER ETPs/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT. DARGESTELLT WURDE, DER MITTELWERT UND DER STANDARDFEHLER. DIE MESSPUNKTE WURDEN ALLE 30 S AUFGETRAGEN. ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER ETP/MIN IN DEN MIT PILOCARPIN BEHANDELTEN SCHNITTEN; 1.-30. MINUTE UNTER ACSF+ GZ (DUNKELBLAU), UND 30.-60. MINUTE UNTER ACSF+GZ+XE991 (HELLBLAU).

In Abb. 19 ist die Auswertung von 18 Versuchen zu sehen. Kurz nachdem GZ im Schnitt anwesend war, zeigten sich vereinzelt ETPs, deren Häufigkeit in den nächsten 15 min weiter zunahm. Nach weiteren 10 min kam es zu einer verlangsamt Steigerung. Wie Abb. 19 zeigt, nahm die Häufigkeit zwar verlangsamt aber chronisch zu. In Abb. 19 wird erkennbar, dass nach 30 min, hier das Ende der reinen GZ-Applikation, im Mittel 6 ETPs zu sehen waren. Ein repräsentatives Beispiel für den Mittelwert nach 30 min zeigt Abb. 20. Nach der Zugabe von XE991

(20 μ M) und Beobachtung über eine halbe Stunde, konnte festgestellt werden, dass die Zunahme der Frequenz nur marginal sichtbar wurde. Nach 60 min nivellieren sich die ETPs/min bei durchschnittlich 7,6-8/min. Im t-test mit verbundenen Stichproben mit einem $p=0,258$ stellt dies keinen signifikanten Unterschied dar. Demzufolge hat XE991 keinen signifikanten Effekt auf die erworbene Epilepsie. Abb. 21 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung aus Abb. 19 nach 55 min.

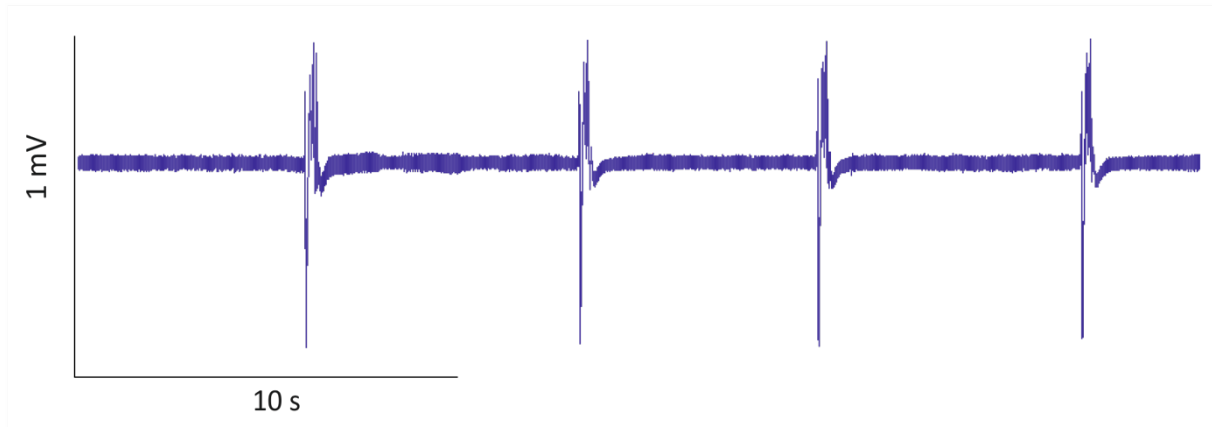


ABBILDUNG 20: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 4 ETP NACH 25 MIN AUFNAHME IN DUNKELBLAU (ACSF+GZ).

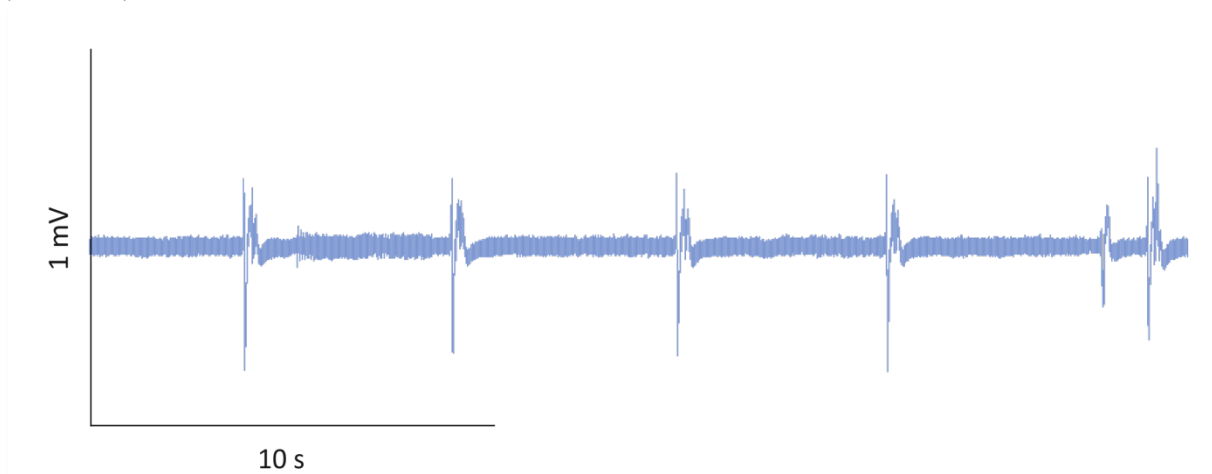


ABBILDUNG 21: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN UND XE991

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 6 ETP NACH 55 MIN AUFNAHME IN HELLBLAU (ACSF+GZ+XE991).

Abb. 22 zeigt einen Boxplot (s. Kapitel 2 Material und Methoden, 2.3.7. Statistik). Die Daten der vorangegangenen Versuche wurden zusammengefasst dargestellt. Die Kontrollgruppen sind in schwarz und grau, die Pilocarpin behandelten Tiere wurden hier in dunkelblau und hellblau veranschaulicht. Zum Ende der GZ-Zeit zeigten die Kontrollgruppen einen Medianwert von 4,8 ETPs/min und einer Interquartile Range (IQR) von 3,2-5,8 ETP/min. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigten einen Wert von 5,4 ETP/min und einer IQR von 2,5-7,6. In der Pilocarpin-Gruppe ließ sich ein signifikanter Unterschied mit $p=0,045$ feststellen.

Zum Ende der zusätzlichen XE991 Applikation zeigten die Kontrollgruppen einen Medianwert von 6,4 ETPs/min und einer Interquartile Range (IQR) von 5,4-9,6 ETP/min. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigten einen Wert von 7,2 ETP/min und einer IQR von 5,3-9,18 ETPs/min. In einem gepaartem t-Test wurden die Werte zum Ende der GZ-Zeit mit den Werten am Ende der GZ+XE991-Zeit verglichen und mit Hilfe des „Sigma Stat“ Programms (System Software, Point Richmond, USA), schließlich ermittelt. In der Pilocarpin-Gruppe ließ sich ein signifikanter Unterschied mit $p=0,045$ feststellen. In der Kontrollgruppe verzeichnete sich ebenso ein signifikanter Unterschied, mit einem $p<0,001$.

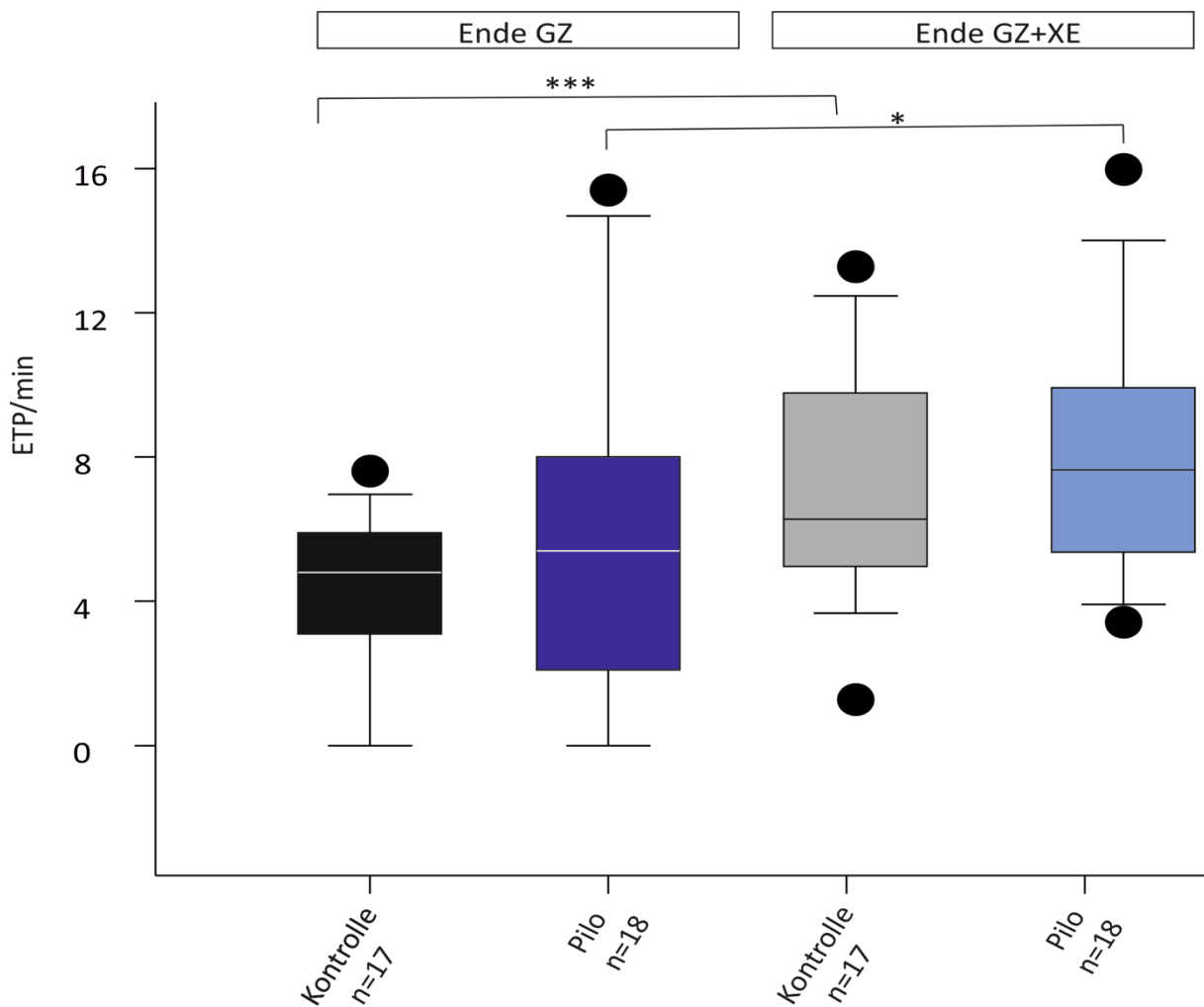


ABBILDUNG 22: **BOXPLOT KONTROLLE VS. PILOCARPIN**

DARGESTELLT WURDEN DIE ANZAHL DER ETP/MIN IN DEN KONTROLLVERSUCHEN: DIE SCHWARZE BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (WEIßE LINIE) LIEGT BEI 4,8 ETP/MIN. DIE ANTENNEN AN DEN BOXEN VERANSCHAULICHEN DIE AUSREIßER AUF DER 10%- UND 90%-PERZENTILE. DIE GRAUE BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 6,4 ETP/MIN, ZUM ENDE DER XE991-APPLIKATION (55.-60. MIN.). DATEN DER PILOCARPIN-VERSUCHE: DUNKELBLAUE BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (WEIßE LINIE) LIEGT BEI 5,4 ETP/MIN ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DIE HELLBLAUE BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 7,2 ZUM ENDE DER XE99- APPLIKATION (55.-60. MIN.); ***DIE ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+XE991-APPLIKATION WAREN IN DEN KONTROLLVERSUCHEN SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN GEGENÜBER DER ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ-APPLIKATION $p < 0,001$ (IM GEPAARTEN T-TEST); * DIE ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+XE991-APPLIKATION WAREN IN DEN PILOCARPIN-VERSUCHEN SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN GEGENÜBER DER ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ-APPLIKATION $p = 0,045$ (IM GEPAARTEN T-TEST).

Im Verlauf der vorangegangenen Versuche wurden nicht nur die Summe aller einzelnen ETPs ermittelt, sondern auch die gesamte ETP-Dauer [ms] eines jeweiligen ETPs und die gesamte epileptische Aktivität eines Frames=30 s in [ms/min]. In Tab. 10 wurden die Werte der Kontrolltiere denen der mit Pilocarpin behandelten Tiere gegenübergestellt. Im Vergleich Kontrolle zu Pilocarpin unter Gabazin konnte ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ ermittelt werden. Innerhalb der Kontrollgruppe konnte ebenso ein signifikanter Unterschied von Gabazin zu Gabazin+XE991 mit einem $p < 0,001$ verzeichnet werden.

TABELLE 10: WEITERFÜHRENDE AUSWERTUNG DER XE991-VERSUCHE

	ETP-Dauer [ms]		Index epileptischer Aktivität [ms/min]	
	<i>Gabazin</i> (1.-30. min) Median (IQR)	<i>Gabazin + XE991</i> (31.- 60. Min) Median (IQR)	<i>Gabazin</i> (1.-30. min) Median (IQR)	<i>Gabazin + XE991</i> (31.- 60. Min) Median (IQR)
Kon- trolle	0,36^a (0,28-0,48)	0,42 (0,35-0,51)	1,88^b (1,44-2,42)	3,06^b (2,16-4,1)
Pilo	0,54^a (0,29-0,63)	0,54 (0,37-0,6)	2,8 (1,3-3,84)	3,52 (2,62-5,06)

^A DER VERGLEICH **KONTROLLE** ZU **PILOCARPIN** UNTER **GABAZIN** WAR SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN, MIT EINEM $P < 0,05$.

^B INNERHALB DER **KONTROLLGRUPPE** KONNTE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VON **GABAZIN** ZU **GABAZIN+XE991** MIT EINEM $P < 0,001$ VERZEICHNET WERDEN.

3.3 XE991 VERSUCHE MIT β -HYDROXYBUTYRAT

3.3.1 DER EFFEKT VON XE991 UND β -HYDROXYBUTYRAT AN KONTROLLTIEREN

Um die Frage beantworten zu können, *ob eine akute, im Schnitt ausgelöste Spontanaktivität durch einen putativen Kalium-Kanal-Agonisten reduziert wird*, wurde im folgenden Versuch β -Hydroxybutyrat (100 μ M) in die ACSF+GZ-Lösung, zum Zeitpunkt der Inkubation mit Gabazin, dazugegeben.

Die Auswertung von n=17 Versuchen, bestehend aus 6 Tieren, ist in Abb. 23 dargestellt. Unter anderem wurden der Mittelwert und der Standardfehler dargestellt. Nachdem der Schnitt ausreichend mit GZ+BHB inkubiert war, zeigten sich erste ETPs. Die Zunahme an ETPs/min nahm stetig zu und erreichte nach vollständiger GZ+BHB-Laufzeit einen Wert von 6 ETPs/min. Die Zugabe von XE991 ließ die ETP-Rate linear von 6 auf 10 ETPs/min ansteigen.

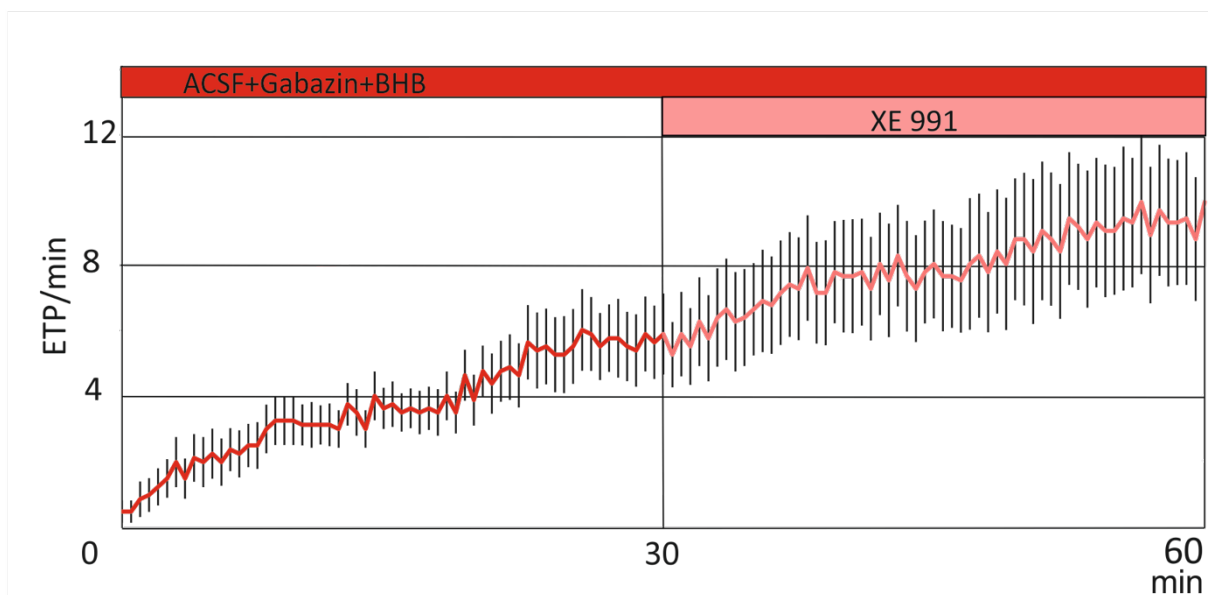


ABBILDUNG 23: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER KONTROLL-TIERE MIT GABAZIN, BHB+XE991

DIE AUSWERTUNG VON 17 VERSUCHEN (N=17). AUFGETRAGEN WURDEN DIE ANZAHL DER ETPS/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT T IN MIN. DIE MESSPUNKTE WURDEN ALLE 30 S AUFGETRAGEN. ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER ETP/MIN IM KONTROLLSCHNITT. 1.-30. MINUTE UNTER ACSF+GZ+BHB (ROT), UND 30.-60. MINUTE UNTER ACSF+GZ+BHB+XE991 (ROSA).

In Abb. 24 ist eine repräsentative Originalregistrierung zum Zeitpunkt der 25. Minute dargestellt. Die deutlich höhere ETP-Rate von 10 ETPs/min zum Ende der XE991 Laufzeit wird in Abb. 25 deutlich. Ein reduzierender Effekt des BHBs konnte zu diesem Zeitpunkt nicht verzeichnet werden.

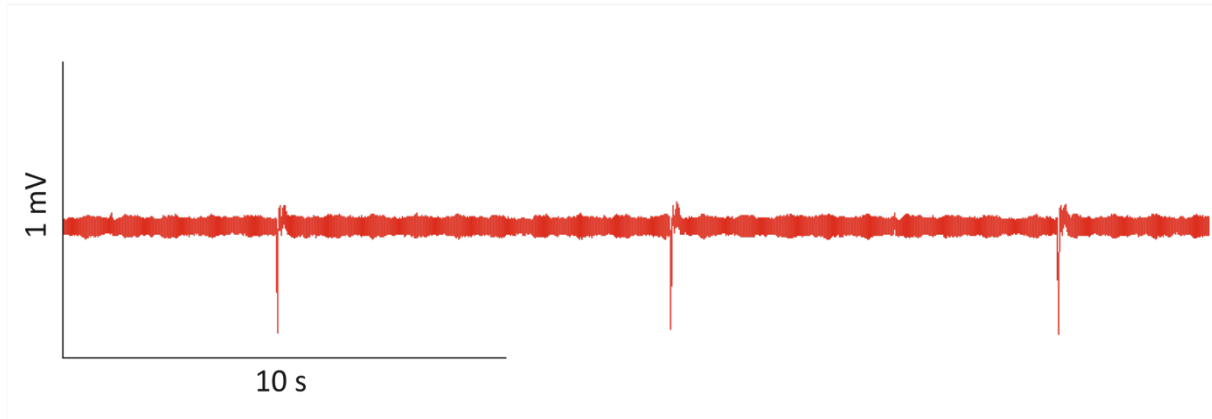


ABBILDUNG 24: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN UND BHB

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 3 ETP NACH 25 MIN AUFNAHME IN ROT (ACSF+GZ+BHB).

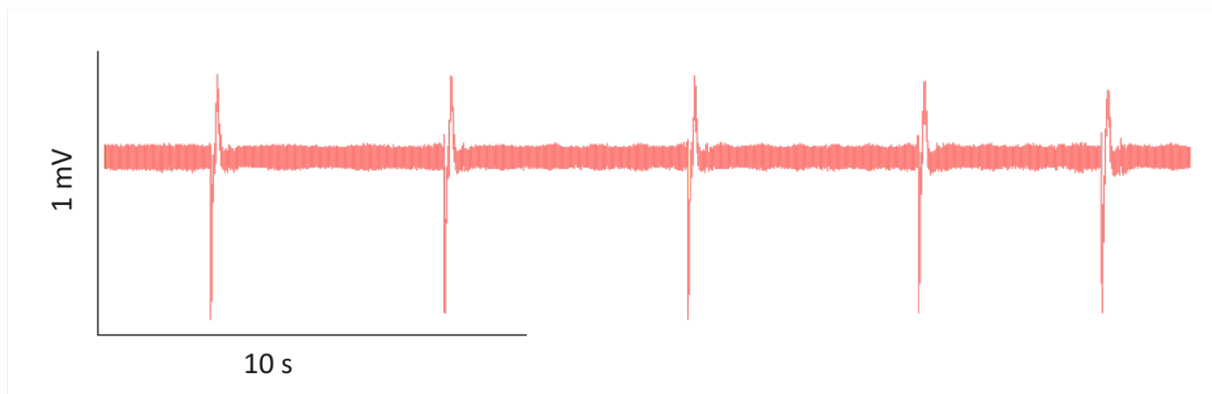


ABBILDUNG 25: ORIGINALREGISTRIERUNG IM KONTROLL-TIER MIT GABAZIN, BHB+XE991

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 5 ETP NACH 55 MIN AUFNAHME IN ROSA (ACSF+GZ+BHB+XE991).

3.3.2 DER EFFEKT VON XE991 UND β -HYDROXYBUTYRAT AN PILOTIEREN

Um einen Effekt des β -Hydroxybutyrats auch im chronisch epileptischen Gewebe untersuchen zu können, wurde das BHB dem ACSF den mit Pilocarpin behandelten Tieren hinzugefügt. Die Versuche sind in Abb. 26 dargestellt. Sie bestehen aus n=19 Hirnschnitten, das entspricht 5 Tieren. In Abb. 26 wurden die ETPs in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Nach Einlegen des Schnittes in die Messkammer zeigten sich augenblicklich erste ETPs, von 2,8 ETPs. Diese nahmen stetig zu und erreichten am Ende der GZ+BHB-Zeit eine Rate von 6,6 ETPs/min.

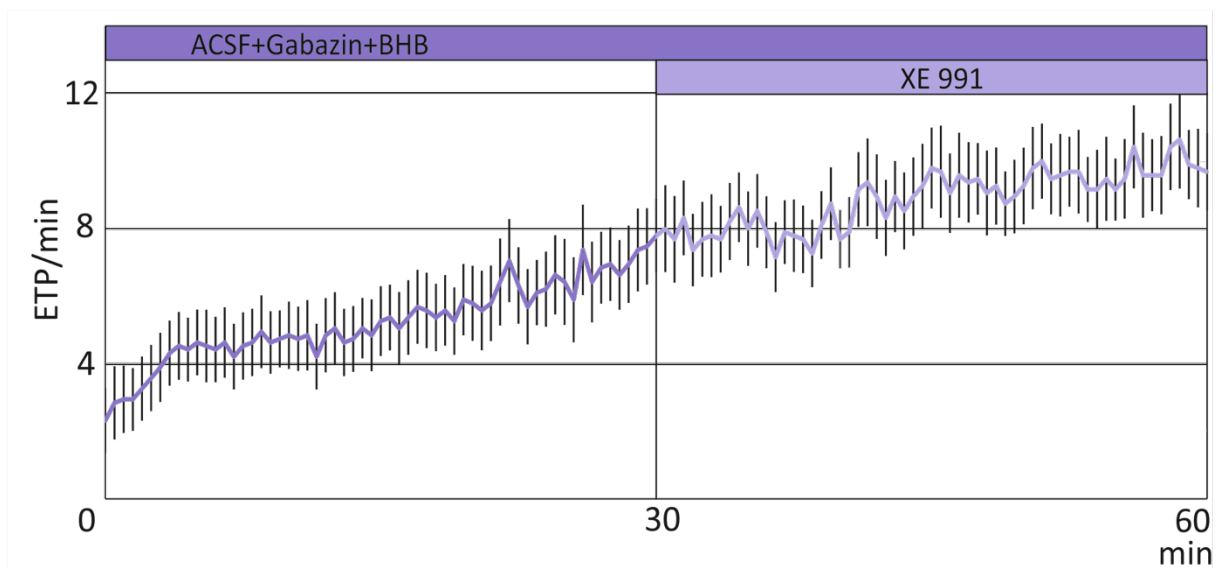


ABBILDUNG 26: ZEITVERLAUF ÜBER 60 MIN DER PILO-TIERE MIT GABAZIN, BHB+XE991

AUSWERTUNG VON 17 VERSUCHEN (N=17). AUFGETRAGEN WURDEN DIE ETPS/MIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT. 1.-30. MIN UNTER ACSF+GZ+BHB (LILA), UND 30.-60. MIN UNTER ACSF+GZ+BHB+XE991 (HELLLILA), N=7; 15-20 MIN VORINKUBATION MIT GABAZIN+BHB

Eine Veranschaulichung der ETP-Frequenz in der 25. Minute ist in Abb. 27 zu sehen. Unter dem Einfluss von XE991 kam es zu einem Anstieg von 7,6 auf 9,8 ETPs/min. Eine repräsentative Originalregistrierung der 55. Minute ist in Abb. 28 grafisch dargestellt. Augenscheinlich ist auf Schnittebene, auch im chronisch epileptischen Gewebe, dem β -Hydroxybutyrat keine nachweislich putative Wirkung zu zuschreiben.

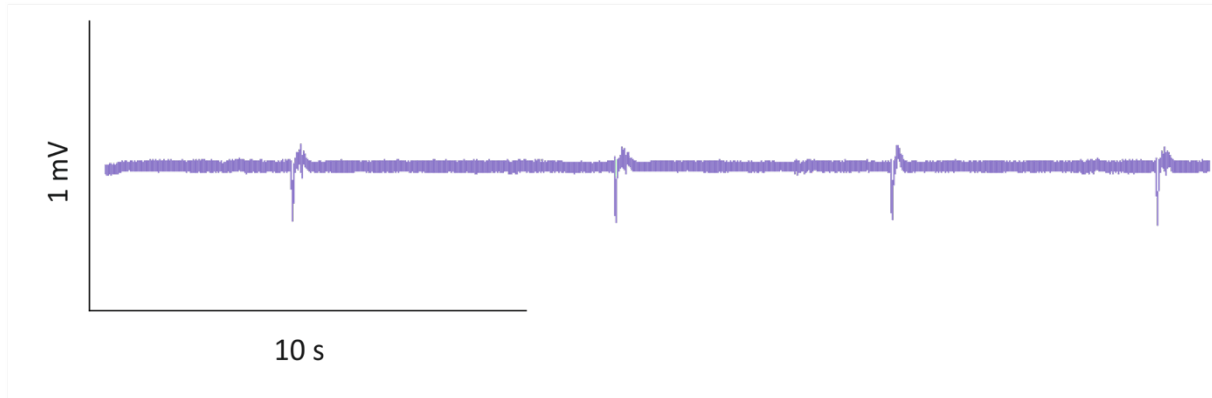


ABBILDUNG 27: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN UND BHB

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 4 ETP NACH 25 MIN AUFNAHME IN LILA (ACSF+GZ+BHB).

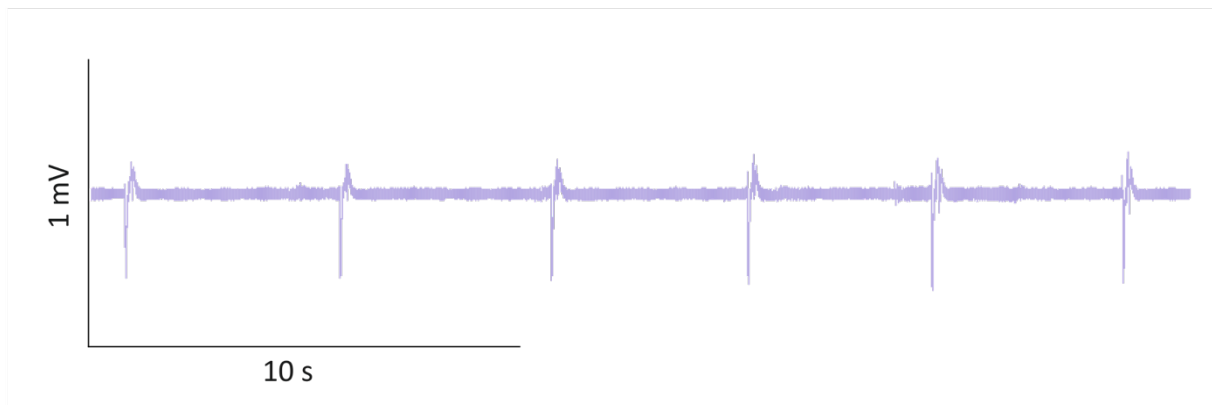


ABBILDUNG 28: ORIGINALREGISTRIERUNG IM PILOCARPIN-TIER MIT GABAZIN, BHB + XE991

ABGEBILDET SIND IN DIESER REPRÄSENTATIVEN ORIGINALREGISTRIERUNG 6 ETP NACH 55 MIN AUFNAHME IN HELLLILA (ACSF+GZ+BHB+XE991).

Die Daten der vorangegangenen Versuche mit XE991, sowie β -Hydroxybutyrat wurden in einem Boxplot dargestellt (Abb.29). Die Kontrollgruppen sind in rot und hellrot, die mit Pilocarpin behandelten Tiere wurden hier in lila und helllila Farben veranschaulicht. Zum Ende der GZ+BHB-Zeit zeigten die Kontrollgruppen einen Medianwert von 5 ETPs/min und einer Interquartile Range (IQR) von 3,2-6,4 ETPs/min. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigten einen Wert von 4,6 ETPs/min und einer IQR von 2,2-10,6 ETP/min.

Zum Ende der zusätzlichen XE991 Applikation zeigten die Kontrollgruppen einen Medianwert von 6,9 ETPs/min und einer Interquartile Range (IQR) von 4,6-9,8 ETPs/min. Die mit Pilocarpin behandelten Tiere zeigten einen Wert von 10,8 ETPs/min und einer IQR von 5,4-12,6 ETPs/min. In einem gepaartem t-Test wurden die Werte zum Ende der GZ+BHB-Zeit mit den Werten der GZ+BHB+XE991-Zeit verglichen und mit Hilfe des „Sigma Stat“ Programms (System Software, Point Richmond, USA), schließlich ermittelt. In der Pilocarpin-Gruppe ließ sich ein

signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ feststellen. In der Kontrollgruppe verzeichnete sich ebenso ein signifikanter Unterschied, mit einem $p = 0,005$.

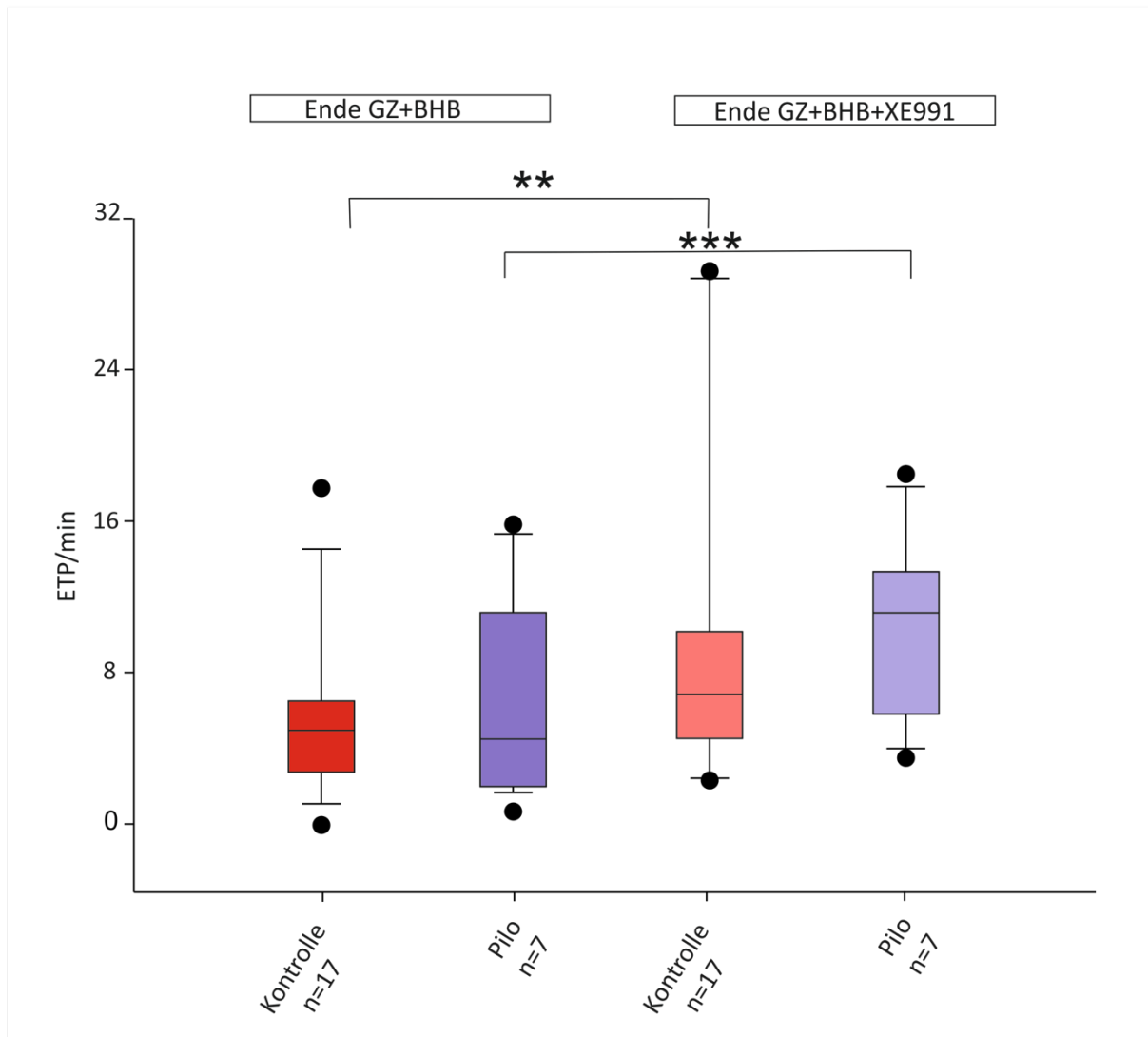


ABBILDUNG 29: **BOXPLOT KONTROLLE VS. PILO UNTER BHB**

DARGESTELLT WURDEN DIE ANZAHL DER ETP/MIN IN DEN KONTROLLVERSUCHEN: DIE ROTE BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 5 ETP/MIN. DIE ANTENNEN AN DEN BOXEN VERANSCHAULICHEN DIE AUSREIßER AUF DER 10%- UND 90%-PERZENTILE. DIE ROSA BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 6,9 ETP/MIN, ZUM ENDE DER XE991-APPLIKATION (55.-60. MIN.). DATEN DER PILOCARPIN-VERSUCHE: LILA BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 4,6 ETP/MIN ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DIE HELLLILA BOX BEINHÄLTET DIE IQR ZUM ENDE GZ-APPLIKATION (25.-30. MIN). DER MEDIANWERT (SCHWARZE LINIE) LIEGT BEI 10,8 ZUM ENDE DER XE99-APPLIKATION (55.-60. MIN.). **DIE ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+BHB+XE991-APPLIKATION WAREN IN DEN KONTROLLVERSUCHEN SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN GEGENÜBER DER ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+BHB-APPLIKATION $p = 0,005$ (IM GEPAARTEN T-TEST); *** DIE ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+BHB+XE991-APPLIKATION WAREN IN DEN PILOCARPIN-VERSUCHEN SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN GEGENÜBER DER ANZAHL DER ETP/MIN AM ENDE DER GZ+BHB-APPLIKATION $p < 0,001$ (IM GEPAARTEN T-TEST).

3.4 INTERAKTIONEN ZWISCHEN XE991 UND BHB

Über alle Daten hinweg, wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, um

- Effekte der Tiergruppen (TG),
- Effekte von BHB,
- Effekte von XE991, sowie die
- Interaktionen der einzelnen Faktoren zu untersuchen.

In der abgebildeten Tabelle sind alle Daten der dreifaktoriellen Varianzanalyse zusammengefasst. Neben dem **p**-Wert wurden unter anderem der **DF-Wert** (degrees of freedom), **SS** (sum of squares), **MS** (mean squares) und **F** (ratio) angegeben (s. Kapitel 2 Material und Methoden, 2.3.7. Statistik).

Zusammenfassend kristallisieren sich aus der Tab. 11 folgende Aspekte heraus: XE und BHB sind unabhängig von den Tiergruppen (TG) zu betrachten. Das bedeutet XE991 und BHB sind eigenständige Risikofaktoren, da sich in Bezug auf die Kategorie Tiergruppe x BHB ($p=0,862$) und Tiergruppe x XE ($p=0,494$) sich kein signifikanter Unterschied verzeichnen lassen konnte. Der Effekt innerhalb der TG ist somit unabhängig von BHB, sowie XE991.

Ein robuster Effekt hingegen lässt sich im XE-Modell nachweisen. XE erhöht die ETP-Rate, über alle Gruppen hinweg, mit einem p-Wert von $p<0.001$. Somit löst XE991 in jedem Fall einen Effekt aus.

Zwischen XE991 und BHB lässt sich entgegen der Vermutung keine Signifikanz erkennen, $p=0,537$. Diese würde bei einem Antagonismus angenommen werden. Ebenso wird zwischen der Pilocarpin-Gruppe und Kontrollgruppe kein allgemeiner Effekt ersichtlich, $p=0,243$.

Anders als angenommen zeigte sich ein globaler Effekt im BHB, mit einem $p=0,048$. So kommt es unter Zugabe von BHB ebenso zu einer Zunahme der ETP-Rate, wie unter XE991.

TABELLE 11: INTERAKTIONEN DER FAKTOREN: TG, BHB, XE991

Faktoren	DF (degrees of freedom)	SS (sum of squares)	MS (mean squares)	F (ratio)	P (P-Wert)
Tiergruppe (Pilo vs Kontrolle)	1	7,835	7,835	1,376	0,243
BHB	1	22,189	22,189	3,897	0,048*
XE	1	71,393	71,393	12,538	<0.001***
Tiergruppe x BHB	1	0,173	0,173	0,0304	0,862
Tiergruppe x XE	1	2,679	2,679	0,471	0,494
BHB und XE	1	2,178	2,178	0,383	0,537
Tiergruppe x BHB x XE	1	0,486	0,486	0,0853	0,771

DIE FAKTOREN TIERGRUPPE (TG), BHB UND XE991 WURDEN IN DIESER TABELLE VERANSCHAULICHT. XE UND BHB SIND UNABHÄNGIG VON DEN TIERGRUPPEN (TG) ZU BETRACHTEN, DA TG x BHB (P=0,862) UND TG x XE (P=0,494) KEINE SIGNIFIKANZ AUFWEISEN. UNTER XE991 KOMMT ES ZU EINER ERHÖHTEN ETP-RATE ÜBER ALLE GRUPPEN HINWEG, MIT EINEM P-WERT VON P<0.001. SOMIT LÖST XE991 IN JEDEM FALL EINEN EFFEKT AUS. ZWISCHEN XE991 UND BHB LÄSST SICH KEINE SIGNIFIKANZ ERKENNEN, P=0,537. EBENSO WIRD ZWISCHEN DER PILOCARPIN-GRUPPE UND KONTROLLGRUPPE KEIN ALLGEMEINER EFFEKT ERSICHTLICH, P=0,243.

Im Gegensatz zu den Interaktionen der einzelnen Kategorien Tab. 11 wird in Tab. 12 ein grundsätzlicher Effekt der einzelnen Gruppen deutlich. Die Tiergruppe, ob eine Pilocarpin-Gruppe vorliegt oder ob es sich um die Kontroll-Gruppe handelt macht keinen Effekt, p=0,241. Anders verhält es sich mit der Anwesenheit von den zusätzlichen Substanzen BHB und XE991. Mit einem p=0,048 gibt es unter BHB einen signifikanten Effekt, welcher sich auch in der Anwesenheit von XE991 zeigt, p<0.001.

TABELLE 12: GRUNDLEGENDER EFFEKT DER FAKTOREN: TG, BHB, XE991

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Parts	q	p	Statistisch signifikant
Tiergruppe	0,474	2	1,659	0,241	Nein
BHB	0,798	2	2,792	0,048*	Ja
XE991	1,431	2	5,008	<0.001***	Ja

GRUNDSÄTZLICH GIBT ES EINEN SIGNIFIKANTEN EFFEKT UNTER BHB MIT EINEM P=0,048*, EBENSO ZEIGT XE991 EINE WIRKUNG MIT EINEM P<0.001***.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Gabazin-Modell nicht geeignet ist, um zwischen Pilo- und Kontrolltieren zu unterscheiden. GZ ist in der gewählten Konzentration möglicherweise nicht sensitiv genug um beide Gruppen voneinander zu trennen. Die dreifaktorielle Varianzanalyse gibt abschließend Aufschluss, dass es einen globalen Effekt unter XE991, über alle Gruppen hinweg, gibt. Dieser fällt in der Pilocarpin-Gruppe geringer aus, als in den Kontroll-Gruppen.

Unerwarteterweise zeigt Tabelle 11 einen generalisierten Effekt von BHB. Insgesamt kommt es in der einstündigen Aufzeichnung von Feldpotentialen zu einer Erhöhung der ETP-Rate. BHB verschlimmert demnach die epileptische Aktivität im Schnitt.

In der Abb. 30 wurden diese Effekte graphisch dargestellt. Mit einem gepaartem t-Test, $p=0,036$, stellt sich ein signifikantes Ergebnis dar. Die Abb. 30 zeigt den globalen Mittelwert mit BHB und ohne BHB. Die Werte der Boxplot-Abbildung sind alle gemittelt, Pilo- und Kontrolltiere wurden zusammenfassend betrachtet. Dadurch konnte mit einer hohen n-Zahl, $n=70$, gerechnet werden. Abb. 30 bestätigt die oben beschriebene dreifaktorielle Varianzanalyse.

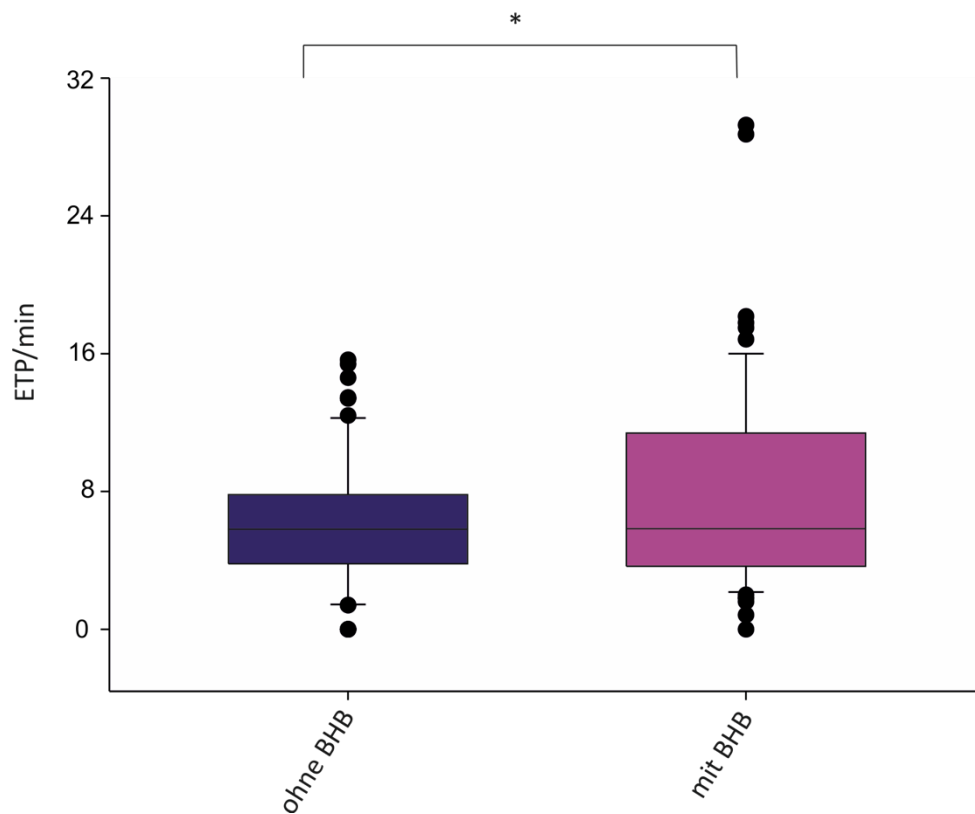


ABBILDUNG 30: **BOXPLOT MIT BHB vs OHNE BHB**

DARGESTELLT WURDE DER GLOBALE MITTELWERT ALLER ETP/MIN MIT BHB (PINK) UND OHNE BHB (BLAU). DIE PILOCARPIN-GRUPPEN WURDEN MIT DEN KONTROLL-GRUPPEN ZUSAMMEN BETRACHTET, N=70. * DIE GEMITTELTEN WERTE DER ETP/MIN MIT BHB (PINK) WAREN SIGNIFIKANT VERSCHIEDEN GEGENÜBER DER MITTELWERTE ALLER ETP/MIN OHNE BHB (BLAU) P=0,036 (IM GEPAARTEN T-TEST).

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt vom Kaliumkanal-Blocker (XE991) und der Effekt eines Kaliumkanalöffners (BHB) im chronisch epileptischen Gewebe betrachtet. Im Mittelpunkt der Versuche standen dabei die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv7.2 sowie Kv7.3 (Noebels et al., 2012). Demnach kommt es hier zu Anfällen, welche aufgrund einer Funktionsminderung der M-Typ Kanäle (Kv7.2/3.) mit gleichzeitiger Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit verursacht werden. Mutationen in den codierenden Genen KCNQ2/3 beschreiben eine Reihe von Ursachen für die genetisch bedingte Epilepsie im Kindesalter. In dieser Arbeit lag der Fokus hingegen in der erworbenen fokalen Epilepsie. Hier gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse. Um die mTLE nachzuahmen, wurde das Ratten-Pilocarpin-Modell in Funktion mit elektrophysiologischen Feldpotential-Messungen untersucht.

4.1 LIMITATION

Die Methodenkritik erläutert die unvermeidbaren Grenzen des Versuchsaufbaus und deren Einfluss auf das Versuchsergebnis. Systematische Fehler wurden durch ein variables Vorgehen innerhalb der Versuchsgruppen vermieden. So wurde nicht nur eine Tierreihe mit einem Medikament behandelt, sondern die Abläufe wurden bewusst gemischt durchgeführt.

Durch Randomisierung aller Versuchsgruppen, Bildung von Mittelwerten und einer hohen n-Zahl konnten die statistischen Fehler möglichst geringgehalten werden. Des Weiteren wurde jeder Versuch nach dem gleichen Schema durchgeführt. Die Durchflussgeschwindigkeiten und Inkubationszeiten mussten exakt eingehalten. Vor allem die Präparation eines jeden Tieres erfolgte unter präziser Zeitüberwachung.

Eine weitere unvermeidbare Grenze des Versuchsaufbaus zeigt sich im Tiermodell, welches an sich keine Erkrankung darstellt, sondern diese lediglich nachahmt. Unter anderem stellt das In-vitro-Vorgehen einen deutlichen Unterschied zum In-vivo-Modell dar. In der Wissenschaft jedoch, wurde an vielen Stellen bereits gezeigt, dass das In-vitro-Tiermodell vergleichbare Daten zur menschlichen mTLE (mesialen Temporallappenepilepsie) aufweist (Kay et al., 2015). Demnach ist es nicht abwegig, die humane mesiale TLE am Tiermodell zu untersuchen. Das Pilocarpin-Tiermodell nach (Turski et al., 1983) stellt seit 40 Jahren ein stabiles anwendbares Modell dar.

Nach (Ahmed Juvale and Che Has, 2020) ist das Pilocarpin-Modell das erste seiner Art, das alle Kriterien erfüllt, die für ein Tiermodell mit Status epilepticus (SE) wesentlich sind. Es gibt zum einen die Latenzzeit, gefolgt von spontanen, wiederkehrenden Anfällen (SRS). Im Pilocarpin-Modell werden Neuropathologien, wie Verhaltensveränderungen, elektrografische, metabolischen und neuropathologischen Veränderungen nachgeahmt. Unter anderem lassen sich Pharmakoresistenzen gegenüber AEDs (antiepileptic drugs), die ebenso bei der menschlichen SE zu beobachten sind, auch im Tiermodell verzeichnen.

Die Übertragbarkeit vom Tiermodell auf die menschliche Erkrankung ließ wissenschaftlichen Arbeiten schon in den frühen 80er-Jahren Hoffnung auf die Entwicklung potenzieller Therapeutika bezüglich mTLE (Ahmed Juvale and Che Has, 2020).

Eine weitere Grenze dieser Arbeit stellt das Auslösen von Spontanaktivität dar. Es steht außer Frage, dass die Erkrankung mit Hilfe der ausgelösten Spontanaktivitäten weitestgehend nur nachgeahmt wurde. Um hier Schwankungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde in allen Versuchen jeder Arbeitsschritt gleichmäßig und sorgfältig durchgeführt. Die Inkubationszeiten wurden exakt eingehalten und Latenzzeiten wurden beachtet, um auch unter Spontanaktivitäten genaueste Ergebnisse zu erzielen.

4.2 DIE ROLLE VON GABA_A-REZEPTOREN

Zahlreiche Forschungsgruppen (Kernig et al., 2012; Mayer et al., 2020; Swartzweldera et al., 1987) untersuchten die zellulären Mechanismen am Hippocampus in vitro, identisch mit den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe von Gabazin (SR95531), ein GABA_A-Rezeptor-Blocker, wird Spontanaktivität als akutes Epilepsiemodell induziert. Bei der akut epileptiformen Aktivität treten zelluläre Veränderungen schon nach kurzer Zeit auf. Mit Bicucullin, welches ebenfalls als ein GABA_A-Rezeptor-Blocker wirkt, kommt es zur Reduktion tonisch, inhibitorischer Aktivität GABAerger Synapsen. Daraufhin werden akut epileptiforme Aktivitäten ausgelöst (Williamson and Wheal, 1992). Gabazin, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, zeigt optimale Eigenschaften zur Untersuchung von epileptischem Gewebe, im Gegensatz zu Bicucullin. Das Bicucullin blockiert eine Reihe von SK-Kanälen, wie den Calciumabhängigen Kaliumstrom (K_{Ca2+}-Kanal). Dieser Kaliumstrom ist am mAHP (afterhyperpolarisation potential= calciumabhängige Nachpotential) beteiligt, welcher die neuronale Erregbarkeit im Nervenzellverband hemmend moduliert. Da davon auszugehen wird, dass das mAHP bei Epilepsie

reduziert vorkommt, wäre Bicucullin zur Untersuchung der Epileptogenese problematisch zu betrachten. Das Bicucullin modifiziert das AHP indirekt. Es reduziert den Calciumabhängigen Kaliumstrom, welcher für das AHP essentiell ist. Da das AHP im epileptischen Gewebe ohnehin reduziert vorkommt, fördert Bicucullin die Anfallsentladung im epileptischen Gewebe zusätzlich. Gabazin hingegen modifiziert *nicht* das AHP. Es hemmt *selektiv* den GABA_A induzierten Chlorid-Strom (Seutin et al., 1997). Gabazin ist im Gegensatz zu Bicucullin eine bessere Alternative zur Untersuchung der Epileptogenese.

Seit den 50er-Jahren ist bekannt, dass es unter Hemmung synaptischer Transmission zur Verlängerung hippocampaler Neuronen kommt, was demnach zur Ausbildung epileptischer Aktivität führt (Matsumoto et al., 1969). Eine anhaltende synaptische Erregung führt zu repetitiven Aktionspotential-Folgen, sogenannten BURSTs. Diese sind durch ein prolongiertes AHP gekennzeichnet (Hotson and Prince, 1980). In den genannten Arbeiten (Tab. 13) kommt es unter der Gabe von GZ, 0 Mg²⁺, hoch K⁺ oder Bicucullin zur Steigerung neuronaler Aktivität. Diese Daten stimmen mit den Daten der vorliegenden Arbeit überein. Auch hier kam es unter Gabazin-Gabe (s. Kapitel 3 Ergebnisse Abb. 11) zu einer signifikanten Erhöhung der ETP-Rate. Die Ergebnisse des GZ-Effektes zeigten ähnliche Frequenzen wie die in Tab. 13 dargestellten Daten. Demzufolge sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erwartbare und repräsentative Daten.

TABELLE 13: VERGLEICH VERSCHIEDENER AKUTER EPILEPSIEMODELLE

Akutes Modell	Typischer Befund		Hirnregion	Referenz
	·Amplitude [mV/ETP]	·Frequenz [ETP/min]		
0 Mg ²⁺ ; 8 mM K ⁺ und 5 μM GZ	12 ETP/min		Neocortex+ C6 Gliomzelle	(Mayer et al., 2020)
Gabazin 5 μM	1 mV/ETP		Hippocampus CA1	(Kernig et al., 2012)
Gabazin 5 μM	5 ETP/min		Hippocampus CA1	Vorliegende Arbeit
Bicucullin 2 μM	4 mV/ETP		Hippocampus CA1	(Williamson and Wheal, 1992)
0 Mg ²⁺	4 ETP/min		Hippocampus CA1	(Brehme, 2015; Swartzweldera et al., 1987)
0 Mg ²⁺	24 ETP/min		Hippocampus CA3	(Swartzweldera et al., 1987)

4.3 DIE ROLLE VON Kv7-KANÄLEN

Ein etablierter Kv7-Kanalblocker ist XE991 (Sato et al., 2022). Unter XE991 kommt es zu einer Hemmung von Kv7-Kanälen. Dies wiederum führt zur Depolarisation des Membranpotentials und erhöht somit das depolarisierende Nachpotential. Die intrinsische Erregbarkeit ist in diesen Zellen erhöht (Petrovic et al., 2012). Aus vorangegangenen Arbeiten geht hervor, dass XE991 die LTP-typische Funktion (Langzeitpotentierung) des Hippocampus steigert. Des Weiteren ist die zelluläre Erregbarkeit gesteigert. In Übereinstimmung damit können epileptiforme fEPSP-Nachpotentiale in Gegenwart des Kv7-Kanalblockers XE991 beobachtet werden, welche sich in den Daten dieser Arbeit widerspiegeln.

Ein weiterer K⁺-Kanalblocker stellt Linopiridin dar. Unter dessen Einfluss kommt es zur Inhibition des M-Stroms. Linopiridin besitzt demnach die Fähigkeit mit Hilfe eines subschwelligen Stimulus LTP im Hippocampus zu induzieren. Dies führt beispielsweise zu Verbesserungen der Leistung in Lern- und Gedächtnistests bei beeinträchtigten Ratten (Lampe et al., 1997).

Die Arbeitsgruppe um (Fontán-Lozano et al., 2011) untersuchte ebenso Linopiridin, als weiteren M-Strom Inhibitor. Auch hier kam es zu einer Steigerung des LTPs.

Durch pharmakologische Hemmung mit XE991 konnte festgestellt werden, dass das sAHP durch Kv7- und Kir6-Kanäle vermittelt wird. Das langsame nachhyperpolarisierende Potential verlangsamt die neuronale Erregbarkeit für Sekunden und prägt das Entladungsverhalten eines Neurons maßgeblich (Laker et al., 2021). Nach (Sun and Kapur, 2012) kam es ebenso zur erhöhten Erregbarkeit in den Zellen. Nach Anwendung von M-Kanal-Blockern konnten Häufigkeiten von sEPSCs und mEPSCs verzeichnet werden. Dies geht einher mit den Daten der vorliegenden Studie. Die Kontrollschnitte zeigen einen signifikanten Unterschied im GZ-Intervall zu den GZ+XE991 Intervallen, welcher sich im chronisch epileptischen Gewebe nicht widerspiegelte.

In unserer Arbeitsgruppe von Mitdotorandinnen (Hendinger, 2022; Kartheus, 2021) kam es zu einer verringerten mRNA-Häufigkeit für Kv7.2 und Kv7.3 bei Pilocarpin behandelten Tieren. Aus den Daten dieser Arbeiten geht hervor, dass es zu einer erhöhten Hyperexzitabilität unter Blockierung von Kv7-Kanälen mit XE991 im Kontrollgewebe kam. Diese Hyperexzitabilität wiederum, ist im chronisch epileptischen Gewebe nicht zu erkennen.

Unter der Annahme, dass es zu einer transkriptionellen Herunterregulierung von Kv7.2 und Kv7.3 in der CA1 Region von epileptischen Tieren kam, lässt sich vermuten, dass XE991 die Wirkung in diesem Gewebe verdeckte.

Unter Zugabe von XE991 zu Gabazin, kam es zu einer Steigerung der rezidivierenden epileptiformen Entladungen in Kontrollschnitten. Diese wiesen dann eine mit dem epileptischen Gewebe vergleichbare Häufigkeit auf. Dies deutet darauf hin, dass die anfänglich höhere RED-Inzidenz im epileptischen Gewebe durch die kombinierte Wirkung von Gabazin und der reduzierten Expression von Kv7.2/7.3 verursacht wurde. Eine wesentliche Folge der beeinträchtigten Kv7-Kanalfunktion zeigt sich somit in der epileptischen Übererregbarkeit in dem mit Pilocarpin behandelten Gewebe.

In der Pilo-Tiergruppe lässt sich kein signifikanter Effekt unter Blockade von Kv7-Kanälen verzeichnen, da diese weniger Kv7-Kanäle exprimieren. Kommt es aber unter den Kontrolltieren zur XE991 induzierten Hemmung der reduziert vorkommenden Kv7-Kanäle, nähern sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe denen der mit Pilocarpin behandelten Tiere an. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine beeinträchtigte Kv7.2/7.3-Funktion nicht nur bei genetischer Epilepsie, sondern auch bei erworbener fokaler Epilepsie relevant ist.

Zusammenfassend zeigten die erhobenen Daten mit den oben genannten Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe (Kartheus 2021 und Hendinger 2022), einen konsistenten Befund, da es bei Epilepsie zu einer Herunterregulation von Kv7-Kanälen kommt.

4.4 DIE ROLLE VON KV7-KANAL-ÖFFNERN

Die Ketogene Diät ähnelt dem Fasten, welche seit Hippokrates bekannt ist und angewandt wird (Hartman et al., 2013). Trotz des Erfolges der KD sind die genauen Wirkmechanismen immer noch unklar. In den nachfolgenden Studien wurde am häufigsten mit dem Ketonkörper β -Hydroxybutyrat (BHB) gearbeitet, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde. In einer Studie von (Gilbert et al., 2000) wurde die Beziehung zwischen dem BHB-Spiegel im Blut und der Anfallshäufigkeit bei Kindern, die eine ketogene Diät erhielten, bestimmt. Bei einem BHB-Blutspiegel von mehr als 4 mmol/l war die Wahrscheinlichkeit einer Abnahme der Anfallshäufigkeit signifikant höher, als bei Kindern mit einem Serum BHB Spiegel von weniger als 4 mmol/l.

Weitere relevante Wirkungen vom BHB, neben dem Ersatz der Glucose als neuronaler Energielieferant, zeigen sich in der neuroprotektive Wirkung (Rahman et al., 2014) sowie in der Unterstützung des synaptischen Vesikel-Recyclings (Hrynevich et al., 2016). BHB führt hier diätetisch zur Aktivierung eines Hydroxycarbonsäure-Rezeptors 2, welcher wiederum die Prostaglandin2-Synthase induziert. (Hrynevich et al., 2016) untersuchte die nicht-glykolytischen Energiesubstrate BHB und Pyruvat. Sie unterstützen als Hauptenergiesubstrate das synaptische Vesikel-Recycling an Synaptosomen.

Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden, sodass sie viel Raum für weitere Forschung offenlassen. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die der ketogenen Diät zugrunde liegen ist unabdinglich, um eine molekulare Aufschlüsselung zu erlangen. Diese könnte die vorteilhafte Wirkung der Ketose nachahmen und die damit verbundenen Nebenwirkungen, wie Störungen des Magen-Darm-Traktes und Vitamin- und Mineralstoffmangel eliminieren.

Heute ist die ketogene Diät eine Therapieoption, die additiv zur meist bestehenden antikonvulsiven Therapie unter stationären Bedingungen evaluiert wird (McDonald and Cervenka, 2018).

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (KCNQ2-5-Untereinheiten, insbesondere KCNQ2/3-Heteromeren) erzeugen den epileptisch protektiven M-Strom (Manville et al., 2020). Mutationen in den Genen KCNQ2 und KCNQ3 treten am häufigsten bei den genetischen Formen der Epilepsie auf. Die KCNQ-Varianten sind je nach ausgewählter Population für 1-13% der genetisch diagnostizierten Epilepsiepatienten verantwortlich (Ritter et al., 2021).

Unter der Annahme, dass die epileptische Übererregbarkeit auf schlecht funktionierende K⁺-Kanäle zurückzuführen ist, gibt es ein großes Interesse, die K⁺-Kanal-Öffner weiter zu erforschen, um diese zur Behandlung von Epilepsie einsetzen zu können.

Einer der ersten K⁺-Kanal-Öffner, der für die Behandlung von Epilepsie bedeutsam wurde, ist Retigabin. Wie oben erwähnt, beschreibt die Öffnung der Kv7-Kanäle einen wertvollen Wirkmechanismus zur Bekämpfung der epileptischen Übererregbarkeit (Zhuang et al., 2023). Die Anwendung von Retigabin im Pentylentetrazol-Modell wurde im Hornhautentzündungsmodell (Kalappa et al., 2015) und im Kainat-Modell (Greene et al., 2018; Ihara et al., 2016; West et al., 2018) erneut beschrieben.

Als K⁺-Kanal-Öffner wurde in dieser Arbeit β -Hydroxybutyrat (BHB) verwendet. Dieses wirkt als Antikonvulsivum, vor allem durch die Bindung an den Kv7.3 (Manville et al., 2020; Miceli et al., 2020). Zahlreiche andere Publikationen arbeiteten mit dem gleichen Wirkstoff BHB, sodass die Daten der vorliegenden Arbeit gut vergleichbar sind. In dieser Dissertation wurde versucht, die durch Gabazin und XE991 induzierte Übererregbarkeit mit Hilfe von BHB zu verbessern. Ohne die Häufigkeit oder Dauer der REDs bei den mit Pilocarpin behandelten Tieren zu verändern, verschlimmerte BHB die Situation in den Kontrollschnitten jedoch so, dass es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Zeitpunkten Ende der GZ-Zeit und Ende der GZ/XE991-Zeit gab. Ohne BHB ließ sich ein signifikanter Unterschied verzeichnen. Dieser Effekt bietet weitere Ansätze für neue Erkenntnisse, da zu Beginn der Arbeit eine andere Vorstellung in Bezug auf die Wirkung des BHBs angenommen wurde. Augenscheinlich ist der K⁺-Kanal im epileptischen Gewebe nicht mehr oder nur noch reduziert vorhanden, sodass das BHB dort nicht als Kanalöffner protektiv wirken kann.

Anders zeigt sich die Wirkung von BHB im Epilepsiemodel, Pentylentetrazol induziert. Hier wirkt es protektiv und antepileptisch (Manville et al., 2020). Pentylentetrazol ruft, ähnlich wie Pilocarpin, eine Epileptogenese hervor. Dies öffnet einen neuen Blick und lässt Raum für weitere Versuche. Ob es im Pentylentetrazol-Modell auch zu einer Reduktion der Kv7-Kanäle kommt wurde bisher noch nicht weiter untersucht.

4.5 AUSBLICK MIT KLINISCHER RELEVANZ

Epilepsie ist, trotz intensiver Forschung, eine uns immer noch dominierende Krankheit, die bisher ausschließlich symptomatisch therapiert wird. Nur 40% der Patienten mit TLE sprechen auf die medikamentöse Therapie an. Daher gibt es immer noch viele offene Fragen bezüglich pharmakologischer Wirkung von Antikonvulsiva.

Wenn davon ausgegangen wird, dass die Kv7-Kanäle bei den erkrankten Patienten noch vollständig vorhanden sind, diese Kanäle aber womöglich verändert exprimiert werden, stellt die Ketogene Diät/ das BHB ein attraktives Medikament zur Behandlung der Epilepsie dar. Im Großen und Ganzen stellen K⁺-Kanal-Öffner, die Ketogene Diät oder BHB selbst eine attraktive Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Epilepsieerkrankungen dar, solange noch zu beeinflussende K⁺-Kanäle vorhanden sind.

Wenn die zu aktivierenden K⁺-Kanäle weniger exprimiert vorliegen, scheint BHB weniger zu wirken. Dies stellt eine deutliche Grenze in der Anwendbarkeit von protektiven K⁺-Kanal-Öffnern dar. Diese Annahme könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, warum BHB nicht bei allen Patienten gleich effektiv wirkt.

Genau diese Grenze des BHBs lässt sich auch auf andere therapieresistente Patientengruppen in Bezug auf andere Medikamente übertragen. Es erklärt möglicherweise, warum nicht alle Medikamente bei unterschiedlichen Patientengruppen denselben Effekt zeigen.

Nach (Kay et al., 2015) zeigt Valproat einen Einfluss auf den antiepileptisch wirkenden M-Strom. Valproat aktiviert diesen M-Strom und somit auch die K⁺-Kanäle. Wenn davon ausgegangen wird, dass Kv-Kanäle geringer exprimiert vorkommen, kann Valproat auch nur eingeschränkt an den weniger vorhandenen K⁺-Kanälen wirken. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Unterdrückung des M-Stroms zur Pathophysiologie von Anfällen beiträgt und dass der Erhalt des M-Stroms während der Anfälle an der antikonvulsiven Wirkung von Valproat beteiligt ist. Diese Erkenntnisse und die Wirkung der K⁺-Kanal-Öffner in dieser Arbeit, könnten Aufschlüsse und biochemische Ziele für die Entwicklung besserer antiepileptischer Behandlungen liefern.

Die verschiedenen Wirkmechanismen einzelner Medikamente lassen sich aufgrund unterschiedlicher Ursachen der Epileptogenese erklären. Im Zweifel wird das am besten wirkende

Medikament direkt während der Therapie ausprobiert werden müssen oder es öffnet einen weiteren Ausblick in die personalisierte Medizin. In dieser stützt sich die Auswahl eines bestimmten Medikamentes nicht nur auf die Diagnose des einzelnen Patienten, sondern auf zusätzliche Parameter, wie genetische, molekulare und zelluläre Besonderheiten. Demnach werden die Wirksamkeit, Verträglichkeit und optimale Dosierung des in Betracht kommenden Medikamentes in die Therapieplanung mit einbezogen (Goetz and Schork, 2018). So lässt sich beispielsweise mit Hilfe eines MRTs die Zusammensetzung des Gehirns darstellen. Verschiedene Neurotransmitter werden hiermit bestimmt und eine personalisierte, dem Patienten zugeschnittene Therapie, kann evaluiert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsie zählt zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter. Die mesiale Temporallappenepilepsie (mTLE) stellt eine weitverbreitete Form der erworbenen fokalen Epilepsie dar. Eine häufige Ursache der mTLE ist die Hippocampusklerose. Hier kommt es zum Neuronenverlust und damit einhergehend zur synaptischen Reorganisation.

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv7.2 sowie Kv7.3 sind seit geraumer Zeit Gegenstand der Erforschung genetisch bedingter Epilepsie. Sie bilden den sogenannten M-Strom und ihnen werden in der Literatur anfallsschützende Eigenschaften zugeschrieben. Bei Mutationen in den dazugehörigen Genen der Kv7.2 und Kv7.3 Kanäle kommt es zu einer Funktionsminderung der M-Typ Kanäle mit gleichzeitiger Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit. Ob ihnen auch bei einer erworbenen fokalen Epilepsie im Gegensatz zu der genetischen Epilepsie eine Rolle zukommt, ist nicht bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieser Kaliumkanäle bei einem Tiermodell der mTLE untersucht (Pilocarpin-Modell). Es weist große pathophysiologische und elektrophysiologische Übereinstimmungen mit mTLE auf. Zunächst wurde eine akute Spontanaktivität im Hirnschnitt mit Hilfe von Gabazin ausgelöst. Unter zusätzlicher Blockade von Kv7-Kanälen mit XE991 kam es zu einer gesteigerten Übererregbarkeit im Kontrollgewebe, welche sich nicht im chronisch epileptischen Gewebe widerspiegelte. Diese Ergebnisse gehen einher mit anderen Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe. Hier kam es zu einer transkriptionellen Herunterregulierung von Kv7.2/7.3, sodass angenommen werden kann, dass die Wirkung von XE991 in diesem Gewebe verdeckt wurde.

Unter der Annahme, dass β -Hydroxybutyrat, in der Literatur als Kv7-Kanalöffner bezeichnet, protektiv der Hyperexzitabilität entgegenwirken könnte, wurden die bisherigen Versuche unter Vorbehandlung mit β -Hydroxybutyrat wiederholt. β -Hydroxybutyrat schwächte die Übererregbarkeit jedoch nicht ab. Zusammenfassend lässt sich aus der geringeren Wirksamkeit von Kv7-Kanalöffnern eine mögliche Erklärung für die arzneimittelresistente Epilepsie annehmen. Des Weiteren lassen die Ergebnisse Raum für die Annahme, dass eine beeinträchtigte Funktion der Kv7.2/7.3-Kanäle, nicht nur bei genetischer Epilepsie, sondern auch bei erworbener fokaler Epilepsie, wie mTLE, eine Rolle spielen. Diese Erkenntnisse und die Wirkung der K^+ -Kanal-Öffner könnten Aufschlüsse und biochemische Ziele für die Entwicklung besserer anti-epileptischer Behandlungen liefern.

VI. THESEN

- 1.** Die mesiale Temporallappenepilepsie (mTLE) ist eine der häufigsten Formen erworbener, fokaler Epilepsie.

- 2.** Die Applikation von Pilocarpin in vivo (als chronisches Tiermodell), löst eine Temporallappenepilepsie bei Ratten aus und weist Eigenschaften von chronisch epileptischem Gewebe auf.

- 3.** Kaliumkanäle vom Typ 7.2. und 7.3. bilden einen für die Nervenzelle essenziellen hyperpolarisierenden K^+ -Strom.

- 4.** Mutationen der Gene dieser Kv7.2 und Kv7.3 Kanäle führen zu einer Funktionsminderung mit gleichzeitiger Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit und sind eine bekannte Ursache genetischer Epilepsien.

- 5.** Aus Vordaten war bekannt, dass es im chronisch epileptischen Gewebe zu einer verminderten Expression der Proteine, die für die Kaliumkanal-Gene codieren (Kv7.2 und Kv7.3), kommt.

- 6.** Zunächst wurde mit Gabazin, einem selektiven GABA_A-Antagonisten, eine akute Spontanaktivität im Hirnschnitt ausgelöst.

- 7.** Unter der pharmakologischen Hemmung von Kv7-Kanälen mit XE991 wurde die durch Gabazin ausgelöste Übererregbarkeit im Kontrollgewebe weiter signifikant gesteigert.

- 8.** Im chronisch epileptischen Gewebe führte die Zugabe von XE991 zu keiner weiteren Steigerung der durch Gabazin ausgelösten Übererregbarkeit.

- 10.** β -Hydroxybutyrat, in der Literatur als Kv7-Kanalöffner beschrieben, konnte die Übererregbarkeit nicht abschwächen.

- 11.** Anzunehmen ist, dass es aufgrund der Herunterregulation von Kv7-Kanälen nicht zu einer Abschwächung der Übererregbarkeit im epileptischen Gewebe, durch β -Hydroxybutyrat gekommen ist.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed Juvale, I.I., Che Has, A.T., 2020. The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6, e04557. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
- Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E., Le Gal La Salle, G., 1979. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* 163, 176–179. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90163-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90163-X)
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A Potassium Channel Mutation in Neonatal Human Epilepsy. *Science* 279, 403–406. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.403>
- Blümcke, I., Pauli, E., Clusmann, H., Schramm, J., Becker, A., Elger, C., Merschhemke, M., Meencke, H.-J., Lehmann, T., von Deimling, A., Scheiwe, C., Zentner, J., Volk, B., Romstöck, J., Stefan, H., Hildebrandt, M., 2007. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 113, 235–244. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0187-0>
- Brehme, H., 2015. Einfluss des Proteinkinase CK 2 Inhibitors 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol auf das Nachpotential im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie. Universität Rostock, Rostock.
- Brehme, H., Kirschstein, T., Schulz, R., Köhling, R., 2014. In vivo treatment with the casein kinase 2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromotriazole augments the slow afterhyperpolarizing potential and prevents acute epileptiform activity. *Epilepsia* 55, 175–183. <https://doi.org/10.1111/epi.12474>
- de Sevilla, D.F., Garduño, J., Galván, E., Buño, W., 2006. Calcium-Activated Afterhyperpolarizations Regulate Synchronization and Timing of Epileptiform Bursts in Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons. *J. Neurophysiol.* 96, 3028–3041. <https://doi.org/10.1152/jn.00434.2006>
- Fontán-Lozano, Á., Suárez-Pereira, I., Delgado-García, J.M., Carrión, Á.M., 2011. The M-current inhibitor XE991 decreases the stimulation threshold for long-term synaptic plasticity in healthy mice and in models of cognitive disease. *Hippocampus* 21, 22–32. <https://doi.org/10.1002/hipo.20717>
-

- French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., Spencer, D.D., 1993. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann. Neurol.* 34, 774–780. <https://doi.org/10.1002/ana.410340604>
- Gilbert, D.L., Pyzik, P.L., Freeman, J.M., 2000. The ketogenic diet: seizure control correlates better with serum beta-hydroxybutyrate than with urine ketones. *J. Child Neurol.* 15, 787–790. <https://doi.org/10.1177/088307380001501203>
- Goddard, G.V., 1967. Development of Epileptic Seizures through Brain Stimulation at Low Intensity. *Nature* 214, 1020–1021. <https://doi.org/10.1038/2141020a0>
- Goetz, L.H., Schork, N.J., 2018. Personalized Medicine: Motivation, Challenges and Progress. *Fertil. Steril.* 109, 952–963. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.006>
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., Latorre, R., 2012. K(+) channels: function-structural overview. *Compr. Physiol.* 2, 2087–2149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
- Greene, D.L., Kosenko, A., Hoshi, N., 2018. Attenuating M-current suppression in vivo by a mutant *Kcnq2* gene knock-in reduces seizure burden and prevents status epilepticus-induced neuronal death and epileptogenesis. *Epilepsia* 59, 1908–1918. <https://doi.org/10.1111/epi.14541>
- Håberg, S.E., Aaberg, K.M., Surén, P., Trogstad, L., Ghaderi, S., Stoltenberg, C., Magnus, P., Bakken, I.J., 2018. Epilepsy in Children After Pandemic Influenza Vaccination. *Pediatrics* 141, e20170752. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0752>
- Hartman, A.L., Rubenstein, J.E., Kossoff, E.H., 2013. Intermittent fasting: A “new” historical strategy for controlling seizures? *Epilepsy Res.* 104, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.10.011>
- Hauser, W.A., 1995. Epidemiology of epilepsy in children. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 6, 419–429.
- Hendinger, E.A., 2022. Proteinexpression der Kaliumkanäle Kir6.1, Kir6.2 und KCNQ2 im Tiermodell chronischer Epilepsie. https://doi.org/10.18453/ROSDOK_ID00004334
- Hotson, J.R., Prince, D.A., 1980. A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* <https://doi.org/10.1152/jn.1980.43.2.409>
-

- Hrynevich, S.V., Waseem, T.V., Hébert, A., Pellerin, L., Fedorovich, S.V., 2016. β -Hydroxybutyrate supports synaptic vesicle cycling but reduces endocytosis and exocytosis in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Int.* 93, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuroint.2015.12.014>
- Hufschmidt, A., Lücking, C.H., Rauer, S., Glocker, F.X., Amtage, F. (Eds.), 2017. *Neurologie compact: für Klinik und Praxis*, 7., überarbeitete und erweiterte Auflage. ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York. <https://doi.org/10.1055/b-005-143671>
- Ihara, Y., Tomonoh, Y., Deshimaru, M., Zhang, B., Uchida, T., Ishii, A., Hirose, S., 2016. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. *PLoS ONE* 11, e0150095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150095>
- Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1992. Structural Elements Involved in Specific K⁺ Channel Functions. *Annu. Rev. Physiol.* 537–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.002541>.
- Kalappa, B.I., Soh, H., Duignan, K.M., Furuya, T., Edwards, S., Tzingounis, A.V., Tzounopoulos, T., 2015. Potent KCNQ2/3-Specific Channel Activator Suppresses In Vivo Epileptic Activity and Prevents the Development of Tinnitus. *J. Neurosci.* 35, 8829–8842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5176-14.2015>
- Kartheus, M., 2021. *Differentielle Transkriptionsveränderungen von Kaliumkanälen bei chronischer Epilepsie*. Rostock.
- Kay, H.Y., Greene, D.L., Kang, S., Kosenko, A., Hoshi, N., 2015. M-current preservation contributes to anticonvulsant effects of valproic acid. *J. Clin. Invest.* 125, 3904–3914. <https://doi.org/10.1172/JCI79727>
- Kernig, K., Kirschstein, T., Würdemann, T., Rohde, M., Köhling, R., 2012. The afterhyperpolarizing potential following a train of action potentials is suppressed in an acute epilepsy model in the rat Cornu Ammonis 1 area. *Neuroscience* 201, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.008>
- Kinsman, S.L., Vining, E.P., Quaskey, S.A., Mellits, D., Freeman, J.M., 1992. Efficacy of the ketogenic diet for intractable seizure disorders: review of 58 cases. *Epilepsia* 33, 1132–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01770.x>
- Köhling, R., Wolfart, J., 2016. Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022871. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022871>
-

- Kwan, P., Brodie, M.J., 2000. Early Identification of Refractory Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 342, 314–319. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420503>
- Laker, D., Tolle, F., Stegen, M., Heerdegen, M., Köhling, R., Kirschstein, T., Wolfart, J., 2021. Kv7 and Kir6 Channels Shape the Slow AHP in Mouse Dentate Gyrus Granule Cells and Control Burst-like Firing Behavior. *Neuroscience* 467, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.025>
- Lampe, B.J., Gaskill, J.L., Keim, S.C., Brown, B.S., 1997. Linopirdine reduces stimulus intensity threshold for induction of long-term potentiation in the Schaffer collateral/CA1 pathway in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 222, 135–137. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13347-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13347-X)
- Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1990. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 511–517. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80076-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80076-4)
- Löffler, G. (Ed.), 2007. *Biochemie und Pathobiochemie: mit ... 192 Tabellen, [+ online specials, lehrbuch-medizin.de]*, 8., völlig neu bearb. Aufl. ed, Springer-Lehrbuch. Springer-Medizin-Verl, Heidelberg.
- Manville, R.W., Papanikolaou, M., Abbott, G.W., 2020. M-Channel Activation Contributes to the Anticonvulsant Action of the Ketone Body β -Hydroxybutyrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 372, 148–156. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.263350>
- Matsumoto, H., Ayala, G.F., Gumnit, R.J., 1969. Neuronal behavior and triggering mechanism in cortical epileptic focus. *J. Neurophysiol.* <https://doi.org/10.1152/jn.1969.32.5.688>
- Mayer, J., Kirschstein, T., Resch, T., Porath, K., Krause, B.J., Köhling, R., Lange, F., 2020. Perampanel attenuates epileptiform phenotype in C6 glioma. *Neurosci. Lett.* 715, 134629. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134629>
- McDonald, T., Cervenka, M., 2018. The Expanding Role of Ketogenic Diets in Adult Neurological Disorders. *Brain Sci.* 8, 148. <https://doi.org/10.3390/brainsci8080148>
- Miceli, F., Carotenuto, L., Barrese, V., Soldovieri, M.V., Heinzen, E.L., Mandel, A.M., Lippa, N., Bier, L., Goldstein, D.B., Cooper, E.C., Cilio, M.R., Tagliatela, M., Sands, T.T., 2020. A Novel Kv7.3 Variant in the Voltage-Sensing S4 Segment in a Family With Benign Neonatal Epilepsy: Functional Characterization and in vitro Rescue by β -Hydroxybutyrate. *Front. Physiol.* 11, 1040. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01040>
-

- Müller, S., Guli, X., Hey, J., Einsle, A., Pfanz, D., Sudmann, V., Kirschstein, T., Köhling, R., 2018. Acute epileptiform activity induced by gabazine involves proteasomal rather than lysosomal degradation of KCa2.2 channels. *Neurobiol. Dis.* 112, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.01.005>
- Müller, S., Kartheus, M., Hendinger, E., Hübner, D.-C., Schnell, E., Rackow, S., Bertsche, A., Köhling, R., Kirschstein, T., 2024. Persistent Kv7.2/7.3 downregulation in the rat pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 200, 107296. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2024.107296>
- Noebels, J., Avoli, M., Rogawski, M., 2012. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th ed. ed. Oxford University Press, New York.
- Payne, N.E., Cross, J.H., Sander, J.W., Sisodiya, S.M., 2011. The ketogenic and related diets in adolescents and adults—A review. *Epilepsia* 52, 1941–1948. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03287.x>
- Petrovic, M.M., Nowacki, J., Olivo, V., Tsaneva-Atanasova, K., Randall, A.D., Mellor, J.R., 2012. Inhibition of Post-Synaptic Kv7/KCNQ/M Channels Facilitates Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *PLoS ONE* 7, e30402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030402>
- Pschyrembel, W. (Ed.), 2014. *Klinisches Wörterbuch*, 266., aktualisierte Auflage. ed. Walter de Gruyter GmbH, Berlin ; Boston.
- Rahman, M., Muhammad, S., Khan, M.A., Chen, H., Ridder, D.A., Müller-Fielitz, H., Pokorná, B., Vollbrandt, T., Stölting, I., Nadrowitz, R., Okun, J.G., Offermanns, S., Schwaninger, M., 2014. The β -hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages. *Nat. Commun.* 5, 3944. <https://doi.org/10.1038/ncomms4944>
- Ritter, D.M., Horn, P.S., Holland, K.D., 2021. In Silico Predictions of KCNQ Variant Pathogenicity in Epilepsy. *Pediatr. Neurol.* 118, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.01.006>
- Robert S. Fisher, object, 2017. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.

- Sato, A., Kojima, F., Hayashi, T., Arichi, S., Maruo, Y., Ishibashi, H., Eto, K., 2022. The KCNQ channel inhibitor XE991 suppresses nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in rat intracardiac ganglion neurons. *Pharmacol. Rep. PR* 74, 745–751. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00375-y>
- Scheibel, M.E., Crandall, P.H., Scheibel, A.B., 1974. The Hippocampal-Dentate Complex in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 15, 55–80. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1974.tb03997.x>
- Schneble, H., 2013. *Historisches zur Epilepsie*.
- Schulz, R., Kirschstein, T., Brehme, H., Porath, K., Mikkat, U., Köhling, R., 2012. Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channel-mediated AHP currents. *Neurobiol. Dis.* 45, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.019>
- Schulze, F., Müller, S., Guli, X., Schumann, L., Brehme, H., Riffert, T., Rohde, M., Goerss, D., Rackow, S., Einsle, A., Kirschstein, T., Köhling, R., 2020. CK2 Inhibition Prior to Status Epilepticus Persistently Enhances KCa2 Function in CA1 Which Slows Down Disease Progression. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 33. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00033>
- Seutin, V., Scuvée-Moreau, J., Dresse, A., 1997. Evidence for a non-GABAergic action of quaternary salts of bicuculline on dopaminergic neurones. *Neuropharmacology* 36, 1653–1657. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(97\)00147-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(97)00147-0)
- Sharma, A.K., Reams, R.Y., Jordan, W.H., Miller, M.A., Thacker, H.L., Snyder, P.W., 2007. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicol. Pathol.* 35, 984–999. <https://doi.org/10.1080/01926230701748305>
- Shorvon, S.D., 1996. The epidemiology and treatment of chronic and refractory epilepsy. *Epilepsia* 37 Suppl 2, S1–S3. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1996.tb06027.x>
- Siemes, H., Bourgeois, B.F.D., 2001. *Anfälle und Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen: 114 Tabellen*. Thieme, Stuttgart.
- Speckmann, E.-J., Alzheimer, C. (Eds.), 2013. *Physiologie: mit ... 88 Tabellen*, 6. Aufl. ed. Elsevier, Urban & Fischer, München.

- Sun, J., Kapur, J., 2012. M-type potassium channels modulate Schaffer collateral–CA1 glutamatergic synaptic transmission. *J. Physiol.* 590, 3953–3964. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235820>
- Swartzwelder, H.S., Anderson, W.W., Williamson, W.A., 1987. Mechanism of γ -aminobutyric acid seizure generation in the hippocampal slice in Mg²⁺-free medium: the role of GABA inhibition. *Epilepsy Res.*, 2 239–245. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(88\)90350-5](https://doi.org/10.1016/0920-1211(88)90350-5)
- Thom, M., 2014. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 520–543. <https://doi.org/10.1111/nan.12150>
- Timm, F., 1958. Zur Histochemie der Schwermetalle Das Sulfid-Silberverfahren. *Dtsch. Z. F. r Gesamte Gerichtl. Med.* 46, 706–711. <https://doi.org/10.1007/BF00665092>
- Tiwari, M.N., Mohan, S., Biala, Y., Yaari, Y., 2019. Protein Kinase A-Mediated Suppression of the Slow Afterhyperpolarizing KCa_{3.1} Current in Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 39, 9914–9926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1603-19.2019>
- Trepel, M., 2022. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 8. Auflage. ed. Elsevier, München.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9, 315–335. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90136-5)
- West, P.J., Saunders, G.W., Billingsley, P., Smith, M.D., White, H.S., Metcalf, C.S., Wilcox, K.S., 2018. Recurrent Epileptiform Discharges in the Medial Entorhinal Cortex of Kainate-Treated Rats are Differentially Sensitive to Anti-Seizure Drugs. *Epilepsia* 59, 2035–2048. <https://doi.org/10.1111/epi.14563>
- Wieser, Heinz Georg, 2004. ILAE Commission Report, Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *Epilepsia* 45, 695–714. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x>
- Williamson, R., Wheal, H.V., 1992. The contribution of AMPA and NMDA receptors to graded bursting activity in the hippocampal CA1 region in an acute in vitro model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 12, 179–188. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90039-V](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90039-V)
- Zettl, U.K., Sieb, J.P. (Eds.), 2021. *Diagnostik und Therapie neurologischer Erkrankungen: State of the Art 2021*, 3. Auflage. ed. Elsevier, München.
-

Zhuang, X., Liu, Y., Yang, Z., Gao, Q., Wang, L., Ju, C., Wang, K., 2023. Attenuation of Epileptogenesis and Cognitive Deficits by a Selective and Potent Kv7 Channel Opener in Rodent Models of Seizures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 384, 315–325. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001328>

VIII. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling, Direktor des Institutes für Physiologie der Universität Rostock, für das Vertrauen zur Bewilligung meiner Promotion, durch Bereitstellung von Materialien und Nutzung der Räumlichkeiten bedanken. Ganz besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Timo Kirschstein aussprechen. Vielen Dank für die intensive Betreuung, Überlassen des Themas dieser Promotionschrift und die mentale Unterstützung während des Studiums und auch danach. Ohne Seine Hilfe, wissenschaftliche Erfahrung und konstruktive Kritik wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nur schwer vorstellbar.

Ich danke ebenso Frau Prof. Dr. med. Astrid Bertsche für die freundliche Unterstützung bei jeglichen wissenschaftlichen Fragen und für die konstruktive Diskussion der Daten während der Auswertung.

Des Weiteren gilt ein großes Dank allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Oscar-Langendorff-Instituts für Physiologie Rostock. Ein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Steffen Müller, Dr. rer. nat. Denise Franz, Dr. rer. nat. Marco Rhode und Dr. rer. nat. Falko Lange für die Einarbeitung und Unterstützung während der Versuchsdurchführung und Auswertung, sowie Frau Dipl.-Chem. Katrin Porath und Dipl.-Biol. Tina Sellmann für ihre kompetente Unterstützung im Labor, die Beantwortung meiner Fragen, Korrekturlesen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ein großes Dank richte ich auch an meine Mitdoktorandinnen Ella Nissen und Ricarda Benz für die intensive Freundschaft und die gegenseitige Motivation während unserer gesamten Promotion.

Abschließend möchte ich meine Familie nicht unerwähnt lassen. Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich von Herzen danken. Vielen Dank, für euer interessiertes Zuhören, Korrekturlesen und vielfältige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ein großes Dank richte ich auch an Dr. Frauke Maeß. Vielen Dank für Deine Geduld, die motivierenden und aufbauenden Worte während meines Promotionsvorhabens. Dank der liebevollen Aufnahme in Deiner Praxis konnte ich mich in Ruhe meinem Vorhaben widmen und dieses auch beenden. Abschließend möchte ich mich bei meinem Ehemann Christian und meinen gedulden Kindern bedanken, die mir schon seit Beginn des Studiums zur Seite stehen. Dank eurer mentalen Unterstützung, gabt Ihr mir die Möglichkeit mein zeitintensives Studium und diese Dissertation zu absolvieren. Ich danke euch von ganzem Herzen.

IX. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit 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

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)