

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Potschka

**Prüfung des Erythropoetin-mimetischen Peptids
pHBSP
in einem chronischen Post-Status-Epilepticus-
Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Natalie Seeger
aus Nürtingen

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Matiasek
Priv.-Doz. Dr. Fischer
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil Sinowatz
Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung	1
2 Übersicht	3
2.1 Epilepsie	3
2.1.1 Definition und Bedeutung	3
2.1.2 Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsieerkrankungen	8
2.1.3 Chronische Tiermodelle	15
2.2 Anfallsinduzierte neuronale Plastizität	18
2.2.1 Einführung	18
2.2.2 Neurodegeneration	19
2.2.3 Hippocampale Neurogenese	21
2.3 Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien	26
2.3.1 Einführung	26
2.3.2 Erythropoetin	27
2.3.3 Erythropoetin-mimetische Peptide	28
2.4 Verhaltensuntersuchungen	29
2.4.1 Einführung	29
2.4.2 Verhaltensmodelle	29
3 Zielsetzung und Arbeitshypothese	35
4 Material und Methoden	37
4.1 Versuchstiere	37
4.2 Post-Status-Epilepticus-Modell	37
4.3 Anfallsparameter	40
4.4 Erythropoetin und das Erythropoetin-mimetische Peptid pHBSP	41
4.5 Erfassung spontaner Anfälle bei Ratten	42
4.6 Verhaltensmodelle	43
4.7 Histologische Gewebeaufbereitung	48
4.8 Immunhistochemische Färbemethoden	49

4.9	Auswertung und Statistik.....	52
4.10	Versuchsdesign.....	55
5	Ergebnisse	58
5.1	Elektrisches SE-Modell	58
5.2	Verhaltensuntersuchungen	62
5.3	Histologische Untersuchungen.....	72
6	Diskussion	80
6.1	Einleitung	80
6.2	Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin im chronischen Post-Status-Epilepticus-Modell.....	81
6.2.1	Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von	81
	Erythropoetin im elektrischen SE-Modell	81
6.2.2	Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin in verschiedenen Verhaltensparadigmen.....	81
6.2.3	Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin auf histologischer Ebene.....	84
7	Zusammenfassung.....	88
8	Summary	90
9	Literaturverzeichnis	92
10	Anhang	92
10.1	Geräte.....	118
10.2	Lösungen und Substanzen.....	120

Danksagung

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
AED	Antiepileptic drug
Aqua dest.	Aqua destillata
BB	Black Box
BLA	Basolaterale Amygdala
BrdU	Bromdesoxyuridinsäure
BWB	Black-and-White-Box
βCR	Beta-common receptor
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CA	Cornu ammonis
contr.	Controll
Cy	Carbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel
DCX	Doublecortin
DNA	Desoxyribonukleinäure
DZP	Diazepam
EEG	Elektroenzephalographie
EFG	Epidermal growth factor
EPM	Elevated-Plus-Maze
EPO	Erythropoetin
EPO-R	EPO-Rezeptor
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCD	Granule cell dispersion
Geschl.	Geschlossen
GD	Gyrus dentatus
GL	Granule layer
HBSP	Helix B surface peptide
HRP	Horseraddish peroxidase

Hz	Hertz
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like growth factor
ILAE	International league against epilepsy
incl.	inclusive
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
lx	Lux
M	Mol
m	Meter
MEZ	Mitteeuropäische Zeit
MFS	Mossy fiber sprouting
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MWM	Morris-Water-Maze
μ A	Mikroampère
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NeuN	Neural specific nuclear protein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nmol	Nanomol
OF	Open Field
OP	Operation
PBD	Persistierende basale Dendriten
PBS	Phoshat buffered saline

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pHBSP	Pyroglutamat helix B surface peptide
PS	Persönlichkeitsstörung
PSA	Polysialyliert
PTZ	Pentylentetrazol
RAID	Redundant array of inexpensive disks
rHuEPO	Rekombinantes humanes Erythropoetin
s.c.	subkutan
scr.	scrambled
SE	Status epilepticus
sec	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
SGZ	Subgranuläre Zone
SSSE	Self sustained status epilepticus
SUDEP	Sudden unexpected death in epilepsy
SVZ	Subventrikuläre Zone
s/w	schwarz/weiß
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TLE	Temporallappenepilepsie
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WB	White Box
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Hund, Katze und Mensch. Die Prävalenz wird bei Hund und Katze mit ca. 0,5-5% angegeben. In der Humanmedizin liegt die Prävalenz bei rund 1-2%, sodass weltweit ca. 50 Millionen Menschen und in Deutschland etwa 800.000 Menschen von dieser Erkrankung betroffen sind. Epilepsien sind durch spontan auftretende, rekurrende epileptische Anfälle zentralen Ursprungs gekennzeichnet. Sie beruhen auf multiplen ätiologischen und pathophysiologischen Faktoren, die u.a. durch symptomatische Ursachen wie Schädel-Hirn-Traumen, Enzephalitiden oder Schlaganfälle hervorgerufen werden können. Bedingt durch diesen initialen Insult kommt es über vorwiegend unbekannte Mechanismen zur Implementierung eines neuronalen Netzwerkes, welches die Entwicklung von Epilepsien begünstigt (proepileptogenes Netzwerk). Dieser Prozess wird auch als Epileptogenese bezeichnet. Dabei werden verschiedenste neuropathologische Veränderungen sichtbar. So können neben einer axonalen Reorganisation, morphologische Veränderungen der neuronalen Dendriten auftreten und es kann zur Ausbildung von hyperexzitablen Synapsen kommen. Des Weiteren werden sowohl eine gestörte Neubildung von Neuronen (Neurogenese), als auch ein Verlust von Nervenzellen (Neurodegeneration) beschrieben.

Die meist lebenslange Pharmakotherapie gilt neben der chirurgischen Resektion des epileptischen Fokus im Gehirn als bedeutendste Möglichkeit zur Behandlung der Erkrankung. Jedoch können bei einem Drittel der Patienten keine zufriedenstellenden antikonvulsiven Effekte erreicht werden, sodass sie als pharmakoresistent gelten. Das dadurch unkontrollierbare Anfallsgeschehen führt zu weitreichenden Einschränkungen im Leben der betroffenen Patienten. Zusätzlich können epilepsieassoziierte Komorbiditäten wie kognitive Defizite und psychiatrische Erkrankungen die Lebensqualität erheblich senken. In der Veterinärmedizin resultiert die Pharmakoresistenz und der damit verbundene mangelnde Therapieerfolg häufig in der Euthanasie der Patienten.

Aus diesen Gründen ist eine prophylaktische Therapie von großem Interesse. In diesem Zusammenhang soll das therapeutische Potential sogenannter mimetischer Peptide untersucht werden. Dabei handelt es sich um spezifische Abschnitte komplexer Proteinmoleküle, deren Struktur auf die aktive Aminosäuresequenz verkürzt wurde. So bleiben nur die gewünschten Eigenschaften des Proteins erhalten, wohin-

gegen unerwünschte Effekte ausgeschaltet werden können. In den vergangenen Jahren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass das Glykoprotein und Hormon Erythropoetin (EPO) neuroprotektive, neurotrophe und antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Aufgrund seiner hämatopoetischen Komponente und damit verbundenen Nebenwirkungen ist die Langzeittherapie jedoch nur eingeschränkt möglich. Dadurch bedingt kam es zu großen Bemühungen EPO-mimetische Peptide zu synthetisieren. Erste Studien konnten zeigen, dass das mimetische Peptid Epotris modulierende Effekte auf die neuronale Plastizität, insbesondere auf die anfallsinduzierte gestörte Neurogenese aufweist. Ein weiteres EPO-mimetisches Peptid ist das Pyroglutamat-Helix B-Surface-Protein (pHBSP), das in einer vorangegangenen Studie bereits neuroprotektives Potential, sowie einen positiven Einfluss auf kognitive Fähigkeiten zeigte.

Dieses Dissertationsvorhaben soll dazu beitragen, die Mechanismen der Epileptogenese besser zu verstehen. Des Weiteren sollen mögliche präventive Strategien für die Modifikation von Epilepsien und deren Komorbiditäten durch das mimetische Peptid pHBSP untersucht werden.

2 ÜBERSICHT

2.1 Epilepsie

2.1.1 Definition und Bedeutung

Der Begriff Epilepsie stammt ursprünglich aus dem Altgriechischen und bedeutet „plötzlich heftig ergriffen, überwältigt“. Definitionsgemäß ordnet man unter dem Begriff Epilepsie repetitive, meist unprovokierte epileptische Anfälle ein, die plötzlich auftreten und zeitlich begrenzt sind. Epilepsien zeigen kein einheitliches Krankheitsbild, sondern weisen als Ausdruck einer zerebralen Störung unterschiedlichster Genese zahlreiche Syndrome oder Krankheitskomplexe auf (FRÖSCHER 1994). Die auftretenden Anfälle können dabei als klinische Manifestation abnormaler, exzessiver und synchroner Exzitationen neuronaler Populationen betrachtet werden (KWAN u. BRODIE 2006). Epilepsie ist sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin eine der häufigsten neurologischen Krankheiten (CHANG u. LOWENSTEIN 2003; CHANDLER 2006). Bei den Haustieren ist vor allem der Hund mit einer Prävalenz von 0,5-5 % von der Epilepsieerkrankung betroffen (PODELL et al. 1995; KNOWLES 1998). So wird aufgrund gehäuften Auftretens in einigen Rassen und Familien eine genetische Komponente angenommen. Geschlechtsspezifische Häufigkeiten werden hierbei nicht beschrieben (ZIMMERMANN et al. 2009). Seltener treten epileptische Anfälle bei der Katze auf (SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Jedoch konnten hier bislang keine Hinweise auf familiäre Epilepsie gefunden werden (BARNES et al. 2004). Beim ägyptischen Araberfohlen konnte eine juvenile idiopathische Epilepsie nachgewiesen werden, der vermutlich eine genetische Komponente zugrunde liegt (ALEMAN et al. 2006).

In der Humanmedizin sind in den industrialisierten Ländern Schätzungen zufolge ca. 1% der Bevölkerung von Epilepsie betroffen (MARTINOVE), das entspricht ungefähr 40-70 Fällen pro 100.000 Einwohnern (SANDER u. SHORVON 1996). In Entwicklungsländern sind Prävalenz und Inzidenz erhöht (CARPIO u. HAUSER 2009). Ein möglicher Grund dafür ist die schlechtere Geburtshilfe, die zu einem erhöhten Risiko einer cerebralen Infektion oder einem Schädeltrauma führen kann (KWAN u. BRODIE 2006). Somit leiden weltweit schätzungsweise ca. 50 Millionen Menschen im Laufe ihres Lebens an Epilepsie (HENSHALL u. SIMON 2005). Es wird angenommen, dass rund die Hälfte der Betroffenen in Asien lebt (MAC et al. 2007). Das höchste Risiko an Epilepsie zu erkranken besteht innerhalb der ersten fünf Lebens-

jahre, sowie ab einem Alter von 60 Jahren. Männer zeigen hierbei eine leicht höhere Inzidenz (TALLIS et al. 1991; THEODORE et al. 2006).

Trotz einer Vielzahl an Antiepileptika (antiepileptic drug, AED) zeigen ein Drittel der Patienten Resistenzen gegenüber den gängigen Wirkstoffen, sodass die epileptischen Anfälle nicht unter Kontrolle gebracht werden können (KWAN u. BRODIE 2000). Die der Pharmakoresistenz zugrunde liegenden biologischen Mechanismen sind dabei weitestgehend unklar. So wird als Hypothese neben einer Veränderung der Zielstrukturen der Antiepileptika auch eine Überexpression an lokalen Efflux-Transporten an der Blut-Hirn-Schranke diskutiert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002; REMY et al. 2003). Das am häufigsten eingesetzte Antiepileptikum in der Tiermedizin ist Phenobarbital. Bei mangelnder Effizienz kann beim Hund zusätzlich Kaliumbromid eingesetzt werden (KLUGER et al. 2009). Jedoch schränkt die schnelle Metabolisierung beim Hund die praktikable Anwendung stark ein. Für Katzen fehlen für viele Substanzen pharmakokinetische Daten. Bei einigen Humanpatienten mit Resistenzen kann alternativ zu den Antiepileptika durch chirurgische Resektion der entsprechenden Areale eine Anfallsfreiheit erreicht werden (GILLIAM u. ALBERTSON 2011). In der Tiermedizin ist die chirurgische Intervention noch selten, wird aber mit besserem Verständnis der Anfallsentstehung und -lokalisierung, sowie dem Fortschritt in der intrakraniellen Bildgebung und der elektrophysiologischen Kontrolle eventuell an Bedeutung gewinnen (BAGLEY et al. 1996).

Epileptische Anfälle (Anfall kann einmalig auftreten, provoziert) und Epilepsien (Auf-treten mindestens zweier spontaner, nicht provozierten epileptischer Anfälle) werden international durch die Kommission der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) klassifiziert. Die Basis der Einteilung sind das Anfallsmuster, die Ursache, das Erst-manifestationsalter, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische (EEG-) Aufzeichnungen (SCHMIDT 1992). Beim Anfallstyp wird zwischen fokalen Anfällen, die in einer umschriebenen Gehirnregion beginnen und generalisierten Anfällen, die beide Hemisphären umfassen, unterschieden. Des Weiteren treten auch unklassifizierbare Anfälle auf. Bei fokalen Anfällen kommt es zur unwillkürlichen Bewegung einzelner Muskelgruppen. Diese Anfallsart wird weiter unterteilt in einfach-fokal (keine Bewusstseinsbeeinträchtigung) und komplex-fokal (mit Bewusstseinsbeeinträchtigung). Findet anschließend eine Ausbreitung der anfänglich fokalen Anfälle über das gesamte Gehirn statt, so wird dies als sekundär generalisiert bezeichnet (FISHER et al. 2005). Primär generalisierte Anfälle hingegen breiten sich von Beginn an über

beide Gehirnhemisphären hinweg aus. Sowohl primär als auch sekundär generalisierte Anfälle werden aufgrund verschiedener motorischer Symptome in weitere Klassen unterteilt. So treten tonische (Streckkrämpfe), klonische (Ruderkrampf), tonisch-klonische, myoklonische Krämpfe (Erschlaffung der Muskulatur) und Absencen (Bewusstseinsminderung mit nachfolgender Amnesie) auf (Abb.1). Hunde und Katzen sind vor allem von generalisierten Anfällen mit tonisch-klonischen Krämpfen betroffen (DEWEY et al. 2004). Eine weitere Erscheinung ist der Status epilepticus (SE). Dieser wird charakterisiert durch eine lang anhaltende Anfallsaktivität oder sich häufig wiederholenden epileptischen Anfällen, zwischen welchen der Patient nicht zur Erholung kommt (LOWENSTEIN et al. 1999).

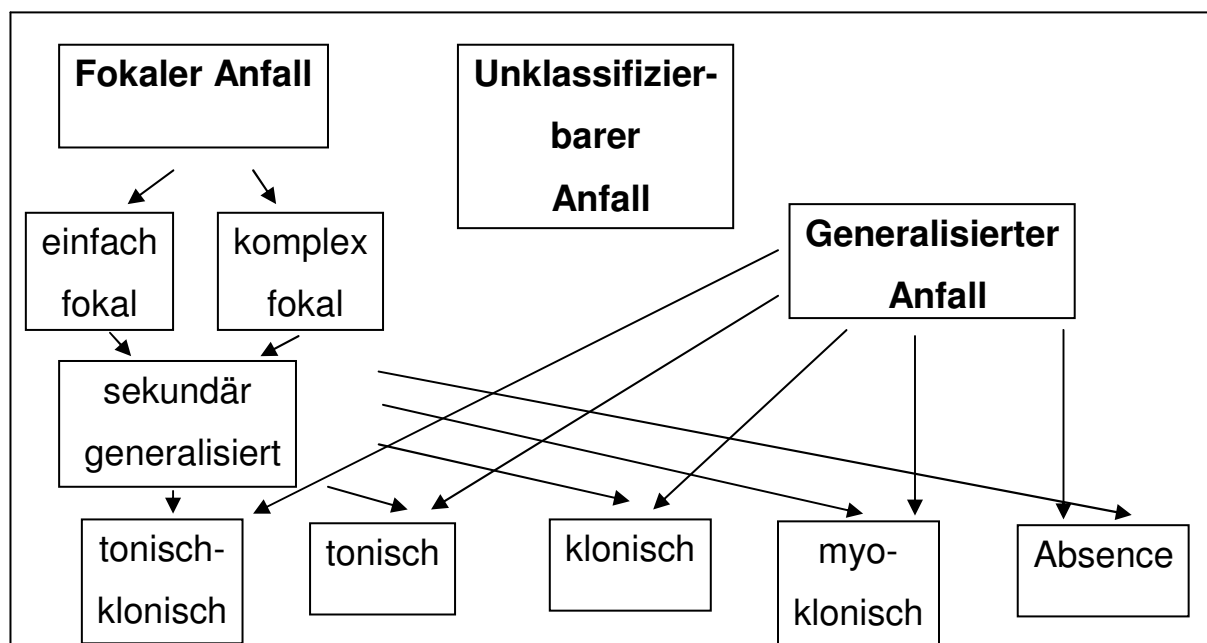


Abb.1: Bei der Anfallsart werden fokale, generalisierte und unklassifizierbare Anfälle unterschieden. Fokale Anfälle können sich ebenfalls zu generalisierten Anfällen entwickeln, welche weiter unterteilt werden in tonisch-klonische, tonische, klonische und myoklonische Krämpfe sowie Absencen.

Abhängig von der Ätiologie werden Epilepsien zusätzlich als symptomatisch, idiopathisch oder kryptogen bezeichnet (FISHER et al. 2005). Bei symptomatischen Epilepsien ist die Ursache der Erkrankung ein bekannter oder vermuteter initialer Insult. Dies kann z. B. ein Schädel-Hirn-Trauma, ein Gehirntumor, eine Enzephalitis oder eine zerebrovaskuläre Schädigung sein. Es wird geschätzt, dass rund 20% aller Fälle von symptomatischen Epilepsien auf traumatische Gehirnverletzungen zurückzuführen

en sind (HAUSER et al. 1996). Der primäre Insult kann über noch weitgehend unbekannte Mechanismen zur Entstehung eines epileptogenen Netzwerkes führen, welches die Manifestation der Epilepsieerkrankung begünstigt. Am häufigsten tritt die symptomatische Epilepsieform bei erwachsenen Menschen auf. So zählt die Epilepsieerkrankung zu einer der wenigen Gehirnerkrankungen, bei denen potentielle Patienten identifiziert werden können. Jedoch gibt es im Moment keine prophylaktische Behandlung, um die Entwicklung der Epilepsie zu verhindern (DICHTER 2009b, a).

Idiopathische Epilepsien sind dadurch klassifiziert, dass als Ursache eine genetische Komponente vermutet wird. Sie kommt häufig bei Kindern und Jugendlichen, sowie bei Hunden vor (THOMAS). Dies gilt im Besonderen für reinrassige Hunde, bei denen epileptische Anfälle im Alter von einem bis fünf Jahren beginnen. Sie weisen dabei häufig eine unauffällige interiktale neurologische Untersuchung, sowie eine initial übermäßig lange interiktale Phase (über vier Wochen) auf (PODELL et al. 1995). Der Begriff kryptogen wird bei Epilepsien unbekannter Genese verwendet. Die Ursache der Epilepsieerkrankung sind hier möglicherweise nicht weiter identifizierte organische Ursachen. In der Tiermedizin findet die in der Humanmedizin gebräuchliche Klassifizierung der epileptischen Anfälle und Syndrome in zahlreiche Subtypen keine Verwendung. Die Anfälle werden hier vor allem nach dem Anfallsmuster und der Ätiologie unterteilt (POTSCHKA et al. 2009). Die Generierung eines hyperexzitablen epileptischen Netzwerkes (Epileptogenese) ist mit einer Vielzahl von plastischen Veränderungen in verschiedenen Gehirnregionen verbunden. Dies konnte in verschiedenen Studien sowohl in Tiermodellen, als auch in humanem epileptischen Gewebe demonstriert werden (PITKANEN u. SUTULA 2002). Kennzeichnend für die epileptischen Anfälle sind dabei eine Hyperexzitabilität der Neuronen und eine Hypersynchronizität des neuronalen Netzwerkes (STAFSTROM 2006). Epilepsiepatienten leiden an einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate. So haben diese Patienten ein 24x höheres Risiko plötzlich zu versterben als die übrige Bevölkerung. Des Weiteren kommt es zu weitreichenden Einschränkungen im Alltagsleben, beispielsweise die Arbeit oder das Autofahren betreffend (HENSHALL u. SIMON 2005).

Temporallappenepilepsie (TLE)

Abhängig von der betroffenen Lokalisation im Gehirn werden symptomatische fokale Epilepsien in Temporallappen-, Frontal-, Parietal- und Occipitallappenepilepsien eingeteilt (DREIFUSS 1994). Dabei tritt die Temporallappenepilepsie am häufigsten auf (LÖSCHER 1999). Schätzungen zufolge haben 80% aller fokalen Anfälle ihren Ursprung in diesem Areal (GLEISSNER et al. 2002). Die Temporallappenepilepsie ist charakterisiert durch einfache oder komplexe partielle Anfälle, die vom medialen oder lateralen Temporallappen ausgehen und in sekundäre generalisierte Anfälle übergehen können (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Die genaue Lokalisation befindet sich dabei in der hippocampalen Formation (ARONICA u. GORTER 2007), der Amygdala oder in der corticalen Umgebung (TUUNANEN et al. 1997). Als Ursache für die Temporallappenepilepsie werden Tumore, vaskuläre Schädigungen, corticale Dysplasien, Traumen und Schlaganfälle diskutiert (PITKANEN et al. 2007; BERTRAM 2009). Die Temporallappenepilepsie tritt im Schnitt 7,5 Jahre nach dem traumatischen Insult auf, wobei es individuell zu großen Abweichungen kommen kann (FRENCH et al. 1993). Da der symptomatischen Epilepsie ein initialer Insult zu Grunde liegt, wird sie auch als erworbene Epilepsie bezeichnet. Sie verläuft in drei Phasen: dem initialen Insult (1) und der Latenzzeit in welcher epileptogene Prozesse stattfinden (2), die dann in spontanen, sich wiederholenden Anfällen endet, der sogenannten chronischen epileptischen Phase (3). Ein charakteristisches Merkmal, das bei zahlreichen Temporallappenepilepsie-Patienten auftritt, ist die hippocampale Sklerose, die durch einen extensiven (>50%) neuronalen Zellverlust in der CA₃- und CA₁-Region des Hippocampus, sowie der Hilusregion des Gyrus dentatus gekennzeichnet ist (ENGEL 1996; FISHER et al. 1998). Betroffen von der Neurodegeneration können jedoch auch die Amygdala, entorhinale, perihinale und parahippocampale Gebiete, sowie der Thalamus und Cerebellum sein (JUTILA et al. 2002). Der Neuronenverlust wird von einer dichten Gliose begleitet, die zur Schrumpfung und Verhärtung des betroffenen Gewebes führt (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Des Weiteren kommt es zur Sprossung von Moosfasern, die ebenfalls zur Epileptogenese beitragen. Ob die hippocampale Sklerose die Ursache oder das Resultat der epileptischen Anfälle ist, bleibt nicht eindeutig geklärt (JEFFERYS 1999). Als Konsequenz aus den anfallsbedingten morphologischen und funktionellen Modifikationen im Temporallappen, leiden betroffene Patienten häufig an Verhaltensänderungen, Depressionen, Angststörungen und

Einschränkungen im Lern- und Erinnerungsvermögen (MARCANGELO u. OVSI EW 2007).

2.1.2 Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsieerkrankungen

Bei Humanpatienten können psychisch-kognitive Beeinträchtigungen als Begleiterscheinung von Epilepsien auftreten (CARRENO et al. 2008). Der Begriff Kognition steht dabei in der modernen Psychologie für den traditionellen Begriff der „höheren geistigen Funktion“. Als Kognition werden die Informationsverarbeitungsprozesse im Gehirn bezeichnet, die dem komplexen adaptiven Verhalten eines Organismus zugrunde liegen. Dazu gehört u.a. die Konzeptbildung, die Wahrnehmung und Aufmerksamkeit, die Gedächtnis- und Denksysteme, die soziale Intelligenz, sowie das Abstraktions- und Entscheidungsvermögen (STEFAN u. PAULI 2008).

Die Prävalenz der psychiatrischen Komorbiditäten wird mit 20-40% angegeben, wobei das Risiko bei Patienten mit nicht behandelbaren Anfällen steigt (DEVINSKY 2003). Epilepsieassoziierte Komorbiditäten können sich in Form von Angst- und Panikstörungen, affektiven Störungen, Persönlichkeitsstörungen, Psychosen und Depressionen (PAULI u. STEFAN 2009a), sowie Defiziten im Lern- und Erinnerungsvermögen äußern. Des Weiteren wird auch ein erhöhtes aggressives Verhalten, sowie ein möglicher Alkohol- und Drogenmissbrauch diskutiert (ALPER et al. 2002; DEVINSKY 2003). Spezifische Komorbiditäten, die vor allem in der Kindheit auftreten, sind die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Autismus und Entwicklungsstörungen (CORNAGGIA et al. 2006). Der neurobiologische Mechanismus der Beziehung zwischen Epilepsie und der Psychopathologie ist weitgehend ungeklärt. Ungeklärt ist auch, ob die psychischen Begleiterscheinungen direkt mit der Anfallsaktivität assoziiert oder mit dem postiktalen Status verbunden sind (GROTICKE et al. 2007). Das Auftreten der psychopathologischen Phänomene ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht, prämorbidem Persönlichkeitsstruktur, sowie von epilepsiebedingten Aspekten wie dem Anfallstyp und der Chronizität der Erkrankung (BEYENBURG u. SCHMIDT 2005). Des Weiteren kommen neurologische, pharmakologische oder psychosoziale Faktoren in Frage. So wird aufgrund der Epilepsie das limbische System, welches für die Regulation des affektiven, emotionalen und sozialen Handelns verantwortlich ist durch lokale Läsionen oder funktionelle Störungen beeinflusst (PAULI u. STEFAN 2009b). Antiepilept-

ogene Medikamente können psychiatrische Nebenwirkungen aufweisen, indem sie entweder einen sedierenden Effekt oder einen aktivierenden Effekt zeigen (KETTER et al. 1999; DEVINSKY 2003). Psychosoziale Faktoren resultieren aus der Unkontrollierbarkeit der epileptischen Anfälle mit Verletzungsgefahr und Peinlichkeit, der Angst vor sozialer Ablehnung, Stigmatisierung oder der Eingeschränktheit im Alltagsleben. Angehörige neigen oft zu „Überprotektion“, die die Selbständigkeit und die damit verbundene Erfahrung der Selbsteffizienz der betroffenen Patienten behindern (VAZQUEZ u. DEVINSKY 2003; PAULI u. STEFAN 2009b). Des Weiteren wird vom Gefühl der Isolierung und von Problemen in Beziehungen berichtet (MOORE u. BAKER 2002).

In der Veterinärmedizin liegen bislang keine Daten über psychiatrische Komorbiditäten vor.

Epilepsieassoziierte psychische Störungen werden je nach ihrem zeitlichen Auftreten in Bezug zu den epileptischen Anfällen klassifiziert. So werden sie als präiktal, iktal, postiktal oder interiktal bezeichnet (Iktus=Anfall).

Nachfolgend werden die wichtigsten epilepsieassoziierten Krankheiten kurz beschrieben.

Depressionen

Eine der häufigsten auftretenden psychiatrischen Beeinträchtigungen bei Temporal-lappenepilepsie sind Depressionen. So wird die Inzidenz einer Depressionsentwicklung bei Epilepsiepatienten mit 30% beschrieben (KANNER 2003b). Jedoch wird diese Komorbidität in vielen Fällen nicht diagnostiziert. Sie bleibt daher oft unbehandelt (KANNER 2003a). Ein möglicher Grund dafür ist, dass die berichteten Symptome der Patienten (Schlafstörungen, kognitive Defizite, Libidoverlust) als plausible Begleitscheinung der Epilepsie oder als mögliche Nebenwirkungen der Antiepileptika betrachtet werden (PAULI u. STEFAN 2009a). So werden GABA-erge Antiepileptika als Risikofaktoren für iatrogene Depressionen beschrieben (KANNER 2003a; PAULI u. STEFAN 2009a, b). Vor allem bei Jugendlichen werden die Symptome oft als „normale“ Reaktionen ihrer Altersgruppe abgetan (VERROTTI et al. 2008).

Depressives Verhalten kann vor, während, nach und zwischen den Anfällen auftreten (KANNER 2003b; BLUMER et al. 2004). Interiktale Depressionen treten bei rund zwei Drittel der betroffenen Patienten auf. Insbesondere bei Patienten mit schweren und/oder frequenten Anfällen (LAMBERT u. ROBERTSON 1999). Andere Autoren

beschreiben hingegen, dass das Auftreten der Depression bei TLE-Patienten unabhängig von der Anfallsfrequenz ist (GILLIAM et al. 2007). Ob das Risiko eine epilepsieassoziierte Depression zu entwickeln geschlechtsabhängig ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Möglicherweise weisen Frauen ein höheres Risiko auf, da die Prävalenz bereits in der nicht-epileptischen Gesamtpopulation höher ist (KIMISKIDIS et al. 2007). Depressionen bestimmen wesentlich die Lebensqualität der Betroffenen und das Ausmaß, in dem die epileptischen Anfälle subjektiv als hindernd betrachtet werden (BOYLAN et al. 2004). Des Weiteren führen sie zu einer schlechteren Kontrollierbarkeit der Anfälle (CRAMER et al. 2003; THAPAR et al. 2005; HITIRIS et al. 2007).

Das gehäufte Vorkommen von Epilepsien und Depressionen wurde bereits von Hippokrates beschrieben und es wird bis heute eine bidirektionale Verbindung diskutiert. So könnten Epilepsien Depressionen begünstigen und umgekehrt (KANNER 2003a). Die genauen Pathomechanismen sind noch weitestgehend ungeklärt. Beiden Erkrankungen liegen Störungen von verschiedenen Neurotransmittern, insbesondere von Serotonin, Norepinephrin, Dopamin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat zu Grunde. So kommt es u.a. zu Veränderungen der Serotonin-Synthese im Hippocampus (NATSUME et al. 2003). Des Weiteren konnte in einer Positronen-Emissions-Tomographen (PET)-Studie gezeigt werden, dass bei Epilepsiepatienten mit depressiven Symptomen im Hippocampus reduzierte Bindungen von Serotonin an seinem 5-HT_{1A} Rezeptor vorliegen (TOCZEK et al. 2003). Diese Erscheinung zeigt sich sowohl ipsilateral als auch kontralateral vom jeweiligen Anfallsfokus im mesialen Temporallappen (SAVIC et al. 2004; GIOVACCHINI et al. 2005).

Daneben kommt es zu Veränderungen in der Amygdala. Sie scheint einen zweiphasigen Prozess zu unterlaufen. Während der akuten depressiven Phase vergrößert sie sich, wohingegen sie während der chronischen Depression schrumpft. Neben dem Hippocampus und der Amygdala können auch extralimbische Strukturen von den Modifikationen betroffen sein (KONDZIELLA et al. 2007).

Abhängig von diesem Krankheitsbild steigt die Suizidgefahr bei depressiven Epilepsiepatienten im Allgemeinen um das fünffache, bei Temporallappenepilepsiepatienten mit fokalen Anfällen sogar auf das 25-fache im Vergleich zur gesunden Population (BARRACLOUGH 1987). Damit ist der Suizid eine der häufigsten Todesursachen bei Epilepsiepatienten. Das höchste Risiko der Suizidalität besteht dabei während des ersten halben Jahres nach der Diagnosestellung (KANNER 2008). Die

affektiven Störungen werden durch eine operative Ausschaltung des epileptogenen hippocampalen Fokus günstig beeinflusst. So erholen sich betroffene Patienten unabhängig von der präoperativen Ausgangssituation häufig durch epilepsiechirurgische Eingriffe (PAULI u. STEFAN 2009a).

Angststörungen

Die Prävalenz von Angststörungen bei Epilepsiepatienten wird mit 15-25% angegeben (HERMANN et al. 2000; SWINKELS et al. 2001; VAZQUEZ u. DEVINSKY 2003). Angststörungen zeigen einen signifikant negativen Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen und erhöhen das Risiko der Suizidalität (KANNER 2009). Generell zählt Angst als Warnung vor verschiedenen Gefahren zu den wichtigsten verhaltensregulierenden Mechanismen. Definitionsgemäß spricht man von einer Angststörung, wenn Angst in einer ungefährlichen Situation oder deren Antizipation auftritt (PAULI u. STEFAN 2009b). So gelten anhaltende Sorgen über für gewöhnlich nicht schwerwiegende Ereignisse, die nahezu täglich und über mehr als sechs Monate hinweg auftreten, als klinische Kardinalsymptome (BEYENBURG u. SCHMIDT 2005). Bezieht sich hingegen Furcht oder Vermeidung auf spezifische Situationen oder Objekte, so spricht man von einer Phobie (PAULI u. STEFAN 2009b). Typische Phobien, die bei Epilepsiepatienten auftreten, entstehen in Folge von Angst vor Anfällen oder vor Unfällen außer Hauses (BEYENBURG et al. 2005). Anfallsartig auftretende Angstattacken mit psychischen und physischen Erscheinungen werden als Panikstörungen bezeichnet (PAULI u. STEFAN 2009b). Nach heutiger neurobiologischer Vorstellung stellt die Amygdala eine wichtige zentrale anatomische Struktur für die Genese von Angst und epileptischer Erregung dar (BEYENBURG u. SCHMIDT 2005). Die Amygdala ist für die emotionale Verarbeitung von Informationen und deren Speicherung zuständig und verantwortlich für die Analyse des Gefährdungspotentials, das von extern auf das Individuum einwirkt. Sie kann durch epileptische Entladungen im Temporallappen primär oder sekundär aktiviert werden. Über die Efferenzen der Amygdala wird nun die körperliche Angstreaktion ausgelöst. Als physische Symptome werden Tachykardien, Luftnot, Schwindel, Schwitzen und Zittern beschrieben. Weitere vegetative Erscheinungen sind Schlaf- und Konzentrationsstörungen, sowie erhöhte Reizbarkeit (BEYENBURG u. SCHMIDT 2005).

Die Ursache dieser häufig vorkommenden Komorbidität ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise liegen dieser Erscheinung neurobiologische bzw.

psychologische Faktoren oder ein Zusammenspiel aus beidem zu Grunde (PAULI u. STEFAN 2009b). Eine pathophysiologische Gemeinsamkeit zwischen Angst und Epilepsie liegt in der Funktionsstörung von GABA_A-Rezeptoren und anderen Neurotransmittersystemen wie Serotonin, Dopamin und Noradrenalin (BEYENBURG et al. 2001; CHARNEY 2003; LYDIARD 2003; WONG et al. 2003). Zusätzlich wird von vermindertem 5HT_{1A}-Rezeptorbindungspotential berichtet, wodurch weniger Serotonin gebunden werden kann. Das zentrale 5HT-System fungiert als Inhibitor auf das Verhalten und ist u.a. in der Angstregulation beteiligt (KANNER 2009). Des Weiteren können Angstsymptome als Nebenwirkungen der antiepileptogenen Therapie auftreten. So wird in der Pädiatrie beschrieben, dass das Risiko vor allem bei einer Polytherapie ansteigt (WILLIAMS et al. 2003). Generell gilt, dass GABA-erge Substanzen anxiolytisch wirken, wohingegen glutaminergen Substanzen anxiogene Eigenschaften zugeschrieben werden (PAULI u. STEFAN 2009b).

Nach epilepsiechirurgischen Eingriffen wird bei postoperativ anfallsfreien Patienten meist von einer Besserung der Angststörungen berichtet (BLADIN 1992).

Kognitive Defizite

Der Schweregrad der kognitiven Defizite ist abhängig von der Dauer der TLE, (JOKEIT u. EBNER 1999) sowie der Gesamtanzahl an Anfällen (DODRILL 2002). Die kognitiven Defizite gehen dabei von denselben primären Strukturen im Temporalappen aus, die die Anfälle initiieren (MAMENISKIENE et al. 2006). So konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des hippocampalen Neuronenverlustes, vor allem im Bereich des Gyrus dentatus, und dem verminderten Erinnerungsvermögen gezeigt werden (PAULI et al. 2006). Generell berichten Betroffene signifikant häufig von Lern- und Erinnerungsproblemen, welche einen negativen Einfluss auf das alltägliche Leben nehmen. So ist die Fähigkeit verringert Neues zu erlernen und es bestehen Schwierigkeiten kürzlich Erlerntes abzurufen. Das Langzeitgedächtnis bleibt jedoch unbeeinflusst (SIMONS u. SPIERS 2003). Betroffene beschreiben Defizite in der Schule, der Arbeitsstelle oder im sozialen Leben. Im Vergleich einer Gruppe von Epilepsiepatienten mit einer gleichaltrigen gesunden Kontrollgruppe wird deutlich, dass der Anteil Studierender mit TLE geringer und die Arbeitslosenquote im Gegensatz zu der Kontrollgruppe erhöht ist. Es wird diskutiert, dass Patienten mit höherem Bildungsstand und damit höheren kognitiven Reserven den neurobiologischen Insulten besser standhalten können und einen höheren Wid-

erstand gegen medikamentöse Nebenwirkungen zeigen (MAMENISKIENE et al. 2006; MARQUES et al. 2007).

Die verbale Erinnerungsfunktion ist verbunden mit der dominanten Hemisphäre, welche die Sprache kontrolliert. Patienten, bei denen die Epilepsie von diesem Fokus ausgeht, zeigen daher häufig Schwierigkeiten bei Aufgaben, die das Erlernen und Speichern von Wörterverzeichnissen verlangt (HELMSTAEDTER et al. 1997; HERMANN et al. 1997; LEE et al. 2002a). Patienten, bei denen die Epilepsie von der nicht-dominanten Hemisphäre ausgeht, bekunden oftmals Defizite in der Erinnerung der räumlichen Wahrnehmung (GLEISSNER et al. 1998; ALESSIO et al. 2004). So werden zum Teil Beeinträchtigungen in der räumlichen Erinnerung, dem Wiedererkennen von Gesichtern, sowie dem Bemerken von emotionalen Gesichtsausdrücken deutlich (BREIER et al. 1996; MELETTI et al. 2003; MILNER 2003). Generell gilt, dass wenn der laterale Temporallappen den Ausgangspunkt der Epilepsieerkrankung darstellt, eher Defizite im Erlernen und Speichern von Informationen zu erwarten sind. Ist hingegen die mesiale Region (besonders der Hippocampus) des Temporalappens betroffen, so werden primär Beeinträchtigungen in der Festigung, der Aufrechterhaltung und der Erinnerung des kürzlich Erlerntes festgestellt (CARRENO et al. 2008).

Für die bewusste Erinnerung spielt der Hippocampus, im Besonderen jedoch der Gyrus dentatus (Dentate Gyrus, GD), eine wichtige Rolle. So fließen im Hippocampus Informationen aus den verschiedenen sensorischen Systemen zusammen, die dort generiert und schlussendlich im Cortex gespeichert werden. Der Gyrus dentatus bildet die Eintrittspforte in den Hippocampus. Eintreffende Informationen werden über die Körnerzellen via Moosfasern auf die Pyramidenzellen der CA₃-Region und von dort via Schaffersche Kollaterale auf die Pyramidenzellen der CA₁-Region weitergeleitet (DUVERNOY 2005)

Der Gyrus dentatus bildet eine Gehirnstruktur, in welcher zeitlebens eine Neurogenese der Körnerzellen stattfindet (ALTMAN u. BAYER 1990; GOULD et al. 1999a; VAN PRAAG et al. 2002). Diese Neuronenneubildung ist neben der synaptischen Plastizität verantwortlich für die Gedächtniskonsolidierung, also der Überführung von Informationen vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis. Bei epileptischen Patienten führt sowohl der Neuronenverlust als auch dessen strukturelle Reorganisation zur Beeinflussung der Informationsprozesse und determiniert damit auch das Lern- und Erinnerungsvermögen.

Persönlichkeitsstörungen

Symptomatische fokale Epilepsien sind häufig mit Persönlichkeitsstörungen assoziiert. Die Prävalenz wird in der Literatur mit 4-38% angegeben (SWINKELS et al. 2005). Als Persönlichkeitsstörungen (PS) werden lang anhaltende, charakteristische und stabile Verhaltensmuster bezeichnet, die als stark akzentuierte Ausprägung bestimmter Persönlichkeitsmerkmale zu Leidenszuständen oder Konflikten führen (PAULI u. STEFAN 2009b). Sie werden in sozial unflexiblen und wenig angepassten Verhaltensmustern der betroffenen Patienten deutlich. Ein adäquates Störungsbewusstsein fehlt den Patienten dabei. In der psychiatrischen Klassifikation werden drei Gruppen von Persönlichkeitsstörungen unterschieden (PAULI u. STEFAN 2009b). Bei Epilepsien stellt die ängstlich-vermeidende Persönlichkeitsstörung die häufigste PS-Diagnose dar (LOPEZ-RODRIGUEZ et al. 1999). Dazu gehören vermeidend-selbstunsichere, dependente und zwanghafte Persönlichkeitsstörungen (PAULI u. STEFAN 2009a). Die PS können sich zum einen als psychosoziale Konsequenz durch die Veränderungen mit dem Leben der Epilepsieerkrankung heraus entwickeln (SWINKELS et al. 2005). Zum anderen können PS als Folge von epilepsieassoziierten Faktoren wie Gehirnläsionen, Anfällen oder durch Nebenwirkungen der antikonvulsiven Medikation auftreten (GILLIAM et al. 2004; HESSEN et al. 2007; HELMSTAEDTER et al. 2008; WITT et al. 2008). So kann sich die Umstellung von einer Polytherapie auf möglichst wenige Medikamente unter Vermeidung von Barbituraten, sedierenden und kognitiv beeinflussenden Substanzen günstig auf Verhaltensstörungen auswirken (SCHMITZ 2006). Um den negativen Einfluss der Persönlichkeitsstörungen und die daraus resultierenden Anfallsrezidive zu minimieren, sind psychotherapeutische Interventionen ratsam. Bei schweren Persönlichkeitsstörungen werden vorgeschaltete psychotherapeutische Maßnahmen als sinnvoll erachtet, um den Erfolg einer chirurgischen Resektion des betroffenen Gewebes zu verbessern (KOCH-STOECKER 2002). Im Vergleich zu anderen psychiatrischen Komorbiditäten ist nur wenig über Persönlichkeitsstörungen bekannt.

Alkohol- und Drogenmissbrauch

Über den Zusammenhang zwischen Epilepsiepatienten und komorbidem Alkohol- und Drogenmissbrauch ist bisher wenig bekannt (DEVINSKY 2003). Wird Alkohol in geringen Mengen konsumiert steigt das Risiko vermehrter Anfälle im Normalfall nicht an. Jedoch kann eine Alkoholintoxikation zum häufigeren Auftreten der Anfälle füh-

ren (GORDON u. DEVINSKY 2001). Des Weiteren wird diskutiert, dass eine Alkoholintoxikation zu einem erhöhten Risiko führt, am plötzlichen unerwarteten Tod (sudden unexpected death in epilepsy, SUDEP) zu sterben (DEVINSKY 2003). Geringer bis mäßiger Alkoholkonsum führt zu keinen signifikanten Veränderungen des Serumspiegel der AEDs (HOPPENER et al. 1983).

Über den Einfluss von Marihuana auf Epilepsie gibt es verschiedene Angaben. Zum einen werden antikonvulsive Eigenschaften beschrieben, zum anderen kann es zu Wechselwirkungen mit den AEDs kommen, die in einem erhöhten Anfallsleiden resultieren (DEVINSKY 2003). Auch dosisabhängig kann ein prokonvulsiver Effekt auftreten. Cannabinoid-Rezeptoren werden im Gehirnstamm, sowie in limbischen und neocorticalen Regionen gefunden, die die Anfallsaktivität regulieren (ABOOD u. MARTIN 1996). Die Mechanismen, über welche Marihuana und Cannabinoide die Anfallsschwelle verändern, ist weitestgehend unklar (GORDON u. DEVINSKY 2001). So können die Cannabinoide den Level von katecholaminergen Neurotransmittern wie Dopamin und Norepinephrin beeinflussen. Des Weiteren zeigen sie einen Effekt auf thalamocorticale Projektionen, die wiederum die Anfallsschwelle durch steigende Synchronizität verändern können (FEENEY 1978; PERTWEE 1988).

Kokain kann die Anfallsschwelle durch einen toxischen Effekt und durch Wechselwirkungen mit den AEDs, sowie durch eine Störung der Schlafmuster senken (KOPPEL et al. 1996).

2.1.3 Chronische Tiermodelle

Für die Erforschung von Epilepsien und Prüfung neuer Therapieansätze sind geeignete Modellsysteme essentiell. Da die Grundlagenforschung am Humanpatienten aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist, resultiert ein Großteil des bisherigen Wissensstandes über Epilepsien aus Tiermodellen. Aufgrund der Komplexität der Erkrankung wurden zahlreiche Modelle etabliert, die bis heute angewendet werden. Generell werden drei grundlegende Ansprüche an ein Tiermodell gestellt. Erstens sollen die Symptome im Modell den klinischen Erscheinungen der Krankheit ähneln und zweitens soll in beiden Fällen derselbe Pathomechanismus zu Grunde liegen. Des Weiteren sollte das Tiermodell prädiktive Aussagen von Arzneimitteln in Hinblick auf die klinische Wirksamkeit erlauben.

Bei Tiermodellen in der Epilepsieforschung werden zwei verschiedene Typen von Modellen unterschieden (Abb. 2). So gibt es die „akuten“ Modelle, die sogenannten

Anfallsmodelle, in welchen an gesunden Tieren akute epileptische Anfälle induziert werden. Sie werden vor allem zur Untersuchung der Wirkung von Antikonvulsiva eingesetzt. In „chronischen“ Modellen wird hingegen die Entwicklung des prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes, die Epileptogenese, untersucht.

Die Mechanismen der Epilepsieentstehung lassen sich anhand verschiedener Modelle untersuchen. Beispiele dafür sind genetisch veränderte Tiere mit spontanen Anfällen wie epileptische Hunde (LÖSCHER 1997) und Tiere, welche durch chemische oder elektrische Einflüsse einen epileptogenen Prozess entwickeln [z.B. Kainsäure (BEN-ARI et al. 1981) und Pilocarpin (HONCHAR et al. 1983) oder das Kindling-Modell (GODDARD et al. 1969) und das SE-basolaterale Amygdala-Modell (BRANDT et al. 2003a)]. Nach einer Latenzzeit treten bei diesen Tieren spontane epileptische Anfälle auf. Ähnlich wie bei Epilepsiepatienten, bei welchen durch einen initialen Insult (Tumor, Schädelhirntrauma, Enzephalitis) die Krankheit ausgelöst wird, scheint es in diesen Modellen zur Generierung eines epileptogenen Netzwerkes zu kommen. Dadurch kann die klinische Realität von Patienten mit symptomatisch bedingter Epilepsie sehr gut dargestellt werden.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit Anfälle chemisch oder elektrisch auszulösen, wobei die Anfallsaktivität nur während der Induktion stattfindet.

Im Folgenden soll nun das elektrische SE-BLA-Modell genauer erläutert werden, welches im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde.

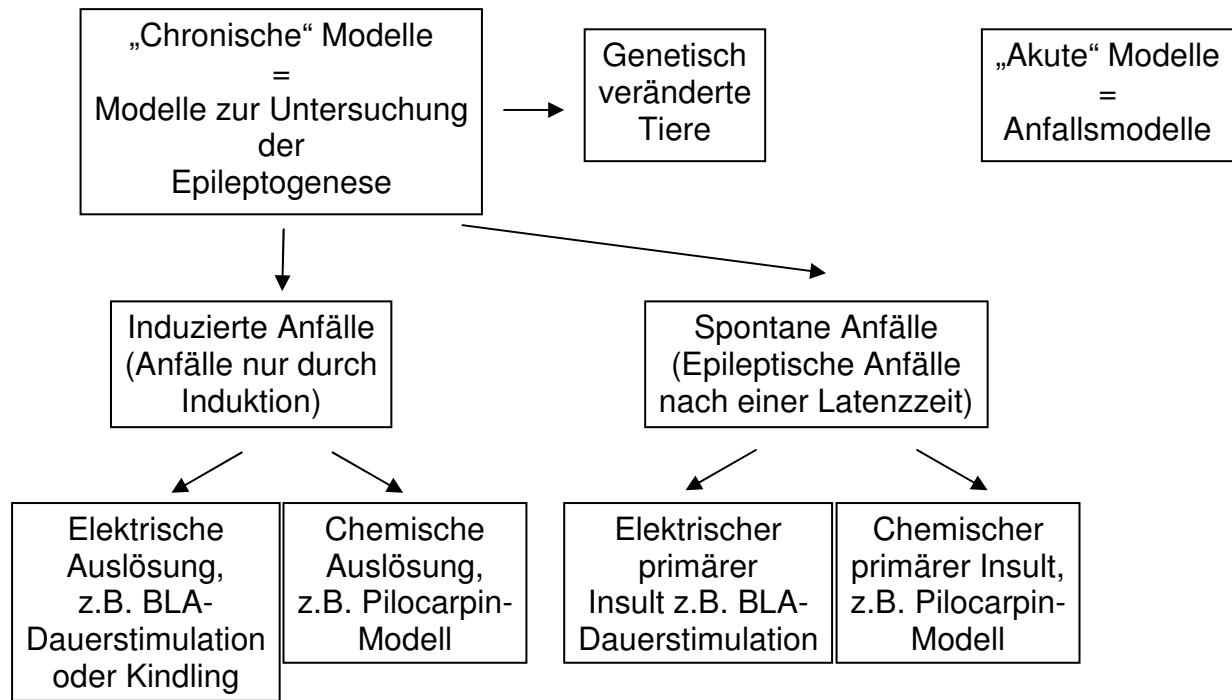


Abb. 2: Überblick über die verschiedenen Modelle in der Epilepsieforschung. So kann zwischen „akuten“ und „chronischen“ Modellen unterschieden werden. Bei den „chronischen“ Modellen können induzierte von spontanen Anfällen differenziert werden, die jeweils elektrisch oder chemisch ausgelöst werden können.

SE-BLA-Modell

Das SE-BLA-Modell ist ein elektrisches Modell, in welchem die Tiere über ihre in die BLA implantierte Elektrode über 25 min mit 700 μ A dauerstimuliert werden (BRANDT et al. 2003a). Infolgedessen wird ein sich selbst erhaltender SE (SSSE) induziert, welcher in drei verschiedenen Arten auftreten kann. Dabei werden Tiere mit fokalen, fokalen mit einzelnen generalisierten Anfällen oder mit generalisierten Anfällen beschrieben (siehe Kapitel 4.1.3). Die prozentuale Verteilung der verschiedenen SSSE-Typen ist abhängig vom verwendeten Rattenstamm, Geschlecht und der jeweiligen Lokalisation der Elektrode. Der Typ des SSSE ist entscheidend für die prozentuale Wahrscheinlichkeit eines späteren Auftretens von spontanen epileptischen Anfällen. So entwickeln nur rund 33% der Ratten mit einem fokalen SSSE längerfristig epileptische Anfälle, wohingegen dies bei mehr als 90% der Ratten mit Typ II oder III der Fall ist. Damit das Auftreten von Anfällen nach einer Latenzzeit wahrscheinlich ist, muss der generalisierte SSSE mindestens 4 Stunden betragen, bevor die Krampfaktivität mit Diazepam beendet wird.

Neurodegenerative Prozesse treten bei Tieren mit SSSE-Typ I nur regional auf und sind weniger ausgeprägt als bei Tieren mit Typ II oder III. Generell gilt, dass die Neuropathologie der Tiere mit generalisierten Anfällen den Veränderungen von chemisch induzierten Anfällen (z.B. Pilocarpin) ähnelt (BRANDT et al. 2003a).

2.2 Anfallsinduzierte neuronale Plastizität

2.2.1 Einführung

In den letzten Jahrzehnten konnte durch zahlreiche Arbeiten gezeigt werden, dass entgegen anhaltenden wissenschaftlichen Annahmen Plastizität auch im adulten Gehirn stattfindet (GAGE 2002; MING u. SONG 2005; GOULD 2007). Damit konnte die These der begrenzten Regenerationsfähigkeit des Gehirns widerlegt werden. So gilt die neuronale Plastizität als Voraussetzung für die lebenslange Weiterentwicklung und reibungslose Funktion des Gehirns. Physiologische Plastizität beschreibt die Veränderungen, die im Rahmen von Lernprozessen und Gedächtnisbildung auftreten. Sie umfasst z.B. die Modulation von synaptischen Übertragungen (synaptische Plastizität) oder die Neubildung von Neuronen (strukturelle Plastizität). Pathologische Plastizität wird zunehmend als Erklärung zur Entstehung von neurologischen Erkrankungen betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in verschiedenen Epilepsiemodellen, als auch in resektiertem Gehirngewebe von Epilepsiepatienten eine Differenzierung der neuronalen Plastizität stattfindet. Somit kann geschlussfolgert werden, dass epileptische Anfälle die Plastizität im Gehirn verändern (SLOVITER 1999; DALBY u. MODY 2001; DUDEK et al. 2002; PITKANEN 2002; PITKANEN u. SUTULA 2002). Neben einer aberranten axonalen Reorganisation können morphologische Veränderungen der neuronalen Dendriten und die Ausbildung von hyperexzitablen Synapsen festgestellt werden. Des Weiteren kommt es zu einer gestörten Neubildung von Neuronen (Neurogenese) (PARENT et al. 1998; SCOTT et al. 1998). Aufgrund verschiedener apoptotischer und nekrotischer Aktivitäten kommt es jedoch auch zu einer erheblichen neuronalen Schädigung mit einhergehendem Verlust von Nervenzellen (Neurodegeneration) (SLOVITER et al. 1996; VELISEK u. MOSHE 2003).

Da sich das Gehirn nach einem Trauma versucht zu regenerieren, ist es wichtig zu verstehen, welche der molekularen und zellulären Veränderungen zu der Entwicklung der Epilepsie beitragen und welche in die Reparatur und Rekonvaleszenz des betroffenen Gewebes involviert sind (DICHTER 2009a; JACOBS et al. 2009).

2.2.2 Neurodegeneration

Eine der am besten beschriebenen Veränderungen während der Epileptogenese ist die Neurodegeneration. Sowohl in experimentellen Modellen, als auch in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass anhaltende Anfälle oder ein Status epilepticus (SE) zum neuronalen Zelltod im Gehirn führen können (HENSHALL u. SIMON 2005). So führen bereits drei generalisierte Anfälle beim Kindling-Modell zu einem Neuronenverlust von rund 28% im Hilus-Areal. Die Schädigung steigt dabei progressiv mit jedem weiteren Anfall an, den das Tier erfährt (CAVAZOS u. SUTULA 1990; CAVAZOS et al. 1994). Die Neurodegeneration tritt bei einer TLE vor allem im Hilus und der Pyramidenzellschicht der CA₁-Region im Hippocampus auf. Mit geringeren Auswirkungen kommen auch Schädigungen in den CA₃- und CA₂-Pyramidenzellschichten, sowie den Körnerzellen vor. Des Weiteren wird Neurodegeneration auch in der Amygdala, dem entorhinalen, perirhinalen und parahippocampalen Cortex beschrieben. Extratemporal werden Thalamus und Cerebellum als mögliches Areal von Zellverlusten genannt (JUTILA et al. 2002).

Der Neuronenverlust tritt als Folge von nekrotischen, autophagocytischen und apoptotischen Prozessen auf (YUAN et al. 2003; HENSHALL u. SIMON 2005). Bei der Apoptose handelt es sich um den physiologischen Prozess des Zelltodes, der für die normale Entwicklung und Funktion eines multizellulären Organismus essentiell ist (STRASSER et al. 2000). Reguliert wird dieser Mechanismus durch die Familie der Caspasen und Bcl-2-Proteine. Die Apoptose kann über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg initiiert werden. Beim extrinsischen Weg kommt es über eine Ligandenbindung über an der Zelloberfläche exprimierte spezifische Rezeptoren (u.a. die TNF-Rezeptorfamilie) zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade. Diese setzt aus den Mitochondrien Cytochrom C frei, welches wiederum zur Aktivierung weiterer Caspasen führt. Dadurch angeregte Proteasen führen zum finalen Zelltod. Beim intrinsischen Weg werden durch z.B. DNA-Schädigung Proteinkinasen (u.a. das Tumorsuppressorprotein p53) freigesetzt, die durch Bcl-2-Proteine ebenfalls Cytochrom C aus den Mitochondrien aktivieren. Der weitere Vorgang gleicht dem des extrinsischen Weges.

Der nekrotische Prozess wird durch die mitochondriale Dilatation eingeleitet, welcher eine Dilatation des Cytoplasmas und der Organellen folgt. Die Ursache dafür liegt darin begründet, dass die Plasmamembran ihre selektive Wirkung gegenüber äußeren Einflüssen nicht mehr wahrnehmen kann und somit der osmotische Gradient für die

Mengenzunahme im Cytoplasma sorgt. Des Weiteren kommt es zur Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns. Die verstärkte Freisetzung von lysosomalen Enzymen beschleunigt den vollständigen Zellerntgang, der von einer signifikanten entzündlichen Reaktion begleitet wird.

Ein weiteres Modell zur Erklärung des neuronalen Zelltodes ist die exzitotoxische Hypothese. Diese besagt, dass die epileptischen Anfälle eine exzessive präsynaptische Glutamatfreisetzung initiieren, welche postsynaptische N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren aktivieren. Diese lösen wiederum einen rezeptorvermittelten intraneuronalen Calciuminflux aus. Der Calcium-Einstrom resultiert in einer Aktivierung von Proteasen und freien Radikalen, die die Zellularmembran, strukturelle Proteine und essentielle Enzyme zerstören (Abb. 3) (FUJIKAWA 2005).

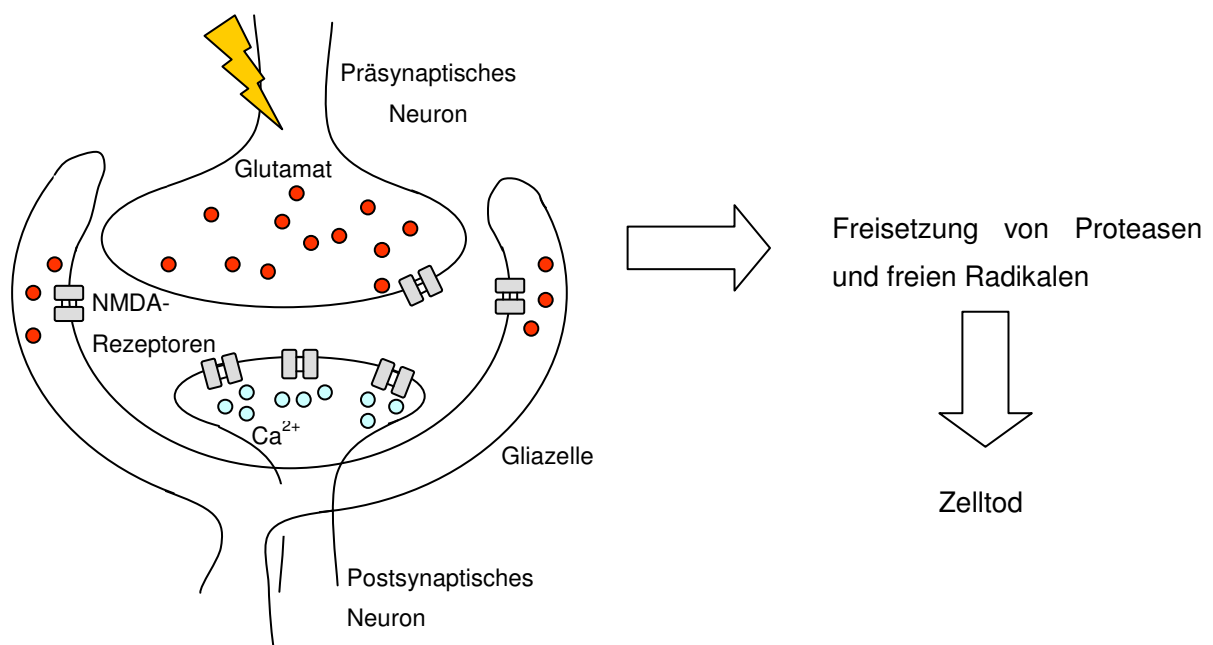


Abb 3: Darstellung eines präsynaptischen Neurons, das anfallsinduziert Glutamat freisetzt, welches postsynaptisch zu einem verstärkten Calcium-Einstrom führt. Dadurch aktivierte Proteasen und freie Radikale führen zum Zelltod. Schema modifiziert nach (SYNTICHAKI u. TAVERNARAKIS 2003; FUJIKAWA 2005).

Der selektive Neuronenverlust im Gyrus dentatus und der hippocampalen Pyramidenzellschicht wird häufig bei chirurgisch resektiertem Gewebe von TLE-Patienten beschrieben und als hippocampale Sklerose bezeichnet. Die zugrunde gegangenen Neuronen werden durch eine dichte Gliose ersetzt, die zur Schrumpfung und Verhärtung des betroffenen Gewebes führt (CHANG u. LOWENSTEIN 2003).

2.2.3 Hippocampale Neurogenese

Wie bereits erwähnt, konnte in den letzten Jahren das Dogma der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Gehirns entkräftet werden. So konnten in adulten Mammalia wie Ratte, Maus, Meerschweinchen, aber auch bei Primaten und dem Menschen eine kontinuierliche und lebenslange Proliferation und Neubildung von Neuronen (=Neurogenese) im Gyrus dentatus gezeigt werden (ALTMAN u. DAS 1967; CAMERON et al. 1993; KEMPERMANN et al. 1997; ERIKSSON et al. 1998; GOULD et al. 1999b). Die Neurogenese beginnt mit der Proliferation neuraler Stammzellen, gefolgt von der Reifung, der Migration und endet mit der Ausdifferenzierung der verschiedenen Zelltypen. Ein hohes neurogenes Potential wird definierten Gehirnregionen wie der subventrikulären Zone (SVZ) der anterolateralen Ventrikel (Neurogenese des olfaktorischen Systems) und der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (GD) des Hippocampus (hippocampale Neurogenese) zugeschrieben (KEMPERMANN u. GAGE 2000). In weiteren Gehirnregionen wie z.B. dem Cortex findet die Neuronenneubildung mit niedrigerer Turnover-Rate statt (GOULD et al. 1999c; BERNIER et al. 2002). Unter physiologischen Bedingungen tritt eine gesteigerte Neurogenese als Resultat von z.B. Lern- und Erinnerungsvorgängen auf. Pathologisch wird die erhöhte Neubildungsrate u.a. durch Veränderungen in der Mikroumgebung der SGZ (HATTIANGADY et al. 2004) oder durch epileptische Anfälle hervorgerufen (BENGZON et al. 1997; PARENT et al. 1997; SCOTT et al. 1998).

Neurogenese im epileptischen Gehirn

Status epilepticus führt zu gesteigerter Neurogenese in der SGZ im adulten Gyrus dentatus. So steigt die Anzahl neugebildeter Neurone um das Mehrfache in den ersten Wochen nach dem Insult an (PARENT et al. 1997; NAKAGAWA et al. 2000). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die insultgenerierten neugebildeten Neurone die verletzten und gestorbenen Neurone ersetzen sollen (EKDAHL et al. 2003). Jedoch überleben nur wenige der neu proliferierten Zellen, was den möglichen Einfluss der Neurogenese auf die funktionale Rekonvaleszenz der zerstörten Region minimiert (EKDAHL et al. 2001). Ein möglicher Grund des Rückgangs könnte in apoptotischen Vorgängen liegen, die durch insultinduzierte neuropathologische Veränderungen in der Gewebeumgebung impliziert werden. Auch das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle wird als Ursache diskutiert (EKDAHL et al. 2003). Um die anfallsinduzierten Veränderungen im epileptischen Gehirn zu untersuchen, werd-

en vor allem das Pilocarpin- und Kainsäure-Modell gewählt (CAVALHEIRO et al. 1996). So konnte gezeigt werden, dass SE-induziert eine Transformation von Stammzellen zu aktivierten neuronalen Vorläuferzellen, sowie eine erhöhte Proliferation von bestehenden Vorläuferzellen stattfindet. Die Vorläuferzellen werden durch intrinsische und extrinsische Wege aktiviert und durch verschiedene Wachstumsfaktoren (u.a. epidermal growth factor, EGF; insulin-like growth factor-1, IGF-1, vascular endothelial growth factor, VEGF) und Neurotrophine differenziert (CHENG et al. 2001; LICHTENWALNER et al. 2001; JIN et al. 2002; J. LEE et al. 2002b; YOSHIMURA et al. 2003). Ein weiterer Stimulator der Neurogenese ist der Neurotransmitter Serotonin (GOULD 1999). Wahrscheinlich werden die mitogenen Faktoren dabei von untergehenden Neuronen, deafferenten Körnerzellen und reaktiven Gliazellen freigesetzt, die im Hippocampus nach Anfällen oder exzitotoxischen Einflüssen heraufreguliert werden (LOWENSTEIN et al. 1993; SHETTY et al. 2003). Die heterogene Population an neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus kann anhand spezifischer Marker in Typ1-3 klassifiziert werden. Die Aktivierung und Proliferation der Vorläuferzellen findet in verschiedenen Arealen der CA₁- und CA₃-Region statt. Hingegen wird die Reifung der jungen Neuronen nur im Gyrus dentatus gesehen (INDULEKHA et al. 2010).

Die neu generierten Zellen migrieren unter kontinuierlicher Weiterentwicklung aus der subgranulären Zone in die Körnerzellschicht und reifen dort zu funktionellen Körnerzellen. Während der Migration und Entwicklung bilden die Körnerzellen transiente Basaldendriten aus. Bei Nagern können die basalen Dendriten anfallsinduziert persistieren und in den Hilus ziehen (SPIGELMAN et al. 1998; BUCKMASTER u. DUDEK 1999; RIBAK et al. 2000; WENZEL et al. 2001). Sie bilden zusammen mit Moosfasern asymmetrische exzitatorische synaptische Kontakte aus (RIBAK et al. 2000; WENZEL et al. 2001). Diese können sich zu potentiellen exzitatorischen Verbindungen zwischen den Körnerzellen entwickeln (PEKCEC u. POTSCHKA 2007). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nicht nur anhaltende Anfallsaktivität während eines SE, sondern bereits einzelne wiederkehrende Anfälle zu persistierenden Basaldendriten führen können (PEKCEC et al. 2007). Im Gegensatz zu Nagern weisen Menschen und adulte Primaten regelmäßig Basaldendriten auf (SERESS u. MRZLJAK 1987).

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es nach einem durch Pilocarpin- oder Kainsäure induzierten SE zur Ausbildung von ektopischen Körnerzellen im

Hilus und der Molekularschicht kommt. Diese atypisch integrierten und hyperexzitablen Zellen tragen möglicherweise zur Entwicklung und Generierung von spontanen Anfällen bei (SCHARFMAN et al. 2000; DASHTIPOUR et al. 2001; JUNG et al. 2004). So konnte im Nagermodell gezeigt werden, dass nach einem SE verabreichte antimitotische Substanzen die hilaren ektopischen Körnerzellen eliminieren können. Dadurch wiederum reduzierte sich die Anfallsfrequenz (JUNG et al. 2004). Patienten mit präoperativ chronischer Epilepsie und einer Langzeittherapie mit Antiepileptika zeigen eine verminderte Anzahl ektopischer Zellen. Vermutlich werden diese durch die hohe Anzahl schwerer Anfälle zerstört (MOHAPEL et al. 2004).

Eine weitere Beobachtung in der Epileptogenese-assoziierten zellulären Plastizität stellt die Körnerzell-Dispersion (granule cell dispersion, GCD) dar. Charakteristisch dafür ist die irreguläre Verbreiterung der Körnerzellschicht. Klinisch wird von einer Korrelation zwischen dem Auftreten der GCD und dem Einsetzen der Anfälle in den ersten vier Lebensjahren berichtet (HOUSER 1990; LURTON et al. 1998). Eine besonders hohe Assoziation besteht nach dem Auftreten von komplizierten oder verlängerten febrilen Konvulsionen (LURTON et al. 1998). In Tiermodellen konnte beobachtet werden, dass die GCD mit einer initial schweren Periode des SE assoziiert ist (SUZUKI et al. 1995; BOUILLERET et al. 1999). Sowohl Anfallsaktivitäten bei epileptischen Patienten als auch tierexperimentell induzierte Anfälle führen zur verminderten Reelin-Expression. Dieses Protein wird von Cajal-Retzius Zellen im Neocortex und in der Molekularschicht des GD gebildet und verhindert die Migration von Körnerzellen in die normalerweise zellarme Molekularschicht. In wieweit die GCD die Anfallsentwicklung beeinflusst ist im Moment noch unklar (HAAS u. FROTSCHER 2010).

Die am besten beschriebene morphologische Veränderung ist die Aussprossung von Moosfasern (mossy fiber sprouting, MFS) aus den Körnerzellen des Gyrus dentatus (PARENT u. LOWENSTEIN 1997). Die anfallsinduzierte Aussprossung wurde sowohl in zahlreichen chronischen Epilepsiemodellen, als auch in humanem Gewebe beobachtet (SUTULA et al. 1989; FRANCK et al. 1995; HOLMES et al. 1998; VAIDYA et al. 1999). Das Auftreten von MFS korreliert mit der Frequenz der wiederkehrenden Anfälle und dem Schweregrad der TLE. So kann das Erscheinen der MFS im chronischen Tiermodell als wichtiger Index für den Schweregrad der TLE betrachtet werden (SUTULA 2002; NADLER 2003). Bei den Moosfasern handelt es sich um Axone aus Körnerzellen, die normalerweise zu den Pyramidenzellen in der CA₃-Region zie-

hen. Aufgrund epileptischer Anfälle und der damit verbundenen massiven Neurodegeneration in der CA₃- und der Hilus-Region, verlieren die Axone ihr Target. Sie bilden nun atypische synaptische Verbindungen mit den Dendriten benachbarter Körnerzellen und verursachen dadurch abnormale hyperexzitabile Verschaltungen (SCHARFMAN et al. 2000; WILLIAMS et al. 2002). Verstärkend kommt hinzu, dass die atypischen Körnerzellen die Fähigkeit verloren haben, auf hypersynchrone Aktivitäten aus dem entorhinalen Cortex hemmend zu wirken (ENGEL 2001).

Als weitere Modifikation wird in der Literatur die SE-induzierte signifikant ansteigende Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Hilus beschrieben (JORGENSEN et al. 1993; SHAPIRO et al. 2008b). So bedingt die Schädigung oder der Untergang von Neuronen die Aktivierung der Gliazellen. Dieser Prozess wird auch als reaktive Gliose bezeichnet und ist eine prominente morphologische Eigenschaft der TLE (GARZILLO u. MELLO 2002). Die verästelten Mikroglia können ihre Form insultbedingt in reaktive oder amöboide Formen verändern und verschiedene Rezeptortypen, sowie zahlreiche sekretorische Produkte heraufregulieren. Diese tragen zum Schutz des traumatisierten Gehirnes bei (STREIT et al. 1999; LIU u. HONG 2003). Vermutlich spielen die Mikroglia zusätzlich eine wichtige Rolle in der atypischen hippocampalen Neurogenese. So zeigen sie möglicherweise einen Einfluss auf die aberrante Migration der neugebildeten Neurone (YANG et al. 2010). Des Weiteren führen sie möglicherweise durch eine Disruption der physiologischen puffernden Gliaaktivität zu einer neuronalen Hyperexzitabilität. Dies ist durch einen extrazellulären ansteigenden Kalium- und Glutamatspiegel bedingt, der die Aktivität der Neuronen steigert (CHANG u. LOWENSTEIN 2003).

Zusätzlich zu den zellulären Veränderungen werden auch auf Molekularebene Modifikationen festgestellt. So kommt es u.a. zu Veränderungen von Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren auf hippocampalen Körnerzellen (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). GABA ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter im Säugerhirn und im humanen Cortex (ROTHMAN et al. 1993; RICHERSON u. WU 2004). Es wird angenommen, dass das GABA-erge System eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Ausbreitung der epileptischen Aktivität einnimmt (MELDRUM 1989). So konnte im Pilocarpin-Modell gezeigt werden, dass durch die veränderte Expression der GABA-Rezeptor Untereinheiten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zink vorliegt, welches reichlich in den Moosfaserendigungen vorkommt (BROOKS-KAYAL et al. 1998). Das freigesetzte Zink führt nun in der chronischen

Krankheitsphase zu einem Kollaps der GABA-medierten Hemmung der Körnerzellen (BUHL et al. 1996) und kann somit zu einer Hyperexzitabilität der Neuronen beitragen. Die Tatsache, dass bei Epilepsiepatienten eine verminderte GABA-Inhibition vorliegt, führt zu der Annahme, dass ansteigende GABA-Level im Gehirn in einer besseren Anfallskontrolle resultieren (KUZNIECKY et al. 2002; SIMISTER et al. 2003).

Funktionelle Konsequenzen der epilepsieassoziierten Modulation der Neurogenese

Im Gehirn epileptischer Tiere findet die hippocampale Neurogenese in modifizierter komplexer Form statt (KEMPERMANN 2006; PARENT u. MURPHY 2008). HATTIANGADY et al (2004) demonstrierten, dass die Neurogenese im Gyrus dentatus initial nach dem SE ansteigt und in den folgenden Monaten während der chronischen Phase und dem wiederholten Auftreten von Anfällen absinkt. Die Entwicklung, Migration und Integration der neugebildeten Neurone wird dabei durch die Anfälle beeinflusst (SCHARFMAN u. GRAY 2007; SHAPIRO et al. 2008a). Welche funktionellen Konsequenzen aus diesen Veränderungen entstehen, bleibt im Moment kontrovers diskutiert. Es wird beschrieben, dass die Inkorporation einer kleinen Gruppe stark miteinander gekoppelter Körnerzellen die Netzwerkaktivität bedeutend erhöhen kann (MORGAN u. SOLTESZ 2008). So weisen die neugebildeten Neurone eine höhere Exzitabilität, sowie eine verringerte Hemmung durch GABA auf (WANG et al. 2000; GE et al. 2006). Möglicherweise tragen die neugebildeten Zellen damit zu den Anfällen bei (WOJTOWICZ 2008).

Treten epileptische Anfälle in früher Kindheit auf, in welcher die Neurogenese altersbedingt vermehrt stattfindet, führen die Verschaltungen der hippocampalen Kreisläufe zu permanenten Veränderungen mit unvorhersehbaren Auswirkungen (WOJTOWICZ 2008). So können die neurogenesebedingten Störungen zu weitreichenden Konsequenzen führen, wenn die neuronale Population aktiv in Lern- und Erinnerungsvorgänge involviert ist (WOJTOWICZ 2008). Die Integration der hohen Anzahl neugebildeter Neurone führt möglicherweise zu Veränderungen der hippocampalen neuronalen Verschaltungen, die in die Verarbeitung von Informationsprozessen involviert sind. Daraus resultiert eine Interferenz mit dem normalen Lern- und Erinnerungsvermögen (PEKCEC et al. 2008). Auch die veränderten synaptischen Verbindungen im Gyrus dentatus beeinflussen die Erinnerungsleistung (MATHERN et al. 2002). Des Weiteren führen die Veränderungen in der Produktion und/oder Integrati-

on der neugebildeten Zellen zu Modifikationen von kognitiven Funktionen und Stimmungen bei chronischer Epilepsie.

2.3 Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien

2.3.1 Einführung

Für die gezielte Modulation epileptogener Prozesse und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bedarf es einem verbesserten Verständnis der ätiopathologischen Veränderungen. Bislang ist bekannt, dass zur Generierung des proepileptogenen, neuronalen Netzwerks verschiedene Modifikationen auf neuronaler Ebene beitragen (Kap. 2.2.1). Therapeutische Strategien, die diesen Veränderungen entgegen wirken, stellen ein bedeutsames Gebiet in der Epilepsieforschung dar. Ein mögliches Potential bietet dabei das neuronale Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule, NCAM) und seine polysialylierte Form (PSA-NCAM). So konnte u.a. gezeigt werden, dass das PSA-NCAM-System in einem Post-Status-Epilepticus-Model zelluläre Veränderungen abschwächen und kognitive Defizite im Sinne einer erkrankungsmodifizierenden Wirkung reduzieren konnte (PEKCEC et al. 2007).

Neben der atypischen Neurogenese tragen auch neurodegenerative Prozesse zur neuronalen Plastizität bei. Sie sind zusätzlich an der Entstehung epilepsieassoziierter psychischer Störungen und kognitiver Defizite beteiligt. Auf Grund dessen stellt die Protektion neuronaler Zellen eine hoffnungsvolle Strategie zur Modulation der epileptogenen Vorgänge, sowie zur Behandlung epilepsieassoziierter Komorbiditäten dar. Somit hat die Untersuchung therapeutisch eingesetzter Antiepileptika auf ihr neuroprotektives Potential in den letzten Jahren an großer Bedeutung gewonnen (HALONEN et al. 2001; PITKANEN 2002; STEPIEN et al. 2005). Des Weiteren werden die neuroprotektiven Fähigkeiten alternativer Behandlungsmöglichkeiten untersucht. Dazu zählen Antioxidantien (GUPTA et al. 2002; WANG et al. 2004a; SHIN et al. 2007), eine Hormontherapie mit Progesteron (HOFFMAN et al. 2003) oder Östrogenen (VELISKOVA et al. 2000), eine ketogene Diät (NOH et al. 2006) oder die Behandlung mit neurotrophen Faktoren (SIMONATO et al. 2006). Zwar konnten mit diesen unterschiedlichen Therapieansätzen partielle Effekte erzielt werden, weitreichende Erfolge blieben bisher jedoch aus. Auf der Suche nach weiteren potentiellen Behandlungsstrategien rückten die neuroprotektiven Komponenten des Hormons und Glykoproteins Erythropoetin (EPO) in den Vordergrund (DAME et al. 2001; UZUM et al. 2006; SHANG et al. 2007; JUN et al. 2009). Neben den protektiven Eig-

enschaften konnten auch positive Effekte auf kognitive Fähigkeiten gezeigt werden (SIREN u. EHRENREICH 2001). Besonders große Hoffnungen liegen aktuell auf den EPO-Derivaten. Ein Beispiel dafür ist das Epotris, welches aus der C-Helix des EPO-Moleküls stammt (PANKRATOVA et al. 2010) oder das Pyroglutamat-Helix B-Surface-Peptid (pHBSP) aus der B-Helix des Erythropoetins (BRINES et al. 2008).

2.3.2 Erythropoetin

Das Hormon Erythropoetin (EPO) ist ein 165 Aminosäuren (30 kDa) langes Glykoprotein, das zur Zytokin Typ I Superfamilie gehört. Es besteht aus vier Helices (A-D), die eine globuläre kompakte Struktur bilden (PANKRATOVA et al. 2010). Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass EPO ausschließlich zur Regulation der Hämatopoese dient. Seine Eigenschaft die Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen zu inhibieren führt zur Reifung der Erythrozyten (RABIE u. MARTI 2008). Des Weiteren stimuliert EPO die erythroiden Progenitorzellen zur Proliferation und Differenzierung an. Hypoxiebedingt wird die Genexpression von EPO in den interstitiellen Fibroblasten der adulten Nieren (beim Fetus in den Hepatozyten) initiiert, welches in einem negativen feedback System die Hämatopoese im Knochenmark stimuliert (MARTI 2004; RABIE u. MARTI 2008).

In den letzten Jahren wurden jedoch EPO und sein homodimerer Rezeptor (EPO-R) in Geweben gefunden, die nicht in die Hämatopoese involviert sind. Dazu gehören das Gehirn, der Reproduktionstrakt, die Lungen, die Milz und das Herz (FANDREY u. BUNN 1993; MARTI et al. 1996; MASUDA et al. 2000; KOBAYASHI et al. 2002). Im Gehirn wird EPO durch Hypoxie vor allem in den Astrozyten und den Neuronen induziert. EPO-R konnte in Primärkulturen auf Astrozyten, Neuronen, Mikroglia und Oligodendrozyten nachgewiesen werden (NAGAI et al. 2001; GENC et al. 2006). Des Weiteren wurden sowohl EPO als auch EPO-R im cerebrovasculären Endothelium beschrieben (MARTI 2004). Durch die EPO-R auf der apikalen Zelloberfläche der Gehirndothelzellen kann systemisch appliziertes rekombinantes humanes EPO (rHuEPO) die Blut-Hirn-Schranke via Transcytose passieren (BRINES et al. 2000). Von anderen Autoren wird alternativ ein extrazellulärer Weg beschrieben (BANKS et al. 2004). Jedoch muss beachtet werden, dass nur rund 1% der intravenös applizierten EPO-Dosis tatsächlich das Gehirn erreicht (SIREN et al. 2009).

In vitro und in Tiermodellen konnten neben der hämatopoetischen Komponente auch neurotrophische und neuroprotektive Effekte durch EPO gezeigt werden. Die protek-

tive Wirkung wird zum einen direkt durch die Hemmung der Apoptose und zum anderen indirekt durch die Modulation von inflammatorischen Prozessen und der Anregung zur Neurogenese und Angiogenese vermittelt (VILLA et al. 2003; WANG et al. 2004b). Vermutlich werden die gewebeprotectiven Effekte über einen heterodimeren Rezeptor übertragen, der aus einem EPO-R und einem CD131-Rezeptor (beta-common-receptor, β cR) besteht (BRINES et al. 2008). TLE-Studien mit Nagern konnten zeigen, dass rHuEPO signifikante Effekte in der Antagonisierung der Entwicklung des SE aufweist (BRINES et al. 2000; UZUM et al. 2006). Des Weiteren konnte EPO die Kognition sowohl in erkrankten, als auch in gesunden Humanpatienten verbessern (BRINES et al. 2008).

Die Beschreibung von zahlreichen Nebenwirkungen wie erhöhter Blutdruck, Thrombose, Tumorexpansion und Mortalität führten in den letzten Jahren zur Entwicklung von neuroprotectiven EPO-Derivaten, welchen die hämatopoetische Komponente fehlt (LEIST et al. 2004).

2.3.3 Erythropoetin-mimetische Peptide

Peptide stellen eine Sequenz aus Aminosäuren dar, die wie eine Perlenkette aneinander aufgereiht sind. Diese sogenannte Primärstruktur, sowie die dreidimensionale räumliche Anordnung der Ketten (Sekundär- und Tertiärstruktur) bestimmen die Funktion des Peptides. Beim Design mimetischer Peptide wird in der Regel nicht die gesamte Aminosäuresequenz kopiert, sondern nur ein kleines aktives Fragment heraus gegriffen. Somit eröffnen mimetische Peptide die Fähigkeit gewünschte Effekte aufzuweisen, wohingegen unerwünschte Eigenschaften gezielt ausgeschaltet werden können.

BRINES et al. beschrieben 2008 erstmalig das EPO-mimetische Peptid Helix B-Surface-Peptid (HBSP). Es handelt sich dabei um ein elf Aminosäuren langes Peptid, welches aus der B-Helix des EPO-Proteins erstellt wurde. Da sich die N-terminalen Glutaminreste des HBSP (besonders bei Raumtemperatur und unter azidischen Bedingungen) spontan in irreversible Pyroglutamat-Formationen zyklisieren können, wird diese Form pHBSP genannt. pHBSP weist weder in vivo noch in vitro hämatopoetische Eigenschaften auf, demonstriert jedoch ein hohes gewebeprotectives Potential. So konnte im Schlaganfallmodell durch Applikation von pHBSP eine signifikante Reduktion des Infarktolumens, sowie eine Verbesserung der neurologischen Funktionen gezeigt werden. Auch in einem Nierenischämiemodell konnten renoprot-

ektive Effekte nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in einem Lerntest mit gesunden Nagern dargelegt werden, dass sich das Erinnerungsvermögen durch die Applikation von pHBSP verbessert. Vermutlich intensiviert das pHBSP die Konsolidierungsphase während der Erinnerungsakquirierung.

Gegenwärtig ist noch unklar, ob das pHBSP mit dem EPO-R/CD131-Rezeptor interagiert oder ob seine biologischen Effekte über andere Mechanismen vermittelt werden (BRINES et al. 2008).

2.4 Verhaltensuntersuchungen

2.4.1 Einführung

Um die Mechanismen psychiatrischer Erkrankungen zu untersuchen oder neue Substanzen in diesem Bereich zu testen, sind entsprechende Tiermodelle momentan unabdingbar. So gelten experimentelle Modelle von Gehirnerkrankungen in der biomedizinischen Forschung als unumgänglich (MALLERET et al. 1999; KLEMENHAGEN et al. 2006; WANG et al. 2007). Jedoch ist zu beachten, dass Tiermodelle die Situation bei Humanpatienten nicht exakt darstellen können. Es gibt kein Modell, welches isomorph ist mit der fraglichen Symptomologie (GREEN 1983). Des Weiteren werden trotz wachsender Hilfe durch präzise Verhaltensmesswerkzeuge selbst in den häufig angewendeten Tests nicht alle Handlungsweisen der Tiere befriedigend verstanden (RAMOS 2008).

Im Folgenden sollen nun einige der populären Modelle genauer beschrieben werden.

2.4.2 Verhaltensmodelle

Open Field

Das Open Field (Offenfeld, OF) gehört zu den ältesten und am häufigsten angewendeten Verhaltenstests. Es wurde 1934 zum ersten Mal von HALL (HALL 1934) zur objektiven Messung der Emotionalität von Ratten beschrieben. Dabei kann sowohl das exploratorische Verhalten, als auch die Qualität und Quantität von Aktivität untersucht werden (WALSH u. CUMMINS 1976). Grundlage dieses Tests ist die verhaltensbiologische Beobachtung, dass Nager das Betreten unbekannter und hell erleuchteter Flächen vermeiden. Werden sie einer solchen Situation ausgesetzt, bewegt sich ihre Aktivität im Spannungsfeld von Ängstlichkeit, Fluchtbereitschaft und Erkundungsdrang. Es gibt verschiedene Versionen des OF. So gibt es Variationen in der Form (rund, quadratisch oder rechteckig, jeweils mit einer Wand umgeben), in

der Beleuchtung (Beleuchtung von oben oder unten, Rotlicht oder handelsübliche Glühbirnen) und der Präsenz von Objekten in der Arena (PRUT u. BELZUNG 2003).

Das Prinzip beruht darauf, dass das Tier mit einer ihm unbekanntem Umgebung konfrontiert wird. Das Tier wird in die Mitte oder an den Rand der Arena eingesetzt und das Verhalten für eine bestimmte Zeit erfasst („Range“ zwischen 2 bis 20 min).

In der neutralen Umgebung können nun verschiedene Parameter wie die horizontale Lokomotion (Anzahl der Kreuzungen von markierten Linien in der Arena), vertikale Aktivität (Aufrichtefrequenz), Putzverhalten oder Defäkation und Urinieren beobachtet werden (IGARASHI u. TAKESHITA 1995; PRUT u. BELZUNG 2003). In dieser Situation bevorzugen Nagetiere spontan die peripheren Areale und bewegen sich in der Nähe der umgebenden Wände. Dieses Verhalten wird Thigmotaxis genannt (=Abtasten der Umgebung durch die Vibrissen). Verbringen die Tiere mehr Zeit im Zentrum der Apparatur, zeigen die Tiere erhöhte Lokomotion mit vertikaler Exploration, sowie eine kürzere Latenzzeit bis zum ersten Betreten der zentralen Areale, wird dies als Indikator für anxiolytisches Verhalten betrachtet (PRUT u. BELZUNG 2003).

Neben dem anxiolytischen und anxiogenen Verhalten können im OF auch sedative, toxische und stimulierende Effekte von verschiedenen Substanzen getestet werden (WALSH u. CUMMINS 1976). Dazu werden neben Nagetieren auch andere Spezies wie Kälber, Schweine, Lämmer und Honigbienen eingesetzt (PRUT u. BELZUNG 2003).

Elevated Plus Maze

Das Elevated-Plus-Maze (EPM) ist eines der populärsten Tiermodelle um angst-assoziiertes Verhalten zu evaluieren (PELLOW et al. 1985). Es handelt sich um einen einfachen und effizienten Versuch, der kein Training benötigt, da er auf dem spontanen Verhalten der Tiere basiert (SALUM et al. 2000). Der Test beruht auf den Beobachtungen von MONTGOMERY (MONTGOMERY 1955), der 1955 die Beziehung zwischen Angst und Explorationsverhalten bei Ratten beschrieb. Die Prämisse dafür war, dass eine neue Umgebung sowohl Angst als auch Neugierde in Ratten hervorruft, was eine typische Herangehensweise an den Konflikt verursacht. So steht das Tier in diesem Modell zwischen der Entscheidung an einem sicheren Ort (den geschlossenen Armen) zu bleiben oder der Motivation nachzugehen, die neue Umgebung zu explorieren (SALUM et al. 2000).

Das EPM ist eine erhöhte plusförmige Apparatur, welche aus zwei offenen und zwei geschlossenen Armen besteht, die über ein zentrales Areal miteinander verbunden

sind (TEJADA et al. 2009). Das Versuchstier wird in das Zentrum gesetzt und für fünf Minuten beobachtet. Diese Zeit wird nach Montgomery gewählt, da innerhalb dieser Periode das Vermeidungsverhalten besonders ausgeprägt ist (PELLOW et al. 1985). Ein gesunder Nager verbringt mehr Zeit in den geschlossenen Armen und wenn er sich bewegt, so werden mehr Eintritte in die geschlossenen Arme, als in die offenen Arme deutlich. Auf den offenen Armen zeigen die Tiere mehr angstassoziiertes Verhalten wie Frieren, Demobilisation, Defäkation, sowie einen erhöhten Plasma-Kortikosteroid-Spiegel (PELLOW et al. 1985). Als Ursache für die Aversion gegen die offenen Bereiche wird ein Angstgefühl der Nager diskutiert. Zusätzlich spielen das Novum der Umgebung und die Höhe der Apparatur eine Rolle (PELLOW et al. 1985; FALTER et al. 1992; TREIT et al. 1993; FERNANDES u. FILE 1996). Ein weiterer Punkt könnte die fehlende Möglichkeit zur Thigmotaxis sein (TREIT et al. 1993). Durch anxiolytische Substanzen (z.B. Diazepam) steigt der prozentuale Anteil der auf den offenen Armen verbrachten Zeit, wohingegen er bei anxiogenen Substanzen (z.B. Pentylenetetrazol) in Relation sinkt (PELLOW et al. 1985).

Obwohl die Resultate des EPM innerhalb eines Instituts oft stabil sind, können sie zwischen verschiedenen Laboratorien sehr unterschiedlich und widersprüchlich sein (HOGG 1996).

Black-and-White-Box

Das Prinzip der Black-and-White-Box (BWB) basiert auf dem spontanen Explorationsverhalten der Tiere, welches durch milde Stressfaktoren (neue Umgebung, Licht) hervorgerufen wird (SANCHEZ 1997). Der Test wurde erstmals von CRAWLEY und GOODWIN (CRAWLEY u. GOODWIN 1980) beschrieben und wird seitdem in vielfältigen Variationen zur Validierung von angstassoziiertem Verhalten eingesetzt.

Beobachtungen haben gezeigt, dass Nager eine natürliche Neigung haben neue Umgebungen zu erkunden. Offene Areale scheinen jedoch eine Aversion in den Tieren auszulösen, die die Exploration einschränken (CHRISTMAS u. MAXWELL 1970; OLIVERIO et al. 1973). Des Weiteren zeigen die Tiere vermehrt aversives Verhalten beim Betreten von hell erleuchteten Flächen (SHIMADA et al. 1995).

Die BWB besteht aus einer rechteckigen Box, von welcher ein Drittel schwarz gestrichen ist und schwach beleuchtet wird. Dieses schmale und dunkle Areal bietet den Tieren ein Gefühl von Sicherheit. Zwei Drittel der Box sind weiß und werden mit einer stärkeren Lichtintensität bestrahlt. Dieses Kompartiment entspricht einer freien,

grellen Fläche. Das Tier wird in die weiße Box mit dem Kopf in Richtung Durchgang zum schwarzen Kompartiment gesetzt (SANCHEZ 1997). Der Test dauert fünf Minuten. In dieser Zeit werden folgende Parameter gemessen: Anzahl des Aufrichtens, Anzahl der Übertritte zwischen dem weißen und dem schwarzen Kompartiment und die Aufenthaltszeit im weißen Areal. Anxiolytische Substanzen wie Benzodiazepine (z.B. Diazepam) führen zu einem Anstieg der Aufenthaltsdauer im hellen Bereich, sowie einer signifikant erhöhten Lokomotion (COSTALL et al. 1989; SHIMADA et al. 1995). Dies scheint ein Indikator für ein erhöhtes exploratorisches Verhalten zu sein, welches durch die aversive Umgebung unterdrückt worden war (COSTALL et al. 1989).

Zahlreiche Veröffentlichungen dokumentieren, dass die Ergebnisse der BWB oft nicht eindeutig sind (SANCHEZ 1997).

Morris-Water-Maze

Das Water Maze (Morris-Water-Maze, MWM) wurde von Richard MORRIS ausgearbeitet, nachdem einige Kontroversen aufgekommen waren, ob sich das räumliche Lernen fundamental von anderen assoziativen Lernweisen unterscheidet (MORRIS 1984).

Das MWM testet das räumliche Lernvermögen und die räumliche Erinnerung. Die Aufgabe für die Nager besteht dabei darin, dass sie mit Hilfe externer Hinweise lernen sollen in einem Schwimmbecken eine verborgene Plattform zu lokalisieren (VORHEES u. WILLIAMS 2006). Die Idee Wasser als Motivation zum Lernen einzusetzen, wird seit Jahrzehnten angewandt und macht die Deprivation von Nahrung oder einen elektrischen Schock überflüssig (MORRIS 1984).

Das MWM wird in unterschiedlichen Größen verwendet, wobei der Durchmesser zwischen einem und mehr als zwei Metern variieren kann (D'HOOGHE u. DE DEYN 2001). Es wird beschrieben, dass für den Versuch mit Albinoratten schwarz gestrichene Becken eingesetzt werden (VORHEES u. WILLIAMS 2006). Das Becken ist ca. halbhoch mit Wasser gefüllt, welches eine optimale Temperatur bei 19-22°C hat (VORHEES u. WILLIAMS 2006). Die Plattform kann viereckig oder rund sein, ist im Normalfall 10-11cm² groß und wird typischerweise 1-2 cm unterhalb der Wasseroberfläche angebracht. Sie besteht meist aus Acryl oder PVC und sollte entweder durchsichtig sein oder dieselbe Farbe wie das Becken aufweisen. Alternativ kann das Wasser eingefärbt werden, sodass die Plattform für die Tiere nicht sichtbar ist

(VORHEES u. WILLIAMS 2006). Das Becken wird in vier gedachte Quadranten eingeteilt und die Plattform in einem festgelegten Quadranten positioniert.

Um das MWM herum sollten großzügig die sogenannten externen Hinweise angebracht werden. Diese visuellen Merkmale sollen die Tiere in ihrer räumlichen Orientierung unterstützen und können z.B. in Form farbiger Gebilde platziert werden (FAES et al. 2010). Wichtig dabei ist, dass ihre Positionen während der Testphase nicht verändert werden (VORHEES u. WILLIAMS 2006).

Das Raumlicht sollte in der gesamten Zeit indirekt leuchten.

Für den Experimentator kommen während des Tests drei mögliche Aufenthaltsorte in Frage: (a) er verlässt den Raum, (b) er positioniert sich so, dass die Tiere ihn nicht sehen oder (c) er bleibt an einem konstanten Ort und wird so zu einem weiteren distalen Hinweis (VORHEES u. WILLIAMS 2006).

Zu Beginn des Versuchs wird das Tier mit Blickrichtung zur Beckenwand in den gewünschten Quadranten gesetzt. Es hat nun eine Minute Zeit die Plattform zu finden. Zu Beginn schwimmen die Ratten randomisierte oder unsystematische Wege durch den Pool, lernen in der Regel jedoch rasch (unabhängig vom jeweiligen Startpunkt) die direkte Strecke zu der Plattform zu finden. Die initiale Abnahme der Latenzzeit ist dabei von zwei Faktoren abhängig: (1.) die Ratten lernen von den Beckenwänden wegzuschwimmen und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit durch Zufall auf die Plattform zu treffen und (2.) die Tiere lernen die Lokalisation der Plattform aufzufinden (MORRIS 1984). Gelingt dies nicht innerhalb der vorgegebenen Zeit, so wird das Tier für einige Sekunden auf die Plattform gesetzt. Generell werden drei verschiedene Strategien zum Auffinden der Plattform deutlich: (a) das Tier wendet eine gelernte Abfolge an Bewegungen an (praxis strategy), (b) es orientiert sich an proximalen Hinweisen (taxis strategy) oder (c) es navigiert sich anhand distaler Hinweise (mapping or spatial strategy) (D'HOOGHE u. DE DEYN 2001).

Der Vorgang wird mehrmals wiederholt, wobei der Startpunkt je ein anderer Quadrant ist. Ziel dabei ist eine Vermeidung der Rechts-Links Navigation der Tiere zur Plattform. Üblicherweise werden vier Durchgänge durchgeführt (VORHEES u. WILLIAMS 2006). Die Zeitspanne, über welche die Lernphase wiederholt wird, ist abhängig vom Verlauf der Lernkurve, beträgt meist aber 5-6 Tage. Als Parameter für das Lern- und Erinnerungsvermögen gilt die Latenzzeit und die Strecke bis zum Auffinden der Plattform (FAES et al. 2010). Im Anschluss an den letzten Durchgang folgt die Spatial Probe. Die Plattform wird dafür entfernt und die Tiere getestet, ob sie sich

an die ehemalige Position erinnern können. Indikationen für das Erinnerungsvermögen sind u.a. die Anzahl der Kreuzungen der früheren Lokalisation der Plattform, sowie die Zeit und die zurückgelegte Strecke im Plattform-Quadranten im Vergleich zu den übrigen Quadranten (VORHEES u. WILLIAMS 2006).

3 ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESE

Zum aktuellen Zeitpunkt stellt die medikamentöse Behandlung bei Epilepsieerkrankungen die wichtigste Therapieform in der Veterinär- und Humanmedizin dar. Bei vielen Patienten kann dadurch jedoch keine zufriedenstellende Kontrolle der Anfälle erreicht werden. So sprechen rund ein Drittel der Patienten nicht auf die gängigen Antiepileptika an. Beim Hund kommt erschwerend hinzu, dass aufgrund der hohen Metabolisierungsrate kurze Applikationsintervalle notwendig sind. Weiterhin leiden Epilepsiepatienten häufig an den Nebenwirkungen der antikonvulsiven Präparate. Neben den Anfällen können multiple epilepsieassoziierte Komorbiditäten auftreten. Das Krankheitsgeschehen kann somit zu schwerwiegenden Konsequenzen führen, die in weitreichenden Einschränkungen im Leben der Betroffenen resultieren. In der Veterinärmedizin führt ein mangelhafter Therapieerfolg in vielen Fällen sogar zur Euthanasie der Patienten. Wünschenswert wäre daher eine prophylaktische Therapie, die die Entwicklung der Epilepsie und die damit assoziierten Komorbiditäten verhindert. Jedoch erschwert das mangelnde Wissen über die Prozesse, die der Epilepsieentstehung zugrunde liegen, die Entwicklung neuer Strategien. Das Erlangen von genaueren Kenntnissen über die Mechanismen der Epileptogenese und damit verbundenen psychiatrischen Erkrankungen ist daher ein wesentlicher Bestandteil für die zukünftige Entwicklung von präventiven oder kurativen Therapieansätzen. In dem geplanten Dissertationsvorhaben soll sowohl die experimentelle Prüfung möglicher neuer Strategien zur Prophylaxe, als auch zur Therapie von Epilepsien und anfallsinduzierten Komorbiditäten erfolgen.

In den letzten Jahren wurden in Zusammenhang mit dem epileptogenen Prozess zahlreiche Veränderungen der neuronalen Plastizität diskutiert. Von zentraler Bedeutung ist dabei neben der gestörten Neurogenese auch der Untergang von Neuronen. Diesen anfallsinduzierten Modifikationen wird eine wesentliche Beteiligung an der Entstehung eines epileptogenen, prokonvulsiven Netzwerkes zugesprochen, das schließlich in der Manifestation einer Epilepsie resultiert. Somit könnte sich eine Verhinderung oder Abschwächung dieser Plastizitätsveränderungen hemmend auf die Epileptogenese auswirken. Oberstes Ziel ist damit eine Prophylaxe der Krankheit. Mindestens sollte jedoch eine Reduzierung des Schweregrads der Anfälle und/oder eine Verringerung von pharmakoresistenten Patienten erreicht werden. Des Weiteren sollten Modifikationen der epilepsieassoziierten Komorbiditäten möglich sein. Aktuelle Ergebnisse weisen darauf hin, dass EPO-mimetische Peptide ein dement-

sprechendes prophylaktisches Potential aufweisen. Daraus ergeben sich folgende im Rahmen dieser Arbeit zu klärenden Fragestellungen:

- ❖ Wie wirkt sich die Behandlung mit dem EPO-mimetischen Peptid pHBSP in einem etablierten SE-Modell auf die Art, Schwere und Dauer des SE bzw. die Mortalität als Folge des SE aus?
- ❖ Zu welchen Veränderungen der epilepsieassoziierten Komorbiditäten führt die Applikation von pHBSP?
- ❖ Inwieweit kommt es zu Veränderungen der anfallsinduzierten neuronalen Plastizität (insbesondere was die gestörte Neubildung von Neuronen und den Verlust von Neuronen aufgrund apoptotischer und nekrotischer Prozesse betrifft)?

4 MATERIAL UND METHODEN

Effekte auf die Epilepsieentwicklung und epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen durch das Erythropoetin-mimetische Peptid pHBSP und Erythropoetin

4.1 Versuchstiere

Der Versuch erfolgte mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern unter dem Titel „Entwicklung präventiver Maßnahmen zur Reduktion epilepsieassoziiierter Komorbiditäten“ unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-40.07. Für die Analyse der Effekte auf die Epilepsieentwicklung durch das EPO-mimetische Peptid pHBSP und Erythropoetin (EPO), sowie deren Auswirkungen auf epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet. Diese hatten bei ihrer Ankunft ein Körpergewicht von 200-224 g. Die Tiere wurden einzeln in Makrolon Typ III Käfigen gehalten, welche mit Weichholzgranulat (WH-Grade 5, Altromin, Lage) eingestreut waren. Die Nahrung der Ratten bestand aus Standardnagerdiät (R/M-Haltung, 10 mm, Sniff, Soest) und Leitungswasser, welches beides ad libitum angeboten wurde. Das Futter wurde je nach Bedarf aufgefüllt und das Wasser ein Mal in der Woche erneuert. Ein Mal wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Umsetzen 1- 2 Tage vor den Experimenten stattfand. So wurde der Stressfaktor für die Tiere unmittelbar vor den Versuchen minimiert. Die Umgebungstemperatur im Tierhaus lag zwischen 20-22°C und die Luftfeuchtigkeit bei 37-40 %. Der 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus begann um 7:00 MEZ mit der Helligkeitsphase und wechselte um 19:00 MEZ in die Dunkelphase. Um den Ratten eine Akklimation zu ermöglichen, begannen die Operationen zur Implantation der Elektrode frühestens 12 Tage nach ihrer Ankunft. Vor den jeweiligen Experimenten wurden die Tiere an mindestens fünf Tagen an den Umgang mit dem betreuenden Personal und an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Mit den Versuchen wurde jeweils zwischen 7:00 und 9:00 MEZ begonnen, um circadiane Einflüsse möglichst gering zu halten.

4.2 Post-Status-Epilepticus-Modell

Implantation der Elektrode

Für die Operation wurden die Ratten mittels Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml/kg 0,9 %ige NaCl-Lösung, i.p.) narkotisiert. Zur Lokalanästhesie wurde Bupivacain, Jena-pharm® 0,5% (Mibe GmbH, Brehna) s.c in das zu eröffnende Areal appliziert. Zur

Überprüfung der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehenreflex durchgeführt. Bei Ausbleiben einer Abwehrreaktion konnte mit der OP begonnen werden. Um die exakte Positionierung der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) zu gewährleisten, wurden die Ratten in einen Stereotaxen (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) eingespannt. Der stereotaktische Atlas von PAXINOS und WATSON (2005) diente nachfolgend als Orientierungshilfe zur präzisen Implantation der Elektrode. In dem Atlas werden die Hirnstrukturen in Relation zu Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) aufgezeigt (Abb. 4). Damit die exakte Orientierung anhand der Koordinaten stattfinden kann, müssen zu Beginn Bregma und Lambda (kaudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) auf derselben Höhe liegen. Dies geschieht dadurch, dass im Falle des Sprague-Dawley Stammes die Oberkieferhalterung auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie eingestellt wird.

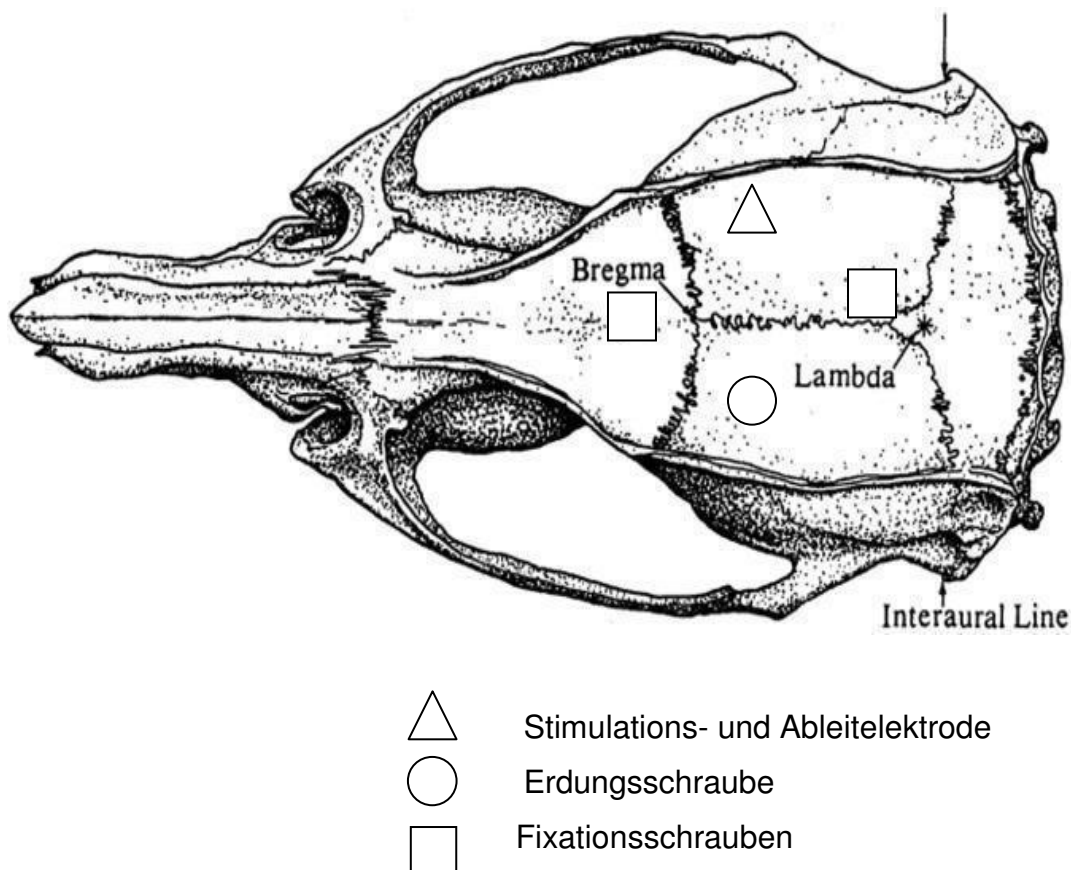


Abb. 4: Sicht auf den Rattenschädel mit Lokalisation der Stimulations- und Ableitelektrode, Erdungsschraube und Fixationsschrauben. Modifiziert nach (PAXINOS u. WATSON 2005).

Die Implantation erfolgte nach vorangegangenen Lokalisationsversuchen in die basolaterale Amygdala der rechten Hemisphäre an die in der folgenden Tabelle dargestellten Positionen:

	lateral	anterior-posterior	dorso-ventral
BLA	+2,2	+4,7	+8,5

Tab. 1: Koordinaten in mm in Relation zu Bregma als Position für die Implantation der Elektrode in die rechte basolaterale Amygdala

Gegenüber der Tiefenelektrode wurde an einer in der Schädeldecke befestigten Schraube eine Teflon-ummantelte Erdungselektrode angebracht. Des Weiteren wurden zwei Fixationsschrauben am Schädelknochen befestigt, die als Haltefunktion für den kaltpolymerisierenden Kunststoff Paladur® (Fa. Heraeus, Hanau) fungieren sollten. Das Paladur® diente der dauerhaften Fixierung der Elektroden. Die Paladur®-Schicht, die direkt an der Schädeldecke anlag, wurde mit 2,1% Gentamicinsulfat (Sigma Aldrich, München) vermischt. Dies trug zu der prophylaktischen Wundvorsorge bei. Zusätzlich erhielten die Tiere eine antibiotische Medikation. Beginnend am Tag vor der Operation wurde den Ratten zwei Mal täglich Marbofloxacin (Marbocyl®, Vétoquinol, Ravensburg) über einen Gesamtzeitraum von acht Tagen hinweg verabreicht. Nach der Implantation erfolgte eine Rekonvaleszenzphase von sechs Wochen.

SE-BLA-Modell

Nach Ablauf der sechs Wochen wurde mit der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala zur Induzierung eines sich selbsterhaltenden Status Epilepticus (SSSE) begonnen. Vor Stimulationsbeginn wurden die Tiere gewogen und über ihren Steckeraufsatz an ein zweiadriges abgeschirmtes Kabel angeschlossen, welches mit der Aufzeichnungseinheit verbunden war. So konnte unmittelbar vor der Stimulation ein so genanntes Ruhe- oder auch Basal-Elektroenzephalogramm (EEG) aufgezeichnet werden. Dies diente als Kontrolle, um im weiteren Versuchsverlauf eventuell auftretende individuelle Normabweichungen auszuschließen. Im Anschluss wurden die Tiere über dasselbe Kabel mit der Stimulatoreinheit (Accupulser Modell A310C

und Stimulus Isolator A365, World Precision Instruments, Berlin) verbunden. Die darauf folgende 25 Minuten anhaltende Dauerstimulation der basolateralen Amygdala wurde durch einen Reizstrom erzeugt und umfasste bipolare Einzelpulse von je 1 Sekunde Dauer mit einer Frequenz von 50 Hz bei einer Stromstärke von 700 μ A. Während der Stimulation wurden die Tiere kontinuierlich beobachtet und die Krampfaktivität nach Tabelle 2 bewertet. Nach Ablauf der 25 Minuten wurde der Reizstrom zum Tier abgebrochen, das Kabel entfernt und die Ratten zur Beobachtung in ein Glas-Terrarium gesetzt. Hier wurden die Tiere nun bis zur 240. Minute post stimulationem kontinuierlich observiert und das Auftreten und die Schwere der Anfälle, sowie der Typ des SSSE analysiert und dokumentiert. Anschließend wurde der Status epilepticus (SE) mit 10–25 mg/kg Diazepam abgebrochen. Bei anhaltender motorischer Aktivität wurde die Injektion in gleicher Dosierung bis zur kompletten Suppression der Anfälle wiederholt. Eine SSSE Dauer von vier Stunden wurde in der Vergangenheit als adäquate Zeitspanne ermittelt, um das Auftreten der spontanen epileptischen Anfälle zu gewährleisten (BRANDT et al. 2003a). Nach der Komplettunterdrückung motorischer Anfallsaktivität wurde bei den Tieren erneut ein EEG abgeleitet, um jegliche weitere Krampfaktivität ausschließen zu können. Bis zur vollständig wiederhergestellten Mobilisation wurden die Ratten auf ein Wärmekissen gelegt. Zur Vorbeugung einer Dehydratation wurde den Tieren einmalig eine NaCl-Injektion (3ml/Tier i.p., 10ml/Tier s.c.) verabreicht. Infolge des SSSE geschwächte Tiere wurden bis zur selbständigen Nahrungsaufnahme, in der Regel wenige Tage post stimulationem, mit Babybrei gefüttert.

4.3 Anfallsparameter

Die Bewertung der Anfallsaktivität geht auf eine von RACINE (RACINE 1975) entwickelte Einteilung zurück, die von BARAN (BARAN et al. 1995) modifiziert wurde. Sie dient als Grundlage für die im Rahmen der elektrischen Simulation auftretenden epileptischen Anfälle und der Klassifizierung der SSSE-Typen. Die Einteilung der Anfälle erfolgt nach ihrer Dauer und ihrem Schweregrad.

Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen des ipsilateralen Auges, stereotypes Schnüffeln)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium II	schwerer Fazialklonus (klonische Kaubewegungen, Kopfnicken)	
Stadium III	unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium V	bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Verlust des Stellreflexe (nach hinten fallen)	
Stadium VI	Stadium V mit explosionsartig einsetzendem Rennen und Springen (running and bouncing)	

Tab. 2: Skala der Krampfschwere und deren Anfallscharakteristika (BARAN et al. 1995)

Im elektrischen Epilepsiemodell können drei SSSE-Typen unterschieden werden (BRANDT et al. 2003a). Ein fokaler SSSE ist charakterisiert durch das Auftreten von Anfällen der Stadien I-II, unterbrochen von einzelnen und unregelmäßigen Anfällen des Typs III. Bei einem fokalen SSSE mit einzelnen generalisierten Anfällen treten zusätzlich gesonderte Anfälle der Stadien IV und V auf. Ein generalisierter SSSE ist gekennzeichnet durch das kontinuierliche Auftreten generalisierter Anfälle und einzelner Erscheinung des Stadium VI.

4.4 Erythropoetin und das Erythropoetin-mimetische Peptid pHBSP

Das Erythropoetin (Erypo®) wurde von der Firma Janssen-Cilag (Neuss) produziert und in einer Apotheke als handelsübliches Präparat gekauft. Das mimetische Peptid pHBSP und das dazu gehörige „scrambled Peptid“ wurde nach Auftrag von der Firma GL Biochem Ltd., Shanghai synthetisiert und als unverpacktes, frei vorliegendes Peptid hergestellt. Sowohl pHBSP als auch das „scrambled Peptid“ weisen ein relatives Molekulargewicht von 1257.35 auf und bestehen aus einer Sequenz von 11 Aminosäuren (siehe Tabelle).

Peptid	Sequenz	Molekülformel
pHBSP	PYR-Glu-Gln-Leu-Glu-Arg-Ala-Leu-Asn-Ser-Ser-OH	$C_{51}H_{84}N_{16}O_{21}$
scrambled pHBSP	PYR-Ser-Glu-Ser-Gln-Asn-Leu-Leu-Glu-Arg-Ala-OH	

Tab. 3: Übersicht über Sequenz und Molekülformel der Peptide

4.5 Erfassung spontaner Anfälle bei Ratten

Ab der 10. Woche post stimulationem wurde mit der Erfassung der spontanen Anfälle bei den epileptischen Tiere begonnen. Die Aufzeichnung erfolgte in der 10. und 12. Woche über 24 Stunden/Tag an je sieben Tagen mittels EEG-Ableitung und zusätzlichem Videomonitoring. Einzelne Tiere, die ihren Steckeraufsatz im Verlauf des chronischen Versuchs verloren hatten oder Tiere bei denen es im Verlauf der EEG-Ableitungsphase zu Kabeldefekten kam, wurden ausschließlich videoüberwacht. Des Weiteren wurden die Anfälle, die während des Handlings auftraten, charakterisiert und dokumentiert.

EEG-Aufzeichnung

Das EEG diente zur Bestimmung des genauen Anfallszeitpunkts. Eine Einheit zur dauerhaften Ableitung des EEG bestand aus acht Ein-Kanal-Verstärkern (BioAmps, ADInstruments LTD., Hastings, UK), einem Analog-Digitalwandler (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) und einem Personal Computer mit der Software Chart 5 für Windows. Da die Aufzeichnungseinheit zwei Mal vorhanden war konnten 16 Ratten gleichzeitig überwacht werden.

Durch den Verstärker wurde das EEG-Signal um das 100-fache verstärkt. Die Aufzeichnung fand mit einer Abtastrate von 200 Hz statt. Sämtliche Frequenzen über 60 Hz wurden mit einem „low pass filter“, Frequenzen unter 0,1 Hz von einem „high pass filter“ eliminiert. Zur Filterung des 50 Hz Frequenzbereichs (Frequenz des Netzstroms) wurde ein Notch-Filter verwendet. Die Kabel, die zur Ableitung verwendet wurden, stammten aus eigener Anfertigung, da kommerziell keine entsprechenden Produkte erworben werden konnten. Dabei wurde besonders darauf geachtet eine störungsfreie Aufnahme zu ermöglichen und den Tieren einen maximalen Bewegungsfreiraum zu geben. Um dies zu erreichen wurden abgeschirmte, zweiadrige,

ummantelte Kabel eingesetzt, die mit einem Telefonverdrehler verbunden waren. Die Kabelabschirmung wurde mit Hilfe einer Krokodilklemme am Verstärker befestigt, um das Grundrauschen möglichst niedrig zu halten.

Die abgeleiteten EEGs wurden später mit Hilfe des Computerprogramms Chart 5 betrachtet und analysiert.

Video-Aufzeichnung

Da das Risiko besteht, dass die Ratten ihren Steckeraufsatz verlieren, ist es vor allem im chronischen Modell notwendig die EEG-Ableitungen durch Videomonitoring zu ergänzen. Eventuell ausfallende EEG-Signale können so mittels Videoaufnahmen kompensiert werden. Des Weiteren kann nur auf diese Weise eine exakte Klassifizierung der Anfallstypen erfolgen. Im vorliegenden Versuch wurden anfangs vier CCD-Schwarz-Weiß-Kameras (Conrad Electronic GmbH, Hannover) eingesetzt, von denen jedoch eine im Versuchsverlauf durch eine Farbkamera (Conrad Electronic GmbH, München) ersetzt wurde. Nachts erfolgte die Aufnahme mittels Infrarot-Technologie. Die Kameras waren mit einem Computer verbunden, der das Datenmaterial auf einer RAID (Redundant Array of Independent Discs) speicherte. Diese organisiert mehrere Festplatten eines Computers zu einem logischen Laufwerk. Dadurch werden größere Ausfallzeiten bei einem Festplattenausfall verhindert und die Speicherung des enormen Datenaufkommens ermöglicht.

Jede Kamera filmte vier Tiere, die sich in umfunktionierten, allseits transparenten Glas-Aquarien (60x40x40 cm) befanden. Später wurden die in der Videoüberwachung ermittelten Anfälle ausgewertet und klassifiziert. Dabei wurden die Krampfschwere, -dauer und der Zeitpunkt des Krampfes notiert.

4.6 Verhaltensmodelle

Sämtliche Verhaltensuntersuchungen wurden in einem eigens dafür eingerichteten schallisolierten Labor durchgeführt. Der Computer zur Auswertung der Versuche war in einem separaten Nebenraum untergebracht. Die Aufzeichnung der Versuche erfolgte durch eine mit dem Computer verbundene Kamera (Panasonic CCTV, Japan). Diese war an einem Gestell mittig über den Versuchsapparaturen angebracht (in einer Höhe von 2,45 m). Des Weiteren waren an dem rechteckigen Gestell an jeder der vier Seiten (Höhe 2,40 m, Seitenlänge je 3 m) bodenlange schwarze Vorhänge befestigt, die die Umgebung um die Versuchsapparaturen gleichmäßig erscheinen

ließen. Für die computergestützte Datenerhebung wurde das NoldusXT-Programm (Noldus Ethovision, Niederlande) gewählt. Um den Einfluss externer akustischer Reize während der Versuche zu minimieren, wurde mit Hilfe eines MP3-Players (Axxion AMP210, Munsbach) ein konstantes weißes Rauschen („White Noise“, 60 dB) erzeugt. Außer beim MWM hielten sich während der Versuche keine Personen im Labor auf. Vor den Tests wurde mit allen Tieren einheitlich umgegangen, um stressbedingte Einflüsse gleich zu halten. Nach jedem Versuch wurden die Apparaturen von Fäkalien befreit und mit 0,1% Essigsäure gereinigt.

Im Folgenden sollen nun die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verhaltensuntersuchungen, sowie die dazu gehörigen Parameter näher erläutert werden.

Etablierung der Verhaltensmodelle

Methode	Parameter				Probleme & Lösungen
	Anzahl Lampen	Lichtstärke	White noise	Dauer	
OF	4	100-200 lx	60 db	10 min	Ungleichmäßige Ausleuchtung, Schattenwurf im OF, Unschärfe
	8	70 lx	60 db	10 min	Tisch, weitere Lampen angebracht
EPM	12	150 lx offen/ 53 lx geschl.	60 db	5 min	Lichtreflektion, ungleichmäßiger Schattenwurf in den geschl. Armen, zu aversiv
	8	70 lx offen/ 20 lx geschl.	60 db	5 min	Zu aversiv
	4	20 lx offen/ 10 lx geschl.	60 db	5 min	lx-Zahl gesenkt

BWB	12	250 lx WB/ 100 lx BB	60 db	5 min	Reflektion, ungleichmäßiger Schattenwurf in BB
	8	177 lx WB/ 90 lx BB	60 db	5 min	Unschärfe, Tisch verwendet
	5	80 lx WB/ 70 lx BB	60 db	5 min	Klemmlampen verwendet, Detektion s/w kaum möglich (Tier wird nicht von Software erkannt)
	7	20 lx WB/ 15 lx BB	60 db	5 min	Detektion s/w kaum möglich
	8	15 lx WB/ 10 lx BB	60 db	5 min	Detektion s/w kaum möglich
	8	50 lx WB/ 40 lx BB	60 db	5 min	ohne Tisch, Deckenlampen
MWM	12	300 lx	60 db	1 min	Reflektion am Abfluss, ungleichmäßige Ausleuchtung
	11	65 lx	60 db	1 min	Abfluss abgeklebt

Tab. 4: Übersicht über die etablierten Verhaltensmodelle mit der jeweils getesteten unterschiedlichen Anzahl an Lampen, der Luxzahl, sowie aufgetretenen Problemen und Lösungen

Für die Etablierung der in dieser Arbeit angewandten Verhaltensmodelle wurden beruhend auf verschiedenen Literaturangaben unterschiedliche Einstellungen der Parameter getestet. So wurde zu Beginn für das jeweilige Verhaltensparadigma die Lux-Zahl eingestellt. Dies geschah mit Hilfe unterschiedlicher Lampenanzahl, sowie der Dimmbarkeit der auf unterschiedlichen Höhen angebrachten Lichtquellen. Ein dabei häufig auftretendes Problem war, dass Schatten in den Verhaltensapparaturen erschienen, die zum einen die Tiere beeinflussen könnten und zum anderen zu Irritationen der Kamera führten. Des Weiteren kam es zum Auftreten von Reflektionen des Lichts auf dem PVC-Material des OF, des EPM und der BWB, sowie auf dem metallenen Abfluss des MWM-Beckens. Die Lichtverhältnisse mussten dahingehend optimiert werden, dass die Kamera die Tiere ohne Unterbrechung ein-

wandfrei detektieren konnte. Zu beachten war jedoch, dass das Licht nicht zu hell war und so aversiv auf die Tiere wirken könnte. Auf der anderen Seite sollte es auch nicht zu dunkel sein, um den Tieren kein zu großes Sicherheitsgefühl zu vermitteln.

War das Kamerabild trotz Zoom zu unscharf, bestand die Möglichkeit die Apparatur auf einen Tisch zu stellen und somit die Strecke zwischen Kamera und aufzunehmendem Objekt zu verringern.

Im MWM wurde der reflektierende Abfluss mit Klebeband abgeklebt. Zusätzlich zu den technischen Veränderungen konnten im NoldusXT-Programm Einstellungen wie Kontrast und Helligkeit manuell korrigiert werden.

Nachdem die Parameter eingestellt waren, erfolgte ein Etablierungsdurchgang mit einer Diazepam- (DZP) bzw. einer Pentylenetetrazol-behandelten (PTZ) Tiergruppe, sowie einer NaCl-behandelten (1ml/kg) Kontrollgruppe. Verschiedene Daten aus der Literatur zeigen, dass die hier angewendeten Dosen DZP (0,1 mg/kg i.p.) und PTZ (10 mg/kg i.p.) anxiolytische und anxiogene Effekte aufweisen. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die etablierten Parameter tatsächlich die in der Literatur beschriebenen Verhaltensmuster bei den Tieren hervorrufen.

Open Field

Wir verwendeten ein rundes schwarzes 26 cm hohes Open Field mit einem Durchmesser von 85 cm. Die indirekte Beleuchtung wurde durch vier Lampen erzeugt, die seitlich und über dem OF angebracht waren. Im Zentrum der Arena kam es so zu einer Lichtintensität von 70 lx und an den Seiten von 60 lx.

Vor den Versuchen wurden die Tiere in ihrem Heimkäfig eine Minute im Versuchsraum platziert, um sich akklimatisieren zu können. Anschließend wurden die Tiere einzeln in das OF gesetzt. Hierbei wurde strikt darauf geachtet, dass das Einsetzen bei jedem Tier mit derselben Blickrichtung geschah. In der Folge wurden die Tiere für 10 Minuten beobachtet. Die entscheidenden Parameter die protokolliert wurden, waren die gelaufene Gesamtstrecke, die mittlere Laufgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen, sowie die Anzahl und die Dauer des Putzens und Aufrichtens.

Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze (EPM, erhöhtes plusförmiges Labyrinth) war aus schwarzem PVC gefertigt, 83 cm hoch und bestand aus zwei offenen und zwei geschlos-

senen Armen, die in Form eines „Pluszeichens“ angeordnet waren. Alle vier Arme wiesen Maße von 116x16 cm auf. Die sich gegenüber liegenden geschlossenen Arme waren zusätzlich von einer 32 cm hohen Seitenwand umgeben. Das Zentrum hatte eine Größe von 14x14 cm. Durch indirekt angebrachte Lampen wurde in den geschlossenen Armen eine Lichtintensität von 10 lx und in den offenen Armen eine Lichtstärke von 20 lx erreicht.

Zu Beginn des Versuchs wurde jede Ratte so in den Kreuzungsbereich der Arme gesetzt, dass ihre Blickrichtung stets in denselben offenen Arm ging. Der eigentliche Verhaltenstestdurchlauf dauerte fünf Minuten. Im Anschluss wurde jedes Tier zurück in seinen Heimatkäfig gesetzt. Die Parameter, die im Rahmen der EPM-Versuche von Bedeutung sind, betreffen die gelaufene Gesamtstrecke, die mittlere Laufgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den geschlossenen und in den offenen Armen, die Zahl der Wechsel in die offenen Arme, sowie die Anzahl und die Dauer der *head-dips* (herunterschauen von den offenen Armen).

Black-and-White-Box

Die Black-and-White-Box (BWB, Hell-Dunkel-Kammer) bestand aus einem schwarzen 40x21 cm und einem weißen 40x40 cm Kompartiment, die über einen Durchgang von 10x10 cm miteinander verbunden waren. Sowohl die Oberseite der Box, als auch die des Durchganges war offen. Durch indirektes Licht wurden in der schwarzen Kammer 40 lx und in der weißen Kammer 50 lx erreicht. Zu Testbeginn wurden die Tiere in die weiße Box gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Kopf des Tieres auf die Wand in der gegenüberliegenden schwarzen Hälfte gerichtet war. In den folgenden fünf Minuten wurden nun die Latenzzeit bis zum Übertritt in die schwarze Kammer, die Aufenthaltsdauer in den beiden Kompartimenten, sowie die Anzahl der Übertritte in die weiße Kammer gemessen.

Morris-Water-Maze

Das Becken für den MWM-Versuch hatte einen Durchmesser von 1,45 m und eine Höhe von 60 cm. Die Wasser hatte eine Temperatur zwischen 19-21 °C und wurde bis zu einer Höhe von 25 cm in das Becken eingefüllt. Nach jedem Tier wurden die Fäkalien aus dem Wasser entfernt. Zudem wurde bei einem starken Verschmutzungsgrad das Wasser komplett ausgetauscht. Die Beleuchtungsstärke über dem Becken betrug 60 lx.

Als externe Hinweise dienten ein gestreiftes Rechteck (29x29 cm), ein Kreis (Durchmesser 27 cm) und ein Dreieck (21x40 cm) aus weißem Papier, die an je einer Seite der schwarzen Stoffwände befestigt waren. Die vierte Seite blieb ohne Hinweis.

Das Becken wurde in vier Quadranten eingeteilt, die an der äußeren Bassinwand durch Kleber markiert waren. Der Standort der Plattform (Höhe 23 cm) im Becken wurde ebenfalls markiert.

Der Versuch begann am Tag 0 mit dem Habitationsdurchgang. Dabei wurden die Tiere der Reihe nach durch alle Quadranten, beginnend im ersten Quadranten, ins Wasser gelassen. Einsetzpunkt war stets der gedachte Mittelpunkt des jeweiligen Quadranten, wobei der Kopf des Tieres in Richtung Beckenwand zeigte. Jeder der vier Durchgänge dauerte 60 Sekunden. Die Habitationsdurchgänge wurden ohne die Plattform durchgeführt, sodass diese erste Phase ausschließlich der Akklimatisierung und dem ersten Kennenlernen der Tiere mit dem Versuchsablauf diente. Von Tag 1 an begann die Akquisitionsphase, die insgesamt sechs Tage andauerte. Der Ablauf blieb stets gleich und es war nun Aufgabe der Tiere, die Plattform binnen 60 Sekunden zu finden. Geling dies einem Tier nicht innerhalb des vorgegebenen Zeitraumes, so wurde es nach Ablauf der Zeit für 10 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Als Parameter zur Bewertung des Verhaltens im MWM wurden die Schwimmstrecke, die mittlere Schwimmgeschwindigkeit, die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform und die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Quadranten gemessen. Direkt am Anschluss an den letzten Akquisitionsdurchgang fand die Spatial Probe (Extinktionsdurchgang) statt. Hierzu wurde die Plattform wieder entfernt, ansonsten blieb der Ablauf der Selbe. Als Parameter dienten nun neben der Geschwindigkeit, der Strecke und dem Aufenthalt in den Quadranten, die Latenzzeit bis zum Erreichen der ehemaligen Position der Plattform, die Aufenthaltsdauer dort, sowie die Anzahl der Kreuzungen.

Nach jedem Durchgang wurden die Ratten mit dem Handtuch abgetrocknet und unter eine Wärmelampe (Kerbl, Typ S-29-04, Rotlichtbirne 150 Watt) gesetzt.

4.7 Histologische Gewebeaufbereitung

Perfusion

Zur Gewinnung des Gehirngewebes wurde die Methode der transkardialen Perfusionsfixierung angewendet. Das Prinzip hierbei ist die natürlichen Gefäße des Körpers als Leitungssystem zu gebrauchen, um eine rasche Verteilung des Formalins in alle

Gewebe zu ermöglichen. Dafür wurden die Tiere mit 500 mg/kg Chloralhydrat i.p. narkotisiert. Anschließend wurde vom linken Herzventrikel aus eine Knopfkanüle in die Aorta geschoben und das rechte Herzohr aufgeschnitten, um so einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösung zu schaffen. Zur Ausspülung der Blutbahnen wurde eine 0,01M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH-Wert 7,6) verwendet, bevor das eigentliche Fixans eingesetzt wurde. Dabei handelte es sich um ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd in 0,2M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) mit einer Temperatur von 4°C. Nachdem das Tier 15-20 Minuten mit dem Fixans durchgespült wurde fand die Entnahme des Gehirns statt. Es wurde für weitere 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd aufbewahrt bevor es in eine 30%ige Saccharose-Lösung in 0,1M Phosphatpuffer überführt wurde. In dieser Lösung verblieben die Gehirne für mindestens drei Tage, um einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten.

Herstellung der Gefrierschnitte

Die Gehirnschnitte wurden an einem Kryostaten (Frigocut 2800, Reichert Jung, Wetzlar) angefertigt. Dazu wurden die perfusionsfixierten Gehirne aufgefroren, 40 µm dick geschnitten und in 0,1M Phosphatpuffer aufgefangen. Es wurden sechs Serien angefertigt, sodass die Schnitte innerhalb einer Serie einen Abstand von 240 µm hatten. Anschließend wurden die Schnitte in Gefriermedium überführt und 24 Stunden bei -20°C gelagert, bevor sie bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren wurden. Die Objekt- und Messertemperatur lag während dem Schneiden bei etwa -18°C. Das zu schneidende Areal befand sich zwischen ca. -0,6 mm bis 6 mm relativ zu Bregma.

4.8 Immunhistochemische Färbemethoden

Die immunhistochemischen Färbungen dienen dazu verschiedene anfallsinduzierte Veränderungen auf neuronaler Ebene darzustellen. Dazu gehören neuroprotektive, neurodegenerative und neuroinflammatorische Prozesse, die in unterschiedlichen Gehirnregionen betrachtet wurden.

Nissl-Färbung

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen wurde eine Gehirnserie jeden Tieres mit der Nissl-Methode gefärbt. Dazu wurde der Farbstoff Thionin verwendet. Dieser eignet sich besonders zur Darstellung der Somata von Neuronen, da er selektiv die Nisslschollen (Stapel endoplasmatischen Retikulums) färbt. Im Vergleich zu Neuronen besitzen Gliazellen keine Nisslschollen, sodass eine klare Differenzierung der beiden Zelltypen stattfinden kann.

Immunhistochemische Nachweismethoden

Standardprotokoll DCX und ED1

Sämtliche immunhistochemische Färbungen wurden nach dem folgendem Standardprotokoll im „free-floating Verfahren“ durchgeführt. Zu Beginn wurden die Schnitte in 0,05M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung gewaschen (TBS; pH-Wert 7,6). Da es durch die Fixierung mit Paraformaldehyd zur Bildung von vernetzenden Aldehyd- oder Paraformgruppen und damit zur schlechteren Anfärbung der Antigene kommen kann, fand im nächsten Schritt eine Antigen-Demaskierung statt. Dazu wurden die Schnitte für 30 min bei 80°C in Natrium-Citratpuffer (pH-Wert 9) verbracht. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde dann mittels 0,5 %igem H₂O₂ die endogene Peroxidaseaktivität zerstört. Die anschließend folgende 60-minütige Inkubation der Schnitte in einer Blocklösung (TBS, bovines Albuminserum, 20% Triton X-100, Serum der Tierart aus der der sekundäre Antikörper stammt) diente der Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Direkt nach diesem Blocking-Schritt wurden die Schnitte für 12 Stunden bei 4°C in das primäre Antiserum verbracht. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein weiteres Mal eine sorgfältige Spülung mit TBS bevor die 60-minütige Inkubation mit dem biotinmarkierten sekundären Antikörper stattfand. Ungebundene sekundäre Antikörper wurden anschließend durch wiederholtes Waschen mit TBS entfernt. Abschließend erfolgte eine 60-minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase, die die Inkubation abschloss. Ein erneutes Spülen mit TBS entfernte die überschüssige Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Die Sichtbarmachung der Antikörperkonjugate erfolgte mittels einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Dazu wurden die Schnitte für 15 min in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung (4 ml Tris-Nickel + 1 mg DAB + 1 µl H₂O₂ pro Gehirn) gegeben und im Anschluss mehrmalig mit TBS gewaschen. Nun konnten die Schnitte in anterior-posteriorer Reihenfolge auf entfettete Objektträger aufgezogen, getrocknet,

dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 5 dargestellt.

Standardprotokoll BrdU/NeuN

Bei der BrdU/NeuN Färbung wurden die Schnitte nach dem ersten Waschgang bei 65°C für zwei Stunden in eine Formamid/SSC Lösung verbracht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden sie einmalig mit SSC gewaschen, bevor sich bei 37°C eine Behandlung für 30 min in 2N HCl anschloss. Nachfolgend wurden die Schnitte in 0,1M Borsäure (pH 8,5) verbracht und im Anschluss daran wiederum mit TBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten nun mit Ausnahme der Diaminobenzidin-Reaktionslösung wie oben beschrieben. Es wurde darauf geachtet, dass alle Vorgänge nach der Anwendung des sekundären Antikörpers im Dunkeln stattfanden, sodass die fluoreszierenden Farbstoffe nicht ausbleichen.

primäre Antikörper	Hersteller	Konzentration	sekundärer Antikörper	Hersteller	Konzentration
Monoklonaler Maus-anti-CD 68	AbD Serotec	1:300	polyklonaler biotinylierter Hase-anti-Maus	Dako	1:500
Polyklonaler Ziege-anti-Doublecortin	Santa Cruz	1:300	polyklonaler biotinylierter-Esel-anti-Ziege	Jackson Immuno Research	1:500
Monoklonaler Ratte-anti BrdU, monoklonaler Maus-anti-NeuN	AbD Serotec, Millipore	1:30 1:500	Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte, biotinylierter Esel-anti-Maus	Jackson Immuno Research	1:1000 1:500

Tab. 5: Übersicht über die bei den immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten primären und sekundären Antikörper

4.9 Auswertung und Statistik

Auswertungen

Die immunhistochemischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogenen Schnittebenen waren nach (PAXINOS u. WATSON 2005) definiert.

Bestimmung der Anzahl der BrdU/NeuN doppelmarkierten fluoreszierenden Zellen

Das Fluoreszenzsignal der doppelmarkierten Zellen wurde mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss GmbH, Jena) bestimmt. Dafür wurden von jedem Tier pro Gehirnhälfte jeweils die Schnittebenen -2,1 mm, -3,3 mm und -4,8 mm relativ zu Bregma ausgewertet. Die Zellen wurden in einer Vergrößerung x24 in der gesamten Körnerzellschicht des Gyrus dentatus gezählt. Separat dazu wurden die doppelmarkierten Zellen im Hilus der hippocampalen Formation gezählt. Dies erfolgte nach demselben Prinzip und mit denselben Schnitten. Der Hilus war dabei definiert als das Areal zwischen der inneren Grenze der Körnerzellschicht und zwei Linien, die das distale Ende der Körnerzellschicht und das proximale Ende der CA_{3c}-Region verbinden (GORTER et al. 2001).

Bestimmung der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen und persistierender basaler Dendriten mit der „optical fractionator“ Methode

Die Quantifizierung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen und persistierender basaler Dendriten erfolgte mit Hilfe der computergestützten Bildanalysesoftware StereoInvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Das dafür benötigte System bestand aus einem Leica DMLB-Mikroskop (Leica, Bensheim) mit einer Plan-Neofluar Linse (Leica, Bensheim), einer digitalen Farbkamera (single chip charge coupled device, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64-er Rechenprozessor. Die Zählung der Zellen erfolgte dabei stereologisch mit der sogenannten „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Mit Hilfe der Stereologie können numerische Daten über dreidimensionale geometrische Eigenschaften ermittelt werden. Dies erfolgt über das Volumen, das Oberflächenareal, die Anzahl der Zellen und der Länge von zweidimensionalen geschnittenen Ebenen (STERIO 1984; GUNDERSEN et al. 1988). So ist diese Zählmethode dazu geeignet, die absolute Zahl an neuronalen Vorläuferzellen oder persistierenden basalen Dendriten in verschiedenen Gehirnbereichen abzuschätzen.

Das Ergebnis ist dabei unbeeinflusst von der Gehirngröße, Gehirnform und Orientierung oder einer eventuell auftretenden Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes. Bei der „optical fractionator“ Methode werden aus der Gesamtheit der Zellen Proben genommen und deren Zellzahl dann exemplarisch gezählt. Das gezählte Ergebnis wird dann auf das gesamte Areal hochgerechnet. Die Besonderheit dabei ist, dass die zu zählende dreidimensionale Probe eine Aussage über die Zellzahl pro Volumeneinheit erlaubt.

Als „optical disector“ wird die nach festgelegten Regeln quantifizierte dreidimensionale Probe bezeichnet (Abb. 5). Die Auszählung der Zellzahl erfolgt dabei nach dem optimierten und effizienten „optical fractionator“ Zählschema der Ratte (WEST et al. 1991). So wurden pro Tier und Gehirnseite je sechs Schnitte ausgewertet. Damit wurde bei der Quantifizierung der Zellzahl ein möglichst großes Areal des relevanten Gehirngbietes miteinbezogen.

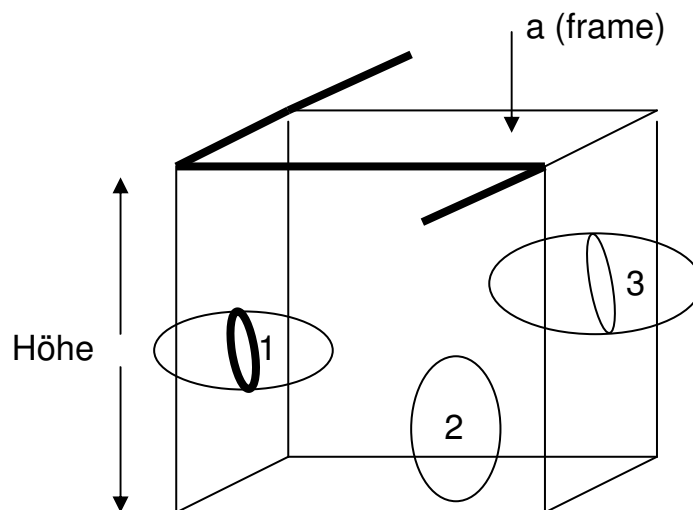


Abb. 5: Schematische Abbildung eines „optical disectors“. Die dicken schwarzen Linien (= „exclusion lines“), die die Fläche a (frame) begrenzen, schließen ein Zählen von Zellen bei Berührung aus. Zelle 1 wird damit nicht gezählt, da sie von einer „exclusion line“ durchschnitten wird. Zelle 2 liegt ausschließlich im Kubus und wird gezählt. Zelle 3 liegt nicht vollständig im „Frame“, wird jedoch gezählt, da sie nicht von der „exclusion line“ berührt wird. Modifiziert nach (VOLLMANN-HONSDORF 2001).

Score-System der Neurodegeneration und Mikroglia im Hippocampus

Neurodegenerative Veränderungen und das Auftreten von Mikroglia im Bereich des Cornu Ammonis (CA, Ammonshorn) wurden mit Hilfe eines Score-Systems erfasst (BRANDT et al. 2003b; BRANDT et al. 2006). Dabei wurden die CA₁- , CA_{3a}- und die

CA_{3c}-Region, sowie der parietale und der piriforme Cortex jeweils getrennt voneinander bewertet. Beim Scoring der Mikroglia wurde zusätzlich der Thalamus betrachtet. Das dabei verwendete Score-System ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 6).

Score-Level	Neurodegeneration	Auftreten von Mikroglia
0	keine offensichtlichen Läsionen	kein offensichtliches Auftreten von Mikroglia
1	schwaches Auftreten von Läsionen (<20% der Neuronen)	schwache Mikrogliaaktivierung
2	Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen	mäßige Mikrogliaaktivierung
3	Läsionen mit Einbezug von >50% der Neuronen	hohe Mikrogliaaktivierung

Tab. 6: Überblick über das Score-System, das für die Bewertung der Neurodegeneration und dem Auftreten von Mikroglia in den CA-Regionen des Hippocampus eingesetzt wurde.

Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 5 für Windows durchgeführt. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Mittelwertsfehler, Standardfehler) bzw. bei der Frequenz der Anfälle als Median \pm SEM. Zunächst wurden die Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung nach Gauß überprüft. Lagen zwei Stichproben mit parametrischen unverbundenen Daten vor, so wurde der student's t-test angewendet. Beim Vorliegen von unparametrischen unverbundenen Daten (z.B. über das Score-System ermittelte Daten) wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Stichproben wurde mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gerechnet. Bei nicht parametrischen Daten wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse angewendet. Für den Vergleich zweier relativer Häufigkeiten (z.B. ob die Tiere in der Überwachung Anfälle zeigten) wurde der Fisher's Exact Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau war auf $p < 0,05$ festgelegt worden. Prinzipiell wurden alle statistischen Berechnungen zweiseitig durchgeführt. Einseitig getestet wurde nur, wenn die Daten basierend auf Literaturangaben oder eigener Daten nur in eine Richtung erwartet wurden.

4.10 Versuchsdesign

Effekte durch das EPO-mimetische Peptid pHBSP und EPO im elektrischen SE-Modell

Die Aufteilung der Tiere (n= 78) erfolgte in vier Gruppen. Es wurden je 20 Tiere in die SE/pHBSP-, SE/“scrambled Peptid“- und die SE/EPO-Gruppe eingeteilt. Des Weiteren gab es eine Gruppe mit Kontrolltieren (13 Tiere). Fünf Tiere verstarben vor Beginn der Versuche. Die Kontrolltiere wurden analog den SE-Tieren incl. der Elektrodenimplantation behandelt, sie wurden jedoch nicht dauerstimuliert. Dennoch wurde ihnen identisch zu den SE-Tieren eine Diazepam-Injektion verabreicht. Anschließend wurden sie nach demselben Applikationsschema wie die anderen Ratten behandelt. Am Tag der 25-minütigen Dauerstimulation der basolateralen Amygdala (Tag 0) erfolgte unmittelbar im Anschluss an die erste Diazepam-Applikation einmalig eine i.v. Injektion der Substanzen. Anschließend erhielten die Tiere eine s.c. Applikation. Am Tag 1 und Tag 3 wurde jeweils eine weitere s.c. Injektion verabreicht. Von Tag 5 ab erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 2x täglich eine i.p. Applikation des Proliferationsmarkers BrdU. Die Dosierungen der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 7 dargestellt. Nach einer Rekonvaleszenzphase von 10 Wochen begann die Videoüberwachung, unmittelbar gefolgt von den Verhaltenstests.

Substanz	Dosierung i.v.	Dosierung s.c.	Dosierung i.p.
pHBSP	1,5 nmol/kg	10 mg/kg in 3 ml/kg PBS	
“scrambled” pHBSP	1,5 nmol/kg	10 mg/kg in 3 ml/kg PBS	
EPO	1,1 IE/kg	5000 IE/kg	
BrdU			50 mg/kg in 3 ml/kg NaCl

Tab. 7: Übersicht über die Substanzen und ihre Dosierung

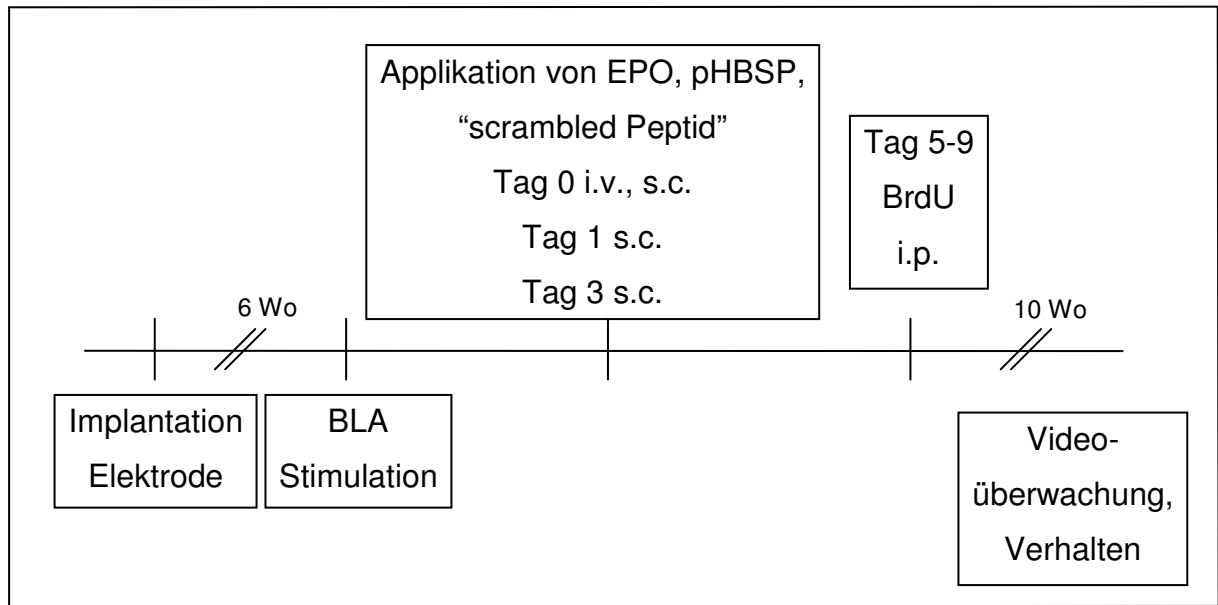


Abb. 6: Übersicht über das Versuchsdesign und den zeitlichen Verlauf

Effekte durch das EPO-mimetische Peptid pHBSP und EPO auf epilepsieassoziierte Störungen

Um den Einfluss des mimetischen Peptids pHBSP auf epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen zu untersuchen, begannen eine Woche nach Ende der Videoüberwachung die Verhaltenstests. Der erste Versuch startete an Tag 1 mit dem OF, gefolgt vom EPM an Tag 2 und der BWB an Tag 3. Nach einer zweiwöchigen Pause begann an Tag 18 der Test im MWM, der bis einschließlich Tag 24 andauerte.

Die Versuche fanden stets am Morgen statt. Im Anschluss an die Testphase wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert.

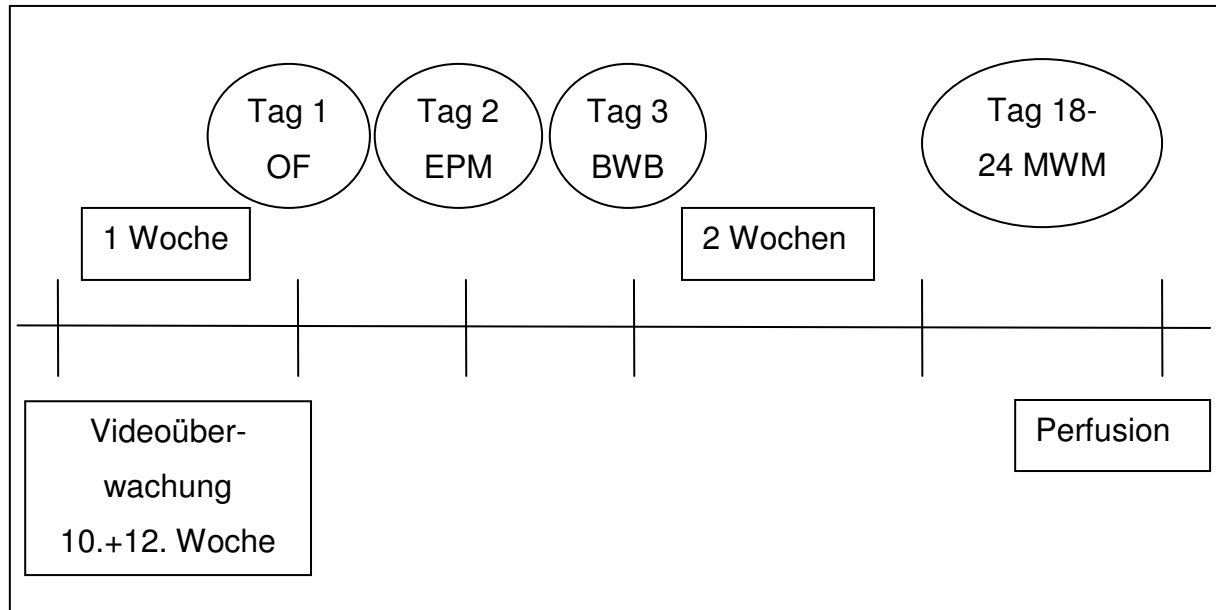


Abb. 7: Übersicht über das Versuchsdesign und den zeitlichen Verlauf

5 ERGEBNISSE

Effekte durch das Erythropoetin-mimetische Peptid pHBSP und Erythropoetin im elektrischen SE-Modell

5.1 Elektrisches SE-Modell

Zur Beurteilung der Effekte von dem EPO-mimetischen Peptid pHBSP und Erythropoetin im elektrischen SE-Modell wurde bei 73 weiblichen Sprague-Dawley Ratten eine Stimulations- bzw. Ableitungselektrode in die rechte BLA chronisch implantiert. Nach einer Rekonvaleszenzzeit von sechs Wochen wurde bei 60 Tieren mittels einer Dauerstimulation der rechten BLA ein sich selbst erhaltender SE (SSSE) induziert. Die Dauerstimulation wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 4.1.2 durchgeführt und nach einem Zeitraum von vier Stunden mit Diazepam abgebrochen. Je nach Bedarf wurde die Diazepamapplikation wiederholt, sodass der SSSE vollständig beendet war. Alle Tiere hatten während der Dauerstimulation einen SSSE ausgebildet. Dabei manifestierte sich der SSSE bei einem Tier aus der EPO-Gruppe als ausschließlich fokal (Typ I), sowie bei vier weiteren Tieren aus der EPO-Gruppe, zwei Tieren aus der pHBSP-Gruppe und einem Tier aus der „scrambled Peptid“-Gruppe als fokaler SSSE mit generalisierten Anfällen (Typ II). Alle anderen Ratten bildeten einen generalisierten SE (Typ III) aus. Im Anschluss an die Diazepamapplikation, sowie nach 24 und 72 Stunden post stimulationem wurde den Tieren das mimetische Peptid pHBSP bzw. ein rekombinantes humanes Erythropoetin und als Kontrolle eine „scrambled“ Version des pHBSP einmalig i.v., sowie zusätzlich s.c. und an Tag 1 und 3 ausschließlich s.c. appliziert.

Von den pro Substanzgruppe 20 stimulierten Tieren verstarben während der Stimulation in der EPO-Gruppe und in der scrambled Peptid-Gruppe jeweils zwei Tiere und in der pHBSP-Gruppe drei Tiere. In den ersten Tagen post stimulationem verstarben aus der EPO-Gruppe vier weitere Tiere. In der pHBSP-Gruppe starben drei Tiere und in der „scrambled“-pHBSP-Gruppe schieden sechs weitere Tiere durch Exitus aus. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse in einer Übersicht dargestellt.

SE-BLA-Modell			
Anfallstyp des SSSE	EPO (n=20)	pHBSP (n=20)	“scrambled” pHBSP (n=20)
fokaler SSSE (Typ I)	n=1	n=0	n=0
fokaler SSSE mit generalisierten Anfällen (Typ II)	n=4	n=2	n=1
generalisierter SSSE (Typ III)	n=15	n=18	n=19
Exitus intra und post stimulationem/ Verluste in %	n=6/ 30%	n=6/ 30%	n=8/ 40%

Tab. 8: Übersicht über die Anzahl der Ratten mit den jeweiligen SSSE-Typen und den Verlusten durch Exitus

Überwachung auf spontane epileptische Anfälle

In Folge des induzierten SSSE entwickelte die Mehrheit der Ratten nach einer mehrwöchigen Latenzphase spontane epileptische Anfälle. Dies resultierte aus der Entwicklung eines hyperexzitablen epileptischen Netzwerkes im Gehirn (Kap. 2.2). Um den möglichen Einfluss von EPO und pHBSP auf den Prozess der Epileptogenese zu überprüfen, wurden die Tiere zehn Wochen nach Beendigung der Dauerstimulation systematisch auf Anfälle überwacht (Kap. 4.1.5). Die Erfassung der Anfälle erfolgte per Video- und EEG-Überwachung. In zwei Beobachtungsdurchgängen wurden anfangs 14 und anschließend 16 Tiere überwacht. Des Weiteren wurden neun Sham/“scrambled Peptid“ Tiere analog den SE-Tieren in ein Aquarium verbracht, jedoch weder EEG- noch videoobserviert. In der folgenden Übersicht (Tab. 9) sind nun die Anzahl der Tiere pro Behandlungsgruppe sowie die Zahl der Tiere dargestellt, die während der Überwachungsphase Anfälle zeigten.

Übersicht Überwachung				
	SE/”scrambled Peptid”	SE/EPO	SE/pHBSP	Sham/”scrambled Peptid”
Anzahl Tiere	n=10	n=10	n=10	n=9
Anfälle vs.keine Anfälle	5/5	6/4	6/4	0/9

Tab. 9: Übersicht über die Anzahl der Tiere pro Gruppe, sowie die Tiere, die während der Überwachung Anfälle zeigten

Mit Hilfe der EEG- und Videoaufnahmen konnte die Frequenz und die Schwere der einzelnen Anfälle gemäß Kapitel 4.1.3 ermittelt werden. Die Ergebnisse der generalisierten Anfälle sind in der Tabelle 10 dargestellt.

	Typ IV	Typ V	Typ VI
”scrambled” pHBSP-Gruppe	3	13	1
EPO-Gruppe	6	62	8
pHBSP-Gruppe	4	96	8

Tab. 10: Übersicht über die Frequenz und die Schwere der Anfälle während der Überwachung

Bei der Erfassung der Anfallsfrequenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb 8). Jedoch kam es sowohl in der pHBSP- als auch in der EPO- behandelten Gruppe zum Auftreten zweier „Ausreißer“. Diese Tiere zeigten eine extrem hohe Anfallsfrequenz.

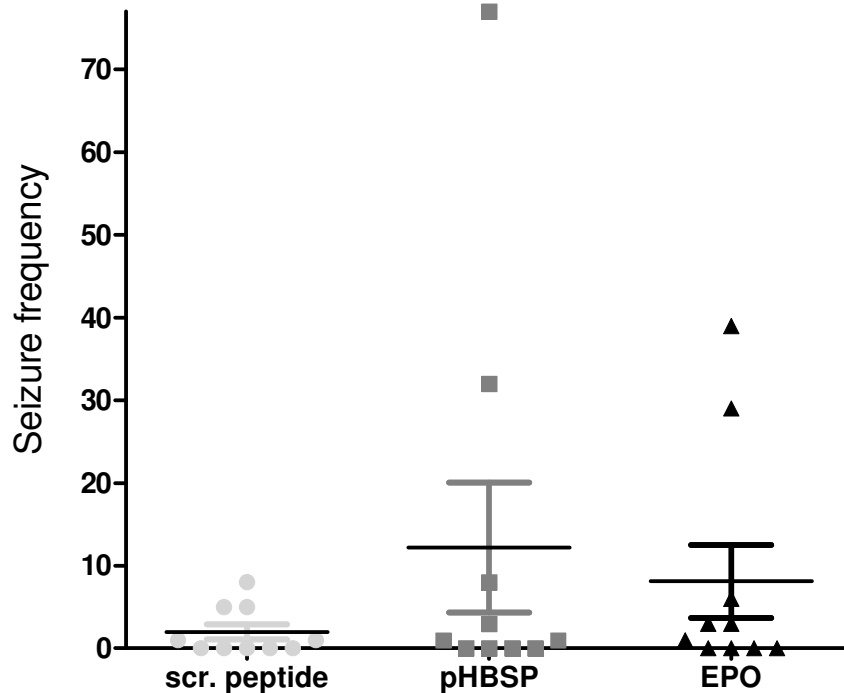


Abb. 8: Frequenz der Anfälle während der Überwachungsphase in den einzelnen Tiergruppen (Median \pm SEM). Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (alle Gruppen n=10).

Ein Vergleich der Anfallsdauer zwischen den unterschiedlich behandelten Tiergruppen ergab einen Unterschied zwischen den „scrambled Peptid“ und den pHBSP-behandelten Tieren im Gegensatz zu der EPO-Gruppe. So wiesen die EPO-Tiere eine signifikant kürzere Anfallszeit auf (Abb 9).

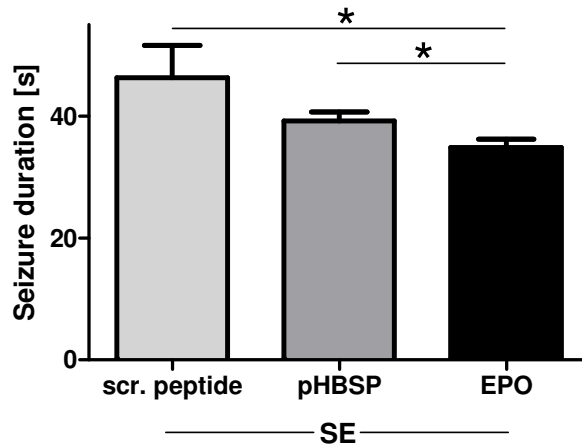


Abb. 9: Dauer der spontanen epileptischen Anfälle während der Überwachungsphase (Mittelwert \pm SEM). Die EPO behandelten Tiere wiesen im Vergleich zur „scrambled Peptid“- und pHBSP behandelten Gruppe eine signifikant kürzere Anfallsdauer auf (alle Gruppen $n=10$).

5.2 Verhaltensuntersuchungen

Im Anschluss an die Überwachungsphase begannen die verhaltensphysiologischen Untersuchungen (Kap. 2.4). Die Ergebnisse werden im Folgenden in der Reihenfolge der angewandten Paradigmen aufgeführt.

Open Field

Das Open Field (Offenfeld, OF) wird zur Beurteilung des Spontanverhaltens von Nagern eingesetzt (Kap. 2.4.2). Dabei zu bewertende Parameter sind das Bewegungs- und Explorationsverhalten der Tiere. Da Nager die Nähe von Wänden und Ecken bevorzugen (Thigmotaxis) und offene Flächen eher meiden, können entsprechend veränderte Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Bereichen des OF auf eine angstasoziierte Störung hindeuten. Jedoch muss beachtet werden, dass auch gesunde Tiere die zentralen Bereiche aufsuchen. Sie stehen dabei im Konflikt vor der Aversion der unbekanntes Fläche und der gleichzeitig vorhandenen Neugierde Neues zu erkunden. Zwischen den Tiergruppen traten Unterschiede in den Lokomotionsparametern „zurück gelegte Strecke“ und der „mittleren Laufgeschwindigkeit“ auf. So legte die Kontrollgruppe im Vergleich zu den SE-Gruppen eine signifikant kürzere Distanz mit einer signifikant langsameren mittleren Geschwindigkeit zurück. Des Weiteren gab es innerhalb der SE-Gruppen signifikante Unterschiede, da die pHBSP-behandelten Tiere bei beiden Lokomotionsparametern im Vergleich zu den „scramb-

led Peptid“- und EPO- behandelten Tieren signifikant höhere Werte aufwiesen (Abb. 10).

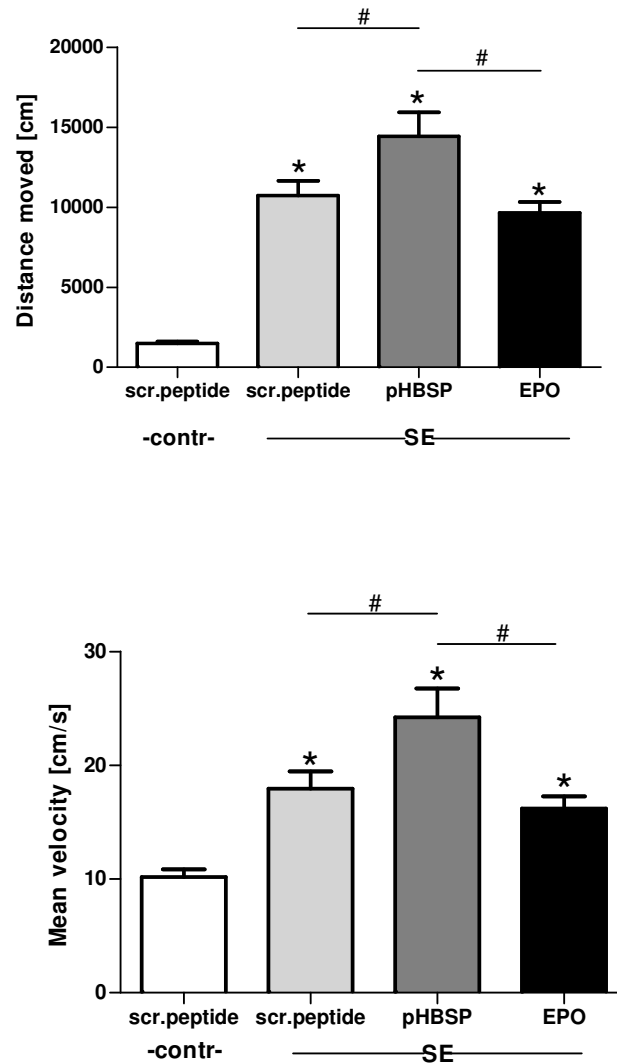


Abb. 10: Übersicht über die zurück gelegte Strecke und die mittlere Laufgeschwindigkeit im OF (Mittelwert \pm SEM): Bei beiden Lokomotionsparametern waren die Werte der SE/Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Des Weiteren gab es signifikante Unterschiede zwischen der SE/pHBSP- sowie der SE/„scrambled Peptid“- und SE/EPO behandelten Gruppe. So zeigte die SE/pHBSP-Gruppe signifikant höhere Werte als die beiden anderen SE-Gruppen (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, pro SE-Gruppe n=10).

Bei der Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Bereichen des Offenfelds waren in der mittleren und äußeren Peripherie keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen vorhanden. Die Aufenthaltsdauer im Zentrum des OF war bei der Kontrollgruppe im

Vergleich zur SE/pHBSP Gruppe signifikant erhöht. Die Latenzzeit bis die Tiere das Zentrum nach Verlassen erneut betraten zeigte keine Unterschiede auf. Ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen den Tiergruppen gab es bei der Frequenz der Durchtritte durch das Zentrum. Auch die Frequenz und Dauer des spontanen Putzverhaltens sowie der Explorationsparameter „*Aufrichten*“ zeigte keine signifikanten Abweichungen.

Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Matze (EPM) ist eines der populärsten Tiermodelle, um angstassoziiertes Verhalten von Nagern zu evaluieren (KORTE u. DE BOER 2003). Der einfache und zugleich effiziente Versuch beruht auf dem Spontanverhalten der Tiere. Grundlage dafür ist der Konflikt der Tiere zwischen der Entscheidung an einem sicheren Ort zu bleiben (den geschlossenen Armen) oder der Motivation nachzugehen die neue Umgebung samt erhöhten offenen Armen zu explorieren (Kap. 2.4.2). Für die Analyse des angstassoziierten Verhaltens ist neben der Beurteilung der Lokomotionsparameter die Aufenthaltsdauer in den Armen der Apparatur, sowie die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme zu betrachten. Des Weiteren sollte die Frequenz und Dauer des Herabschauens von den offenen Armen (*headdips*) erfasst werden. Bei den beiden Lokomotionsparametern „*zurück gelegte Strecke*“ und „*mittlere Laufgeschwindigkeit*“ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der SE/„scrambled Peptid“-, SE/pHBSP- bzw. der SE/EPO-Gruppe. So legten die Tiere aus der Kontrollgruppe eine signifikant kürzere Distanz bei gleichzeitig langsamerer mittlerer Laufgeschwindigkeit zurück (Abb. 11).

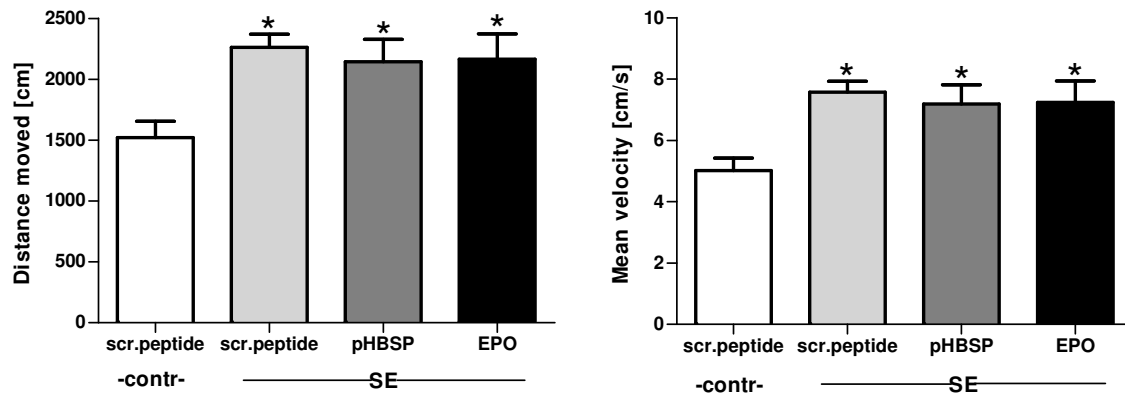


Abb. 11: Zurück gelegte Strecke und mittlere Laufgeschwindigkeit im EPM (Mittelwert \pm SEM). Die Kontrollgruppe legte im Vergleich zu den SE-Gruppen eine signifikant kürzere Distanz bei signifikant langsamerer Laufgeschwindigkeit zurück (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE-Gruppen jeweils n=10).

Die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen zeigte, dass sich die Kontrollgruppe dort im Vergleich zu den drei SE-Gruppen signifikant kürzer aufhielt. Im Umkehrschluss wurde deutlich, dass die Kontrolltiere im Vergleich zur SE/„scrambled Peptid“- sowie der SE/EPO-Gruppe signifikant länger in den geschlossenen Armen verblieben, wohingegen die pHBSP-Gruppe keine Differenzen aufwies (Abb. 12).

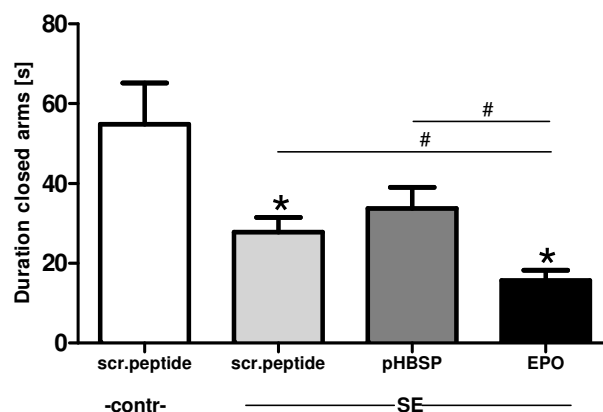


Abb. 12: Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen des EPM (Mittelwert \pm SEM). Die Kontrolltiere sowie die pHBSP-Gruppe halten sich im Vergleich zur „scrambled Peptid“- und der EPO-Gruppe signifikant länger in den geschlossenen Armen auf. Innerhalb der SE-Tiere zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den EPO-Tieren zu den SE/„scrambled Peptid“ und den SE/pHBSP Tieren (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, pro SE-Gruppe n=10).

Bei der Häufigkeit der Eintritte in die offenen Arme zeigte sich, dass die drei SE-Gruppen diese Areale im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant häufiger betreten. Dieses Resultat ergab sich sowohl beim Betreten der zentrumsnahen, als auch der peripheren Bereichen der offenen Arme (Abb. 13).

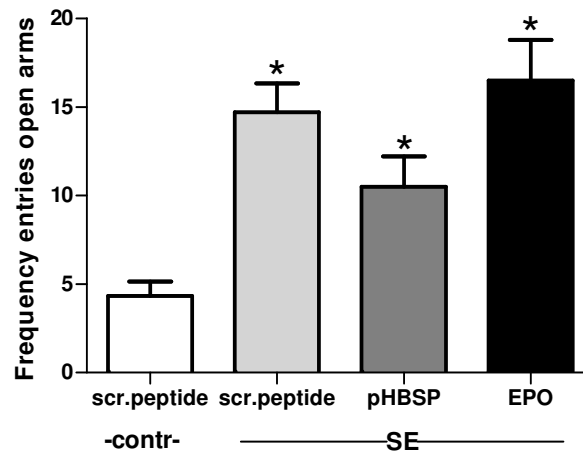


Abb. 13: Frequenz der Eintritte in die offenen Arme (Mittelwert \pm SEM). Die drei SE-Gruppen betreten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant häufiger die offenen Arme (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, pro SE-Gruppe n=10).

Beim Explorationsparameter *Hinabschauen* von den Armen des Labyrinths (*head-dips*) zeigten sich bei dem dafür aufgewendeten Zeitraum signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den EPO-behandelten Tieren. Bei der Anzahl der *headdips* traten signifikante Unterschiede bei den Kontrolltieren im Vergleich zu der SE/„scrambled Peptid“-, SE/pHBSP- und der SE/EPO behandelten Gruppe auf (Abb. 14).

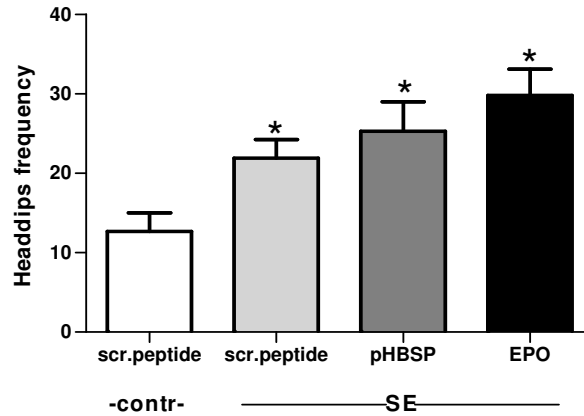


Abb. 14: Anzahl der *headdips* (Mittelwert \pm SEM). Die SE/„scrambled Peptid“-, SE/pHBSP- und SE/EPO Gruppe zeigen eine signifikant höhere Frequenz an *headdips* im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, pro SE-Gruppe n=10).

Black-White-Box (BWB)

Dieser Test wurde erstmals von CRAWLEY und GOODWIN (1980) beschrieben und wird seitdem in vielfältigen Variationen zur Validierung von angstassoziiertem Verhalten eingesetzt. Das Prinzip der BWB basiert auf dem spontanen Explorationsverhalten der Tiere, welches durch milde Stressfaktoren hervorgerufen wird (SANCHEZ 1997).

Die Ratten wurden für fünf Minuten mittig in das weiße Kompartiment eingesetzt (Kap. 2.4.2). Dabei zeigte sich, dass die pHBSP behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant längere Latenzzeit aufwiesen, um erstmalig das schwarze Kompartiment zu betreten (Abb 15).

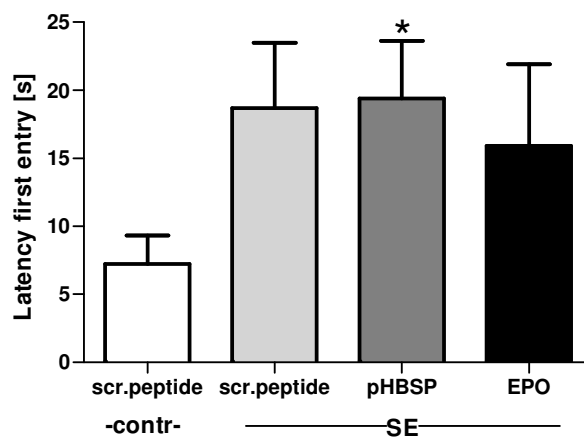


Abb. 15: Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die Black-Box (Mittelwert \pm SEM). Dabei zeigen die pHBSP-behandelten Tiere eine signifikant längere Zeitdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE-Gruppen jeweils n=10).

Bei der Anzahl der Übertritte in die weiße Box traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen auf. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnten den Gesamtzeitraum des Aufenthalts in der weißen Box betreffend, signifikante Differenzen zu den drei SE-Gruppen gezeigt werden (Abb. 16).

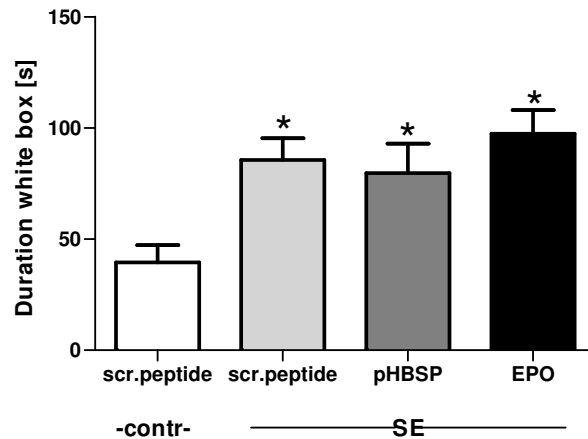


Abb. 16: Aufenthaltsdauer in der White-Box (Mittelwert \pm SEM). Signifikante Unterschiede treten zwischen der Kontrollgruppe und den SE-Gruppen auf (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE-Gruppen jeweils n=10).

Morris-Water-Maze (MWM)

Das MWM ist ein weit verbreiteter Verhaltenstest zur Erfassung des räumlichen Erinnerungs- und Lernvermögens (NUNEZ 2008) (Kap. 2.4.2). Vor der Akquisition wurde ein Habitationsdurchgang durchgeführt, um die Tiere an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen. Danach begann die sechstägige Lernphase, in der die Latenzzeit gemessen wurde, die die Tiere benötigten, um die Plattform aufzusuchen (Abb.17). Dabei wurden die Tiere an je vier verschiedenen Startpunkten in das Wasserbecken eingesetzt. An Tag 1 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei SE-Gruppen. An Tag 2 zeigten nur die SE/EPO- und die SE/„scrambled Peptid“ Gruppen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Am dritten Tag benötigten wieder alle drei SE-Gruppen im Vergleich zu der Sham-Gruppe signifikant länger um die Plattform zu finden. An Tag 4 und 5 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, sowie der SE/EPO- und der SE/„scrambled Peptid“ Gruppe. Am letzten Tag der Lernphase waren die SE/EPO- und die SE/pHBSP Gruppe signifikant langsamer im Vergleich zu der Sham-Gruppe.

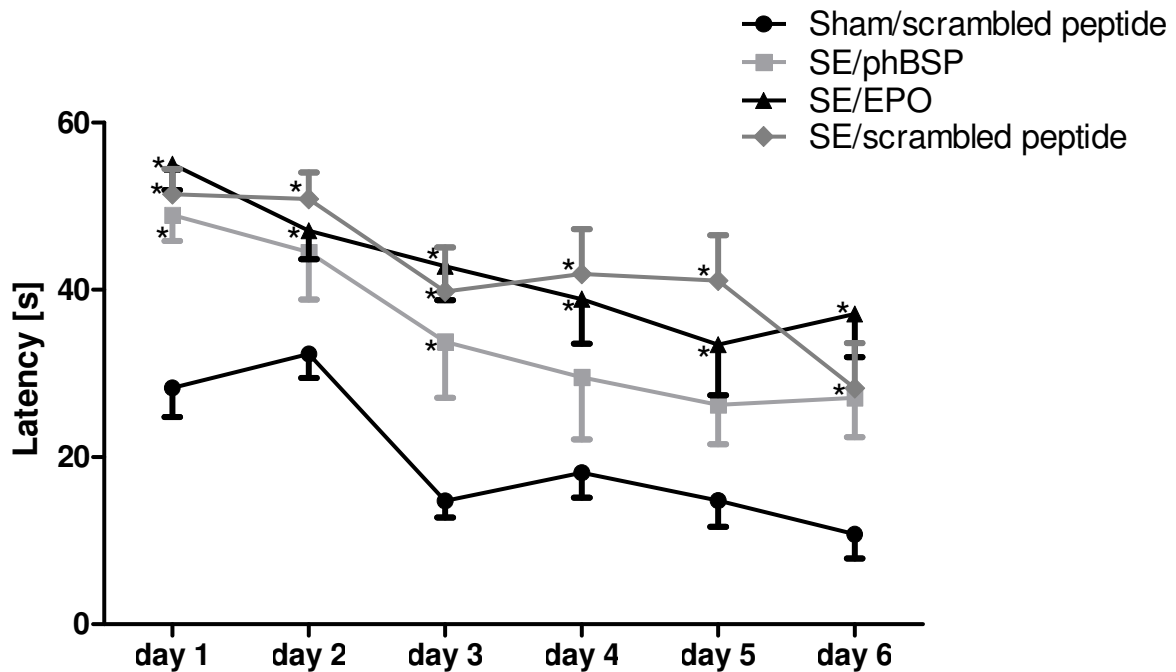


Abb. 17: Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform während der Akquisitionsphase (Mittelwert \pm SEM). Dabei zeigten sich an Tag 1 signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei SE-Gruppen, an Tag 2 zwischen der Kontrollgruppe und der SE/„scrambled Peptid“ und SE/EPO Gruppe, an Tag 3 zwischen der Kontroll- und den SE-Gruppen, an Tag 4 und 5 zwischen der Kontroll- und der SE/EPO- und SE/„scrambled Peptid“ Gruppe und an Tag 6 zwischen der Kontroll- und der SE/EPO und der SE/pHBSP Gruppe (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“, SE/pHBSP $n=9$, SE/EPO und SE/„scrambled Peptid“- $n=10$).

Im Anschluss an die sechstägige Lernphase wurde die Spatial Probe angeschlossen, in welcher die Plattform entfernt wurde und das Erinnerungsvermögen der Tiere an die ehemalige Position getestet wurde. Dabei zeigten sich in der zurück gelegten Strecke signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP Tieren (Abb.18). Bei der mittleren Schwimmgeschwindigkeit wurden Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und den signifikant langsameren SE-Tieren deutlich. Des Weiteren gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der SE/pHBSP und der SE/EPO Gruppe (Abb.18).

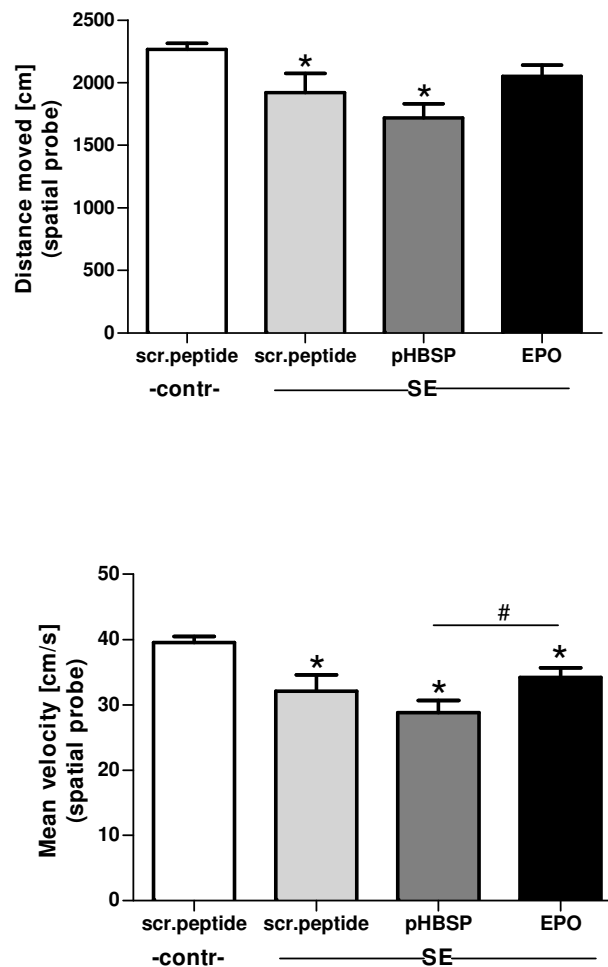


Abb.18: Zurück gelegte Strecke und mittlere Schwimgeschwindigkeit in der Spatial Probe (Mittelwert \pm SEM). Die SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP Tiere schwammen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant kürzere Strecke. Die Kontrollgruppe war im Vergleich zu den SE-Gruppen signifikant schneller. Bei den SE-Tieren waren die pHBSP-Tiere des Weiteren signifikant langsamer als die EPO-Tiere (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“, SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP n=9, SE/EPO n=10).

Die Messung der Latenzzeit bis zum Auffinden der ehemaligen Plattformposition zeigte, dass die SE/EPO Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant mehr Zeit dafür benötigte (Abb. 19).

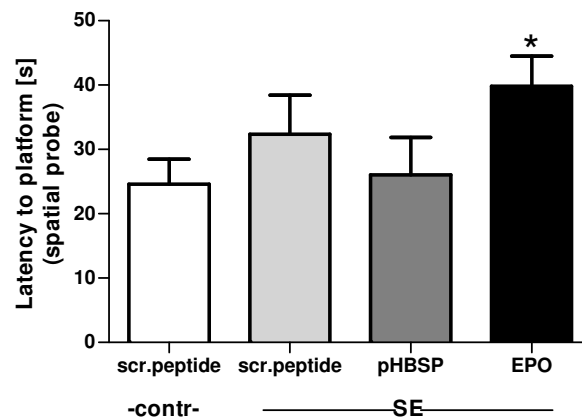


Abb.19: Latenzzeit bis zum Auffinden der ehemaligen Plattformposition in der Spatial Probe (Mittelwert \pm SEM). Die SE/EPO Gruppe benötigte dafür im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant länger (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“, SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP $n=9$, SE/EPO $n=10$).

Bei der Gesamtzeit, die die Tiere im ehemaligen Plattformquadranten verbrachten zeigte sich, dass sich die SE/EPO Tiere dort im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant kürzer aufhielten. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede zwischen der SE/EPO- und der SE/pHBSP Gruppe deutlich (Abb. 20).

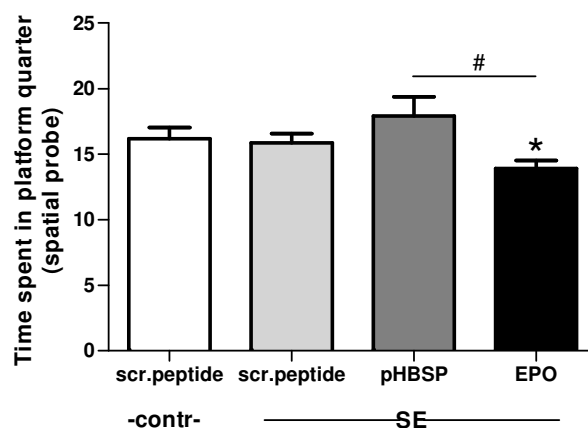


Abb. 20: Dauer des Aufenthalts im ehemaligen Plattformquadranten in der Spatial Probe (Mittelwert \pm SEM). Dabei zeigten die SE/EPO-Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen signifikant kürzeren Aufenthalt. Des Weiteren hielten sich die SE/EPO-Tiere dort im Vergleich zu der SE/pHBSP-Gruppe signifikant kürzer auf (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“, SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP $n=9$, SE/EPO $n=10$).

Die Anzahl der Kreuzungen der ehemaligen Plattformposition in der Spatial Probe zeigten, dass sich die SE/EPO-Tiere dabei signifikant von den Kontrolltieren unterschieden. So kreuzten die SE/EPO-Tiere seltener die vormalige Plattformposition (Abb. 21).

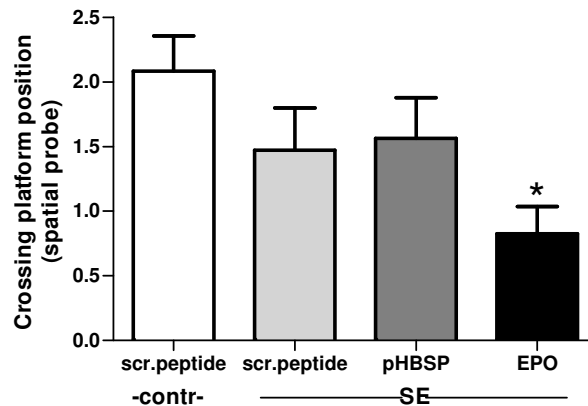


Abb. 21: Anzahl der Kreuzungen der ehemaligen Plattformposition (Mittelwert \pm SEM). Die SE/EPO-Tiere kreuzten dabei im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant seltener die ehemalige Plattformposition (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“, SE/„scrambled Peptid“ und SE/pHBSP $n=9$, SE/EPO $n=10$).

5.3 Histologische Untersuchungen

Zur Beurteilung des Einflusses des mimetischen Peptids pHBSP und von EPO auf hippocampale Veränderungen wurden eine Thioninfärbung, sowie verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zur Quantifizierung der Neurogenese wurde die Thioninfärbung angewandt. So wurde in einem ersten Schritt das Ausmaß der Neurodegeneration in verschiedenen Bereichen des Cornu ammonis untersucht. Dies geschah mit Hilfe eines Score-Systems, dessen Skala von 0 (keine Neurodegeneration) bis 3 (starke Neurodegeneration) reichte (Kap. 4.1.9).

In der CA_{3a}- und der CA_{3c}-Region des Hippocampus, sowie im piriformen Cortex konnte keine SE-assoziierte Neurodegeneration in der „scrambled Peptid“-Gruppe festgestellt werden, sodass hier keine weitere Analyse fortgeführt wurde. In der CA₁-Region und im parietalen Cortex konnte vereinzelt eine schwache SE bedingte Neurodegeneration der SE/„scrambled Peptid“-Tiere gezeigt werden. Ähnliche Resultate wiesen die SE/EPO-Tiere auf, wohingegen bei der SE/pHBSP-Gruppe keine Schädigung festgestellt werden konnte. Insgesamt traten aufgrund der hohen Varianzen je-

doch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den SE-Tieren auf (Abb. 22).

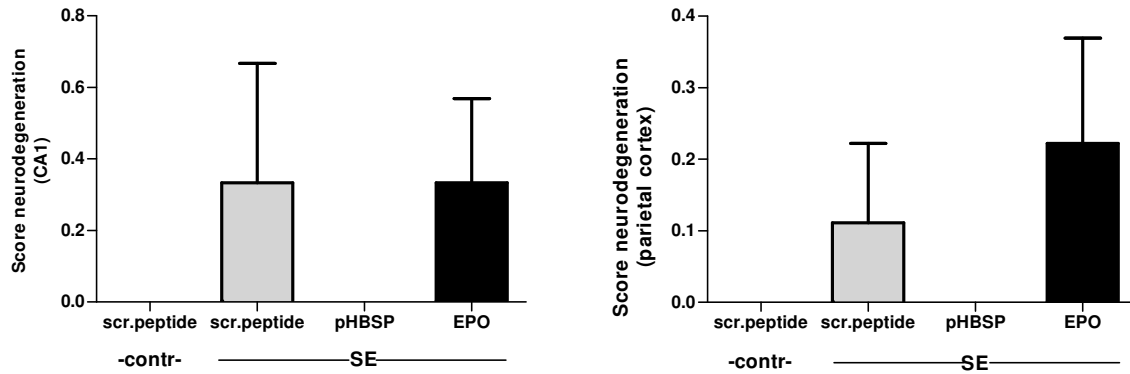


Abb. 22: Erfassung der Neurodegeneration mittels Score-System in der CA₁-Region und dem parietalen Cortex. Zwischen den Gruppen ist kein signifikanter Unterschied deutlich (alle Gruppen n=9).

Um die Anzahl der Vorläuferzellen beurteilen zu können wurde eine Doublecortin-Färbung (DCX) durchgeführt. Beim Doublecortin handelt es sich um ein microtubulin-assoziiertes Protein, welches transient von Vorläuferzellen des Hippocampus und des olfaktorischen Systems exprimiert wird. Basierend auf dieser neuronalen, vorläuferzellenspezifischen Expression des Proteins eignet sich das DCX sehr gut als quantitativer Marker zum Nachweis einer adulten Neurogenese (RAO u. SHETTY 2004). Die DCX-positiven Zellen wurden stereologisch ausgezählt und die persistierenden basalen Dendriten erfasst. 20 Wochen nach dem SE wiesen alle Gruppen eine hohe Anzahl Doublecortin-markierter Zellen in der subgranulären Zone und der Körnerzellschicht auf. Weder der SE, noch die Behandlung mit pHBSP oder EPO zeigten einen signifikanten Langzeiteffekt auf die Anzahl der Doublecortin-exprimierenden neuronalen Vorläuferzellen (Abb. 23). Das Verhältnis der Anzahl Doublecortin-positiver Zellen mit basalen Dendriten/Anzahl der Doublecortin-positiven Zellen war bei den pHBSP- und EPO behandelten SE-Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Des Weiteren wiesen die SE/EPO-Tiere im Vergleich zu den SE/pHBSP-Tieren ein signifikant höheres Verhältnis auf (Abb. 23).

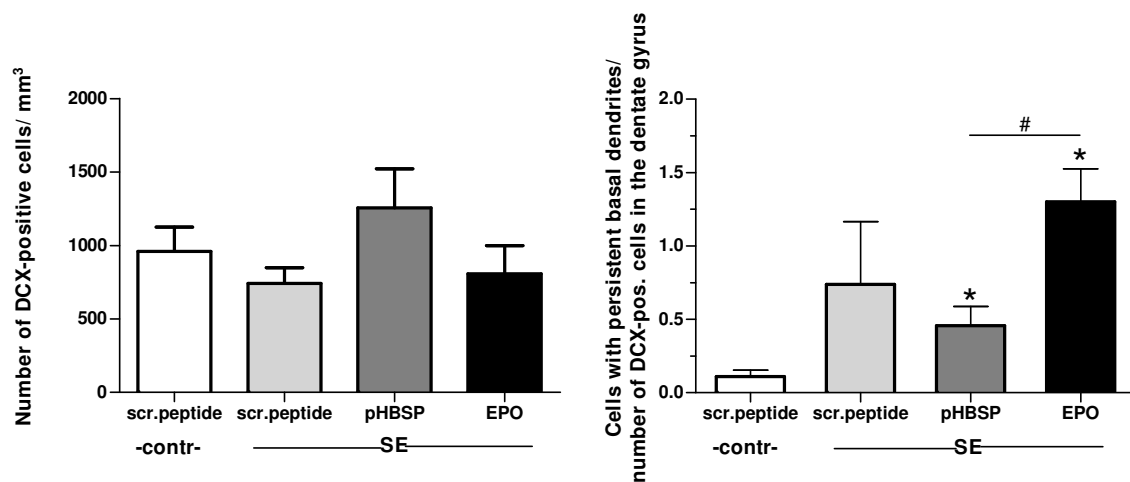
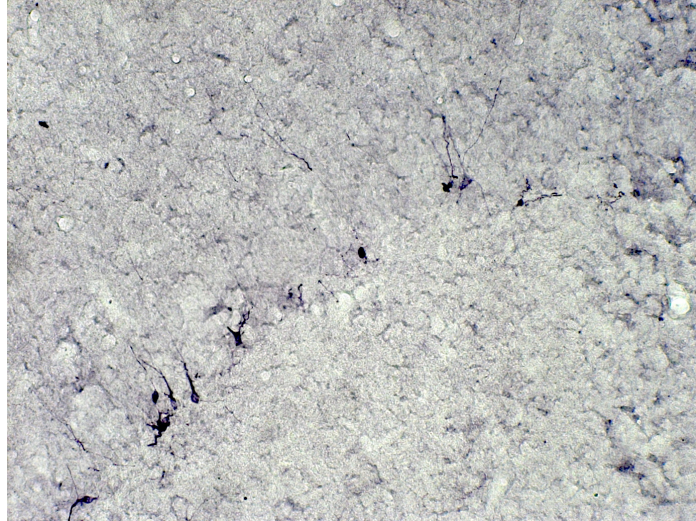


Abb. 23: Anzahl der DCX-positiven Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus und das Verhältnis der Anzahl DCX-positiver Zellen mit basalen Dendriten/ Anzahl der DCX-positiven Zellen (Mittelwert \pm SEM). Bei der Gesamtzahl der DCX-positiven Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Das Verhältnis der Anzahl DCX-positiver Zellen mit basalen Dendriten/ Anzahl der DCX-positiven Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der SE/pHBSP-, SE/EPO- und der Kontrollgruppe, sowie zwischen der SE/pHBSP- und der SE/EPO-Gruppe (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE/„scrambled Peptid“ n=9, SE/pHBSP n=8, SE/EPO n=8).

Die Anzahl der DCX-positiven Zellen mit basalen Dendriten war bei den SE/EPO-Tieren (Abb. 24b) im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 24a und 25).

a



b

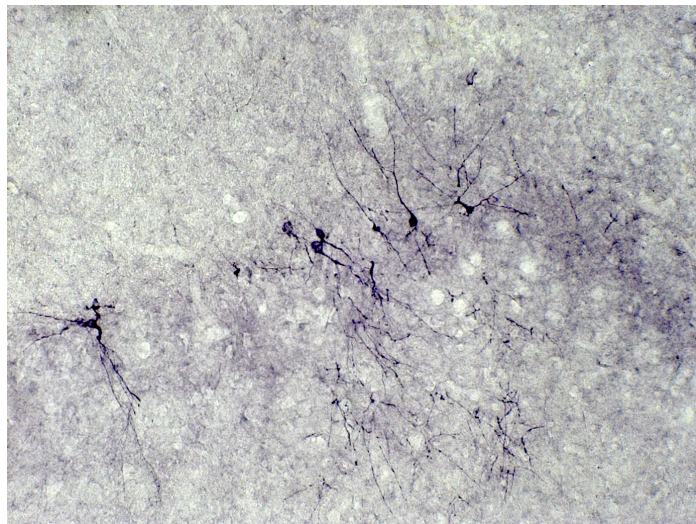


Abb. 24 a und b: Vergleich der persistierenden basalen Dendriten (PBD) zwischen einem Kontrolltier (oben) und einem EPO-behandelten epileptischen Tier (unten) im Gyrus dentatus. Bei dem SE-Tier wird eine massive Zunahme der in den Hilus ziehenden PBD deutlich.

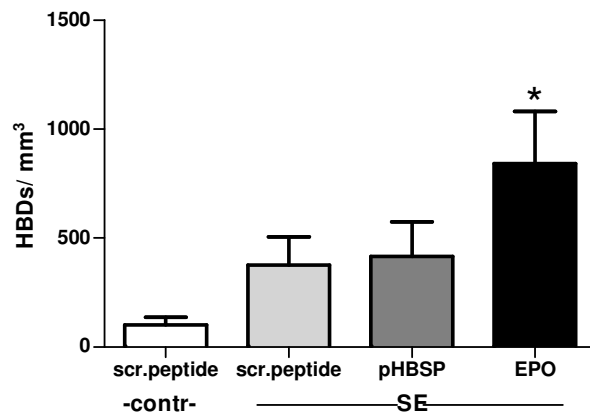


Abb. 25: Anzahl der hilaren basalen Dendriten pro mm³ (Mittelwert ± SEM). Signifikante Unterschiede treten zwischen der SE/EPO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE/„scrambled“ pHBSP n=9, SE/pHBSP n=8, SE/EPO n=8).

Zur Quantifizierung der statusinduzierten Zellproliferation wurde der immunhistologische Proliferationsmarker BrdU verwendet. Die BrdU-positiven Zellen wurden in der Körnerzellschicht gezählt und für die Berechnung der Gesamtzahl mit den ektopischen hilaren Zellen addiert und der Mittelwert gebildet. Dabei zeigte sich, dass SE-induziert in allen Gruppen eine signifikant gesteigerte Zellproliferation stattgefunden hatte. So stieg die Anzahl neugebildeter Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 277% in der SE/„scrambled-Peptid“-Gruppe, in der SE/pHBSP-Gruppe um 523% und in der SE/EPO-Gruppe um 591%. Zwischen den SE Gruppen kam es zusätzlich zu signifikanten Unterschieden zwischen der „scrambled Peptid“- und der pHBSP- bzw. der EPO-Gruppe (Abb. 26).

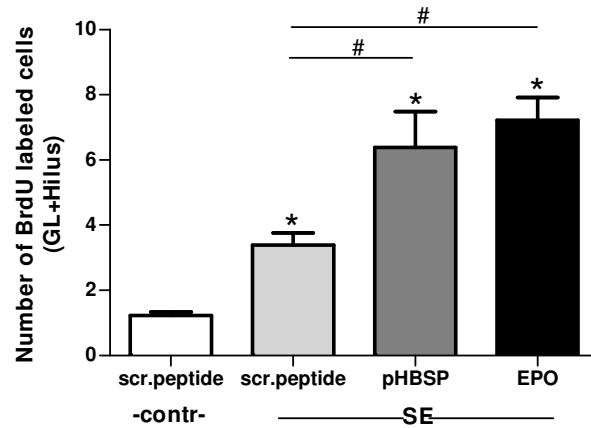


Abb. 26: Anzahl der BrdU markierten Zellen in der Körnerzellschicht und im Hilus (Mittelwert \pm SEM). SE-bedingt trat eine signifikant gesteigerte Zellproliferation in allen SE-Gruppen auf. Des Weiteren war die Zellproliferation in der SE/pHBSP- und der SE/EPO-Gruppe im Vergleich zu der SE/„scrambled Peptid“ Gruppe signifikant höher (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE/„scrambled Peptid“ n=7, SE/pHBSP n=9, SE/EPO n=10).

Um die Rate der neugebildeten Neurone zu untersuchen wurden die BrdU/NeuN doppelmarkierten Zellen im Hippocampus analysiert. Unerwarteterweise führte der SE in der „scrambled Peptid“-behandelten Gruppe zu keinem Anstieg der doppelmarkierten Zellen. Hingegen war die Anzahl in der pHBSP-behandelten SE Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 27).

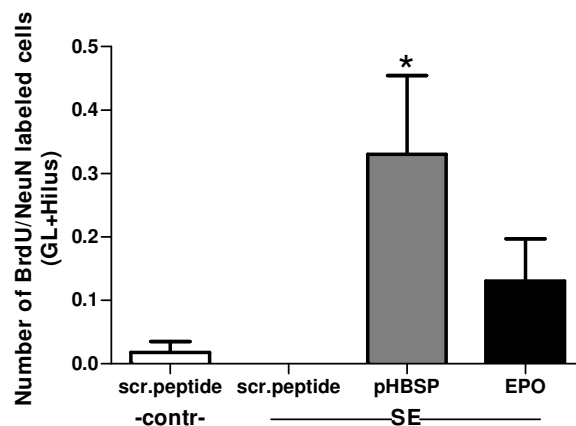


Abb. 27: Anzahl der BrdU/NeuN-doppelmarkierten Zellen im Hippocampus (Mittelwert \pm SEM). Die SE/pHBSP-behandelte Gruppe wies im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr doppelmarkierte Zellen auf (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ n=9, SE/„scrambled Peptid“ n=7, SE/pHBSP n=9, SE/EPO n=10).

Anhaltende Anfallsaktivität führt zu morphologischen und molekularen Veränderungen in Mikrogliazellen. Möglicherweise tragen diese Modifikationen zu den längerfristigen schädlichen Konsequenzen des SE bei. Basierend auf den antiinflammatorischen Eigenschaften des EPO ist es daher von besonderem Interesse, den Einfluss der Peptide auf die SE induzierten Veränderungen der Mikrogliapopulation zu evaluieren. Für die Untersuchung der Mikrogliaaktivierung wurde eine ED1-Färbung angewendet und anschließend verschiedene Gehirnbereiche beurteilt. Im parietalen Cortex, dem Thalamus und den hippocampalen Subregionen (CA₁, CA_{3a}, CA_{3c}) konnte keine SE-assoziierte signifikant erhöhte Aktivierung der Mikroglia gezeigt werden. Im piriformen Cortex führte der SE hingegen in allen drei SE-Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der Mikroglia (Abb. 28 + 29).

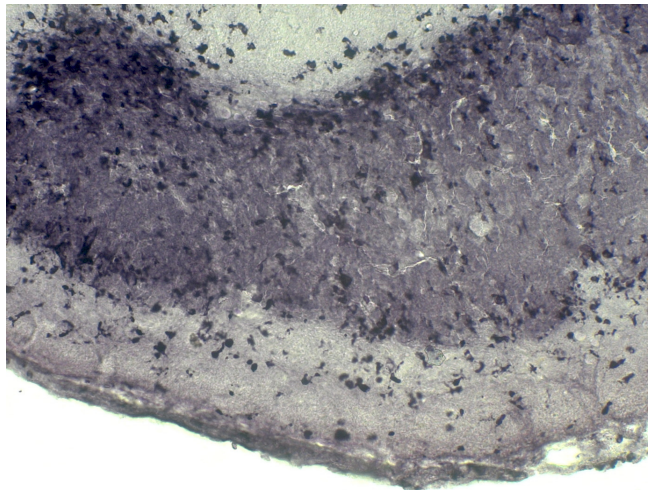


Abb. 28: Massive Mikrogliaaktivierung im piriformen Cortex bei einem epileptischen Tier.

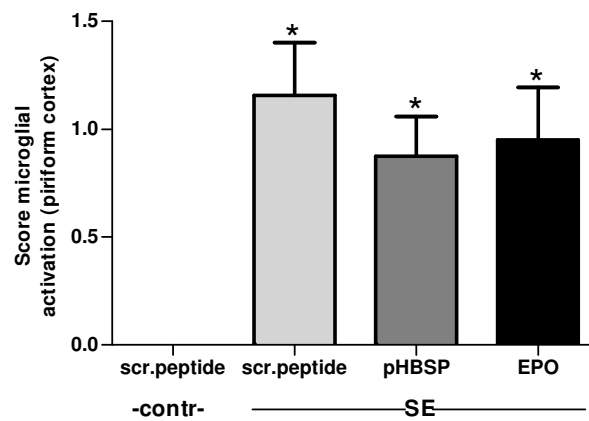


Abb. 29: Scoreergebnisse der Mikrogliaaktivierung im piriformen Cortex. SE-bedingt war die Mikrogliaaktivierung in den SE-Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrollgruppe „scrambled Peptid“ =9, SE/„scrambled Peptid“ n=8, SE/pHBSP n=8, SE/EPO n=10).

6 DISKUSSION

6.1 Einleitung

Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung einer symptomatischen Epilepsie beitragen, sind bislang weitestgehend ungeklärt. Somit gibt es bis heute keine konkreten Strategien für eine prophylaktische Therapie der Erkrankung. In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Publikationen über einen Zusammenhang zwischen vielfältigen Veränderungen in der neuronalen Plastizität und dem Prozess der Epileptogenese berichtet. Dabei wurden vor allem eine gestörte Neurogenese (PARENT et al. 1998; SCOTT et al. 1998), sowie ein massiver Neuronenverlust diskutiert (SLOVITER et al. 1996; VELISEK u. MOSHE 2003). Nach dem heutigen Wissensstand wird diesen anfallsinduzierten neuropathologischen Veränderungen eine wesentliche Beteiligung an der Entstehung eines prokonvulsiven, epileptogenen Netzwerkes zugesprochen. Dieses resultiert schlussendlich in der Manifestation einer Epilepsie. Eine Prävention der anfallsbedingten neuronalen Plastizität könnte sich positiv auf den Prozess der Epileptogenese auswirken. Einen günstigen Einfluss zeigt dabei das Hormon und Glykoprotein Erythropoetin (EPO) (NADAM et al. 2007). Zusätzlich wurden in den letzten Jahren mimetische Peptide wie Epotris und pHBSP aus diesem Makromolekül entwickelt, die ebenfalls die Neuroplastizität beeinflussen können (BRINES et al. 2008; PANKRATOVA et al. 2010). Die mimetischen Peptide weisen neuroprotektive Eigenschaften auf. Ihnen fehlt hingegen die hämatopoetische Komponente, die den therapeutischen Einsatz von EPO und dessen Derivaten (wie asialo-EPO) durch teils schwere Nebenwirkungen einschränkt. Vermutlich werden die gewebeprotectiven Effekte über einen Heterorezeptor (EPO-R und CD131) vermittelt. Basierend auf dieser Annahme, sowie der entschlüsselten EPO-Struktur, entwickelten BRINES et al. (2008) die Hypothese, dass die protektiven Eigenschaften von EPO in einer Region innerhalb der Helix B und der AB-Schleife liegen. Dementsprechend wurde die Aminosäuresequenz des mimetischen Peptids pHBSP konzipiert. Dessen potentiell gewebesetzenden Komponenten wurden kürzlich erfolgreich in einem Schlaganfallmodell, einem renalen Ischämiemodell, sowie Modellen zu peripheren Nervenraumata bestätigt. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse könnte die Anwendung von mimetischen Peptiden ein neuartiger Ansatz sein, anfallsinduzierte neuronale Veränderungen im epileptischen Gehirn zu modulieren.

6.2 Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin im chronischen Post-Status-Epilepticus-Modell

6.2.1 Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin im elektrischen SE-Modell

Als Folge der Dauerstimulation der basolateralen Amygdala (BLA) entwickelt die Mehrheit der Tiere einen sich selbst erhaltenden Status epilepticus (SSSE). Während dieser anhaltenden Anfallsaktivität finden zahlreiche neuroplastische Veränderungen statt (BRANDT et al. 2003a), die in spontanen rekurrierenden Anfällen resultieren. In einer Lithium-Pilocarpin-Studie konnte gezeigt werden, dass EPO den anfallsinduzierten Effekten teilweise entgegen wirken kann und somit möglicherweise die Schwere der Erkrankung reduziert. So zeigten EPO behandelte Tiere im Vergleich zu einer Vehikel behandelten Gruppe eine niedrigere Frequenz und Dauer der spontanen epileptischen Anfälle (CHU et al. 2008). In einer anderen Pilocarpin-Studie wurde neben einer verlängerten Latenzzeit ebenfalls eine Reduzierung der Anfallschwere beschrieben (NADAM et al. 2007). In unserer Studie beeinflussten weder die pHBSP- noch die EPO-Applikation die Frequenz der Anfälle oder die Anzahl an Tieren, die spontane epileptische Anfälle entwickelten. Im Vergleich zu den pHBSP behandelten Tieren zeigten die EPO behandelten Tiere jedoch eine kürzere Anfallsdauer auf, sodass von einer EPO bedingten leichten Abschwächung der SE-induzierten Folgeerscheinungen ausgegangen werden kann. Somit konnten wir die anfallsmodifizierenden Effekte von EPO nur teilweise bestätigen. Möglicherweise hängen die Diskrepanzen mit den unterschiedlichen Studienprotokollen (Anfallsmodell, Art der Behandlung, Zeitpunkt und Intensität der Überwachung) zusammen. Die Daten der pHBSP behandelten Tiere weisen auf keinen antiepileptogenen Einfluss des Peptids hin. Nachfolgend durchgeführte Verhaltenstests und immunhistochemische Untersuchungen sollen darlegen, welche Effekte die pHBSP- bzw. EPO-Behandlung auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen hat.

6.2.2 Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin in verschiedenen Verhaltensparadigmen

In den verschiedenen Verhaltensparadigmen zeigten die SE-Tiere anfallsbedingt Veränderungen im angstassoziierten Verhalten, sowie im Lern- und Erinnerungsvermögen. Die Lokomotionsparameter im Open Field und dem Elevated-Plus-Maze ließen eine Hyperaktivität der Tiere erkennen. Diese Erscheinung wird in der Literatur als

verminderte ängstliche Reaktion beschrieben (SZYNDLER et al. 2005). Möglicherweise reflektiert das beobachtete Verhalten ein Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitäts-Syndrom, welches bei epileptischen Humanpatienten häufig beschrieben wird (KONESKI u. CASELLA 2010). Im Kontrast dazu hielten sich die pHBSP-behandelten Tiere im Open Field jedoch signifikant weniger im Zentrum auf, was als Hinweis auf ängstliches Verhalten gedeutet werden kann. Im Elevated-Plus-Maze betraten die SE-Tiere signifikant häufiger die offenen Arme und die SE-„scrambled Peptid“ und SE-EPO-Tiere hielten sich im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant kürzer in den geschlossenen Armen auf. Während das pHBSP den letzteren SE-induzierten Effekt leicht abschwächte, wurden im Besonderen bei den beiden anderen SE-Gruppen die anfallbedingten Störungen des Angstverhaltens deutlich. Vermutlich ist die nicht konditionierte Aversion gegen Höhen und offene Flächen der entscheidende Faktor für das Verhalten im EPM (BARNETT 1975). Der Funktionsstörung des Angstverhaltens liegen möglicherweise anfallsbedingte Läsionen von Gehirngebieten zugrunde, die eine Rolle in der Evaluierung von potentiell Furcht auslösenden Situationen spielen. Sie können sich in reduzierter Ängstlichkeit und/oder gesteigertem impulsiven Verhalten äußern (DETOUR et al. 2005). Jedoch könnte die verhältnismäßig lange Aufenthaltszeit aller SE-Gruppen auf den offenen Armen auch dadurch bedingt sein, dass die Lichtstärke nicht intensiv genug war. Bedingt dadurch wird der Aufenthalt nicht als aversiv empfunden, was im Fehlen des angstassoziierten Verhaltens resultiert (CRAWLEY 2000). Die Anzahl der *headdips* vom Elevated-Plus-Maze war in allen SE-Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant gesteigert. Dieser Parameter dient ebenfalls zum Erfassen der Hyperaktivität und reflektiert die SE-bedingten Verhaltensänderungen. In der Black-and-White-Box hielten sich die SE-Tiere signifikant länger im hellen Kompartiment auf, was auf eine gesteigerte Ängstlichkeit in aversiver Umgebung hinweist. Alternativ könnte auch hier eine zu niedrige Luxzahl und die damit verbundene fehlende Aversion durch helles Licht Ursache des Verhaltens sein. Die Tiere verweilen somit länger in der weißen Box, um ihrem Explorationsbedürfnis nachzugehen.

Zur Beurteilung der kognitiven Fähigkeiten der Tiere führten wir den Morris-Water-Maze-Test durch. Er gilt als sensitives Modell räumlichen Lern- und Orientierungsvermögens, sowie hippocampaler Integrität (MORRIS et al. 1982). Wie kürzlich beschrieben zeigen epileptische Ratten in diesem Test Beeinträchtigungen im räumlichen Lern- und Erinnerungsvermögen auf (BRANDT et al. 2006). In unserem Fall

hatten vor allem die „scrambled Peptid“- und EPO-behandelten Tiere Schwierigkeiten die Plattform aufzusuchen. So zeigten diese Tiere mit Ausnahme der „scrambled Peptid“-behandelten Tiere an Tag 6 signifikante Unterschiede in der Dauer der Latenzzeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren kreuzten die EPO-behandelten Tiere während der Spatial Probe signifikant seltener die ehemalige Plattformposition, sie wiesen eine längere Latenzzeit auf und verbrachten weniger Zeit im entsprechenden Quadranten. Die Ergebnisse stehen damit in Kontrast zu der Beschreibung in der Literatur, in welcher EPO-bedingte gesteigerte kognitive Fähigkeiten bei Nagern und Humanpatienten geschildert werden (LU et al. 2005; EHRENREICH et al. 2007b). Da das Lernvermögen im MWM primär von einem intakten Hippocampus abhängt (STAFSTROM 2006) liegt der Verdacht einer schweren Neurodegeneration nahe. Erstaunlicherweise konnten jedoch nur bei einzelnen Tieren geringe neurodegenerative Prozesse festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese paradoxe Erscheinung ist, dass unsere Scoring-Methode subtile morphologische Veränderungen, die funktionell bedeutend sind, nicht genügend erfassen kann. Eine andere Hypothese ist, dass epileptische Ratten Probleme haben die Sachlage zu verstehen. So wird angenommen, dass die Tiere zum einen nicht fähig sind die Position der Plattform zu erlernen und sie als Fluchtmöglichkeit vor dem Wasser zu assoziieren und zum anderen deren Existenz nicht bewusst wahrnehmen. Zusätzlich könnte das Vergessen des Erlernten eine Rolle spielen. Somit kann das Ergebnis der MWM-Akquisitionsphase auf eine mangelnde Kontextverarbeitung zurückgeführt werden. Dieses Problem wird in der Literatur im Zusammenhang mit abnormem Verhalten bei epileptischen Ratten beschrieben (BRANDT et al. 2006). Des Weiteren können abnorme Netzwerkverbindungen, die durch die SE-induzierte Neurogenese in der akuten Phase entstehen, zu Defiziten im Lern- und Erinnerungsvermögen beitragen (HELMSTAEDTER 2002; HELMSTAEDTER et al. 2003). In der chronischen Phase führt hingegen eine Reduktion der Neurogenese zu Beeinträchtigungen der kognitiven Fähigkeiten (HATTIANGADY et al. 2004). BRINES et al. (2008) beschrieben eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bei pHBSP-behandelten Ratten im Novel-Object-Recognition-Test. Da der Effekt nur eintrat, wenn das pHBSP nach dem Training appliziert wurde, gehen die Autoren davon aus, dass das Peptid die Konsolidierungsphase der Erinnerungsakquisition intensiviert (BRINES et al. 2008). In unserer Studie sollte die Frage geklärt werden, welche Langzeiteffekte pHBSP, das in der akuten Phase nach dem Gehirnsult verabreichte

wurde, auf zellulärer Ebene und damit auch auf kognitive Fähigkeiten zeigt. Im Morris-Water-Maze wurde bei den pHBSP-behandelten Tieren eine Abschwächung der epilepsieassoziierten Defizite im räumlichen Lernvermögen und der Kontextverarbeitung deutlich. Möglicherweise ist der günstige Effekt durch den Einfluss von pHBSP in der frühen Phase nach dem SE auf die hippocampale Neurogenese bedingt. Ausgeschlossen werden kann, dass die Leistung der Tiere aufgrund unterschiedlicher Wassertemperatur variierte. So wurde während der Versuche auf eine gleich bleibende und nicht zu warme Wassertemperatur geachtet. Diese gilt als wichtiger motivationsmodulierender Parameter, da sich die Tiere bei warmem Wasser eher passiv treiben lassen (WOLFER et al. 1998).

6.2.3 Effekte des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP und von Erythropoetin auf histologischer Ebene

Zur Markierung des Nucleus mitotisch aktiver Zellen wurde den Tieren in der akuten Phase nach der Dauerstimulation der Proliferationsmarker Bromdesoxyuridinsäure (BrdU) appliziert. So konnte immunhistologisch analysiert werden, dass der SE-bedingte Anstieg an BrdU markierten Zellen, unabhängig von der Behandlung, bei allen SE-Gruppen im Gyrus dentatus stattfand. Bei der Analyse der BrdU/NeuN-doppelmarkierten Zellen wurde jedoch deutlich, dass Unterschiede in der neuronalen Differenzierung und/ oder der Überlebensrate der Zellen auftraten. So begünstigte pHBSP in signifikanter Weise das Überleben der neugebildeten Neurone. Vermutlich geht dennoch zumindest ein Teil der Neurogenese-modulierenden Komponente durch pHBSP auf die gesteigerte Zellproliferation zurück. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt, obwohl die BrdU-Applikation und -markierung erst nach der Injektion der zu testenden Substanzen stattgefunden hatte. Somit weisen die Daten auf einen anhaltenden Einfluss durch pHBSP auf die Zellproliferation in den ersten Tagen nach dem SE hin. Im Vergleich der Wirkungsweise von pHBSP zu EPO könnte der Unterschied darin begründet liegen, dass die beiden Substanzen mit unterschiedlicher Affinität an den EPOR/ β CR Heterorezeptor binden bzw. die Konzentrationen an der Zielstruktur differieren. PARENT et al (2008) beschrieben kürzlich, dass sich die Körnerzellen im Gyrus dentatus nach einem elektrisch induzierten SE im Gegensatz zu einem Kainsäure- oder Pilocarpin-induzierten SE oft normal entwickeln (PARENT u. MURPHY 2008). Dies könnte zur Erklärung der positiven Ergebnisse der pHBSP-behandelten Tiere im Morris-Water-Maze beitragen. Andere Autoren be-

schreiben, dass die neugebildeten Zellen möglicherweise die Entwicklung von spontanen Anfällen beeinflussen und zur Progression der Erkrankung beitragen (SCHARFMAN et al. 2000). Diese Hypothese kann in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, da die pHBSP-behandelten Tiere im Vergleich zu den anderen Gruppen keine größeren Veränderungen in der Epileptogenese zeigten.

Zur Analyse der Vorläuferzellen von Neuronen wurde die Doublecortin (DCX)-Färbung angewendet. Durch die Markierung eines microtubulinassoziierten Phosphoproteins, welches transient von Vorläuferzellen des Hippocampus exprimiert wird, konnte mit Hilfe der stereologischen Auswertetechnik die quantitative Veränderung von Vorläuferzellen und hilaren basalen Dendriten bestimmt werden. Dabei wurde deutlich, dass weder die pHBSP- noch die EPO-Behandlung einen Einfluss auf die Anzahl der DCX-markierten Zellen zeigte. Somit werden in der chronischen Phase keine Hinweise mehr auf einen substanzvermittelten Einfluss auf DCX-markierte Zellen deutlich. Frühere Daten beschreiben bereits eine unveränderte oder reduzierte Neurogeneserate im chronischen epileptischen Gehirn. Vermutlich sinkt die Rate an Vorläuferzellen aufgrund epileptogener Veränderungen und dem Auftreten spontaner epileptischer Anfälle in beachtlichem Ausmaß nach einigen Wochen ab. Die Abschwächung scheint dabei abhängig von der Frequenz der Anfälle und einer persistierenden Inflammation zu sein (EKDAHL et al. 2003; HATTIANGADY et al. 2004; HATTIANGADY u. SHETTY 2008, 2010). Dies konnte insofern bestätigt werden, als dass durch die unterschiedlichen Behandlungen der Tiergruppen keine Abschwächung der Anfälle erreicht wurde und die dadurch bedingte hohe Frequenz vermutlich einen Anstieg der Neuronenneubildung verhinderte. Die niedrigere Neurogeneserate ist einer der Gründe, weshalb bei TLE-Patienten Einschränkungen im hippocampusabhängigen Lern- und Erinnerungsvermögen auftreten (HATTIANGADY et al. 2004). Möglicherweise trägt die verminderte Neubildung an Neuronenvorläuferzellen zur Erklärung einiger Resultate in den durchgeführten Verhaltensuntersuchungen bei.

Mit der DCX-Färbung konnte neben der Zählung der Vorläuferzellen auch die Anzahl an persistierenden basalen Dendriten (PBD) bestimmt werden. Im Normalfall bilden sich die basalen Dendriten transient während der Migration und Entwicklung von Körnerzellen aus (BUCKMASTER u. DUDEK 1999; SHAPIRO et al. 2008a). Bei epileptischen Ratten können die Dendriten im Hilus persistieren. Sie treten dann an bis zu 30% der Körnerzellen auf (ARISI u. GARCIA-CAIRASCO 2007). In der vorliegend-

en Studie wiesen die EPO-behandelten Tiere eine signifikant erhöhte Zahl an hilaren Dendriten auf. Es wird beschrieben, dass sie zum Teil synaptischen Input von abberanten hilaren Moosfaserendigungen erhalten (ARISI u. GARCIA-CAIRASCO 2007) und somit möglicherweise zu einem hyperexzitablen Netzwerk beitragen können. Diese Hypothese konnten wir nicht bestätigen, da die EPO-Tiere zwar einen Anstieg an persistierenden basalen Dendriten aufwiesen, sie aber dennoch eine signifikante Verkürzung der Anfallsdauer zeigten.

Nadam et al. (NADAM et al. 2007) beschrieben kürzlich im Pilocarpin-Modell einen neuroprotektiven Effekt durch rekombinantes humanes EPO. So konnten nach einer EPO-Applikation an Tag 0, 1 und 3 nach dem SE selbst für empfindliche hippocampale Bereiche protektive Eigenschaften aufgezeigt werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir das EPO-mimetische Peptid pHBSP auf ähnliche Merkmale im SE-Modell. Unerwarteterweise konnten wir jedoch in keiner der untersuchten Gehirnregionen relevante neurodegenerative Prozesse feststellen. Selbst die in einer vorhergehenden Studie (PEKCEC et al. 2008) als hoch sensibel eingestuftten Areale wiesen kaum Neuronenverluste auf. Möglicherweise liegen diesem Phänomen genetische Veränderungen des verwendeten Rattenstamms zu Grunde, die in einer höheren Resistenz gegen die SE-induzierte Neurodegeneration resultieren. Ähnliche Beobachtungen werden von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (LANGER et al. 2010), die ebenfalls von einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen SE-induzierte neurodegenerative Prozesse bei Sprague-Dawley Ratten berichten. Aufgrund dieser Vermutungen lassen sich in der vorliegenden Arbeit keine Aussagen über mögliche neuroprotektive Effekte von pHBSP treffen.

SE-bedingt werden inflammatorische Prozesse initiiert, die mit der Aktivierung von Mikroglia verbunden sind. Es handelt sich dabei um einen komplexen Prozess im epileptischen Gehirn, der möglicherweise mit dem persistierenden hyperexzitablen Netzwerk im Hippocampus korreliert und zur Epileptogenese beiträgt (AVIGNONE et al. 2008; SHAPIRO et al. 2008b). So können Mikroglia die Migration neuraler Vorläuferzellen durch eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren beeinflussen (AARUM et al. 2003). Immunhistologisch durchgeführte Analysen des lysosomalen Proteins ED1/CD 68, von dem bekannt ist, dass es durch Mikrogliaaktivierung herauf reguliert wird, zeigten in unserer Studie keinen Einfluss durch pHBSP oder EPO. So konnten in den Arealen CA₁, CA_{3a} und CA_{3c} keine SE-bedingte Mikrogliaaktivierung beobachtet werden. Hingegen wiesen alle epileptischen Tiere im piriformen Cortex eine

schwache, aber dennoch signifikante Erhöhung der Zellzahl auf. In der Literatur wird von einer Assoziation zwischen neurodegenerativen Prozessen und dem massiven Auftreten von Mikroglia berichtet (TOOYAMA et al. 2002). Somit hängt die niedrige Mikrogliaaktivierung möglicherweise mit der schwachen Neurodegeneration zusammen. Jedoch wurde in zahlreichen Publikationen von antiinflammatorischen Effekten durch EPO mit einer Reduktion von aktivierten Mikroglia und proinflammatorischen Zytokinen berichtet (AGNELLO et al. 2002; EHRENREICH et al. 2007a; VELLY et al. 2010). Somit könnte das schwache Auftreten der Mikroglia auch eine Folge der antiinflammatorischen Eigenschaften von pHBSP und EPO sein. Da jedoch auch in der „scrambled Peptid“-behandelten Gruppe nur eine geringe Mikrogliaaktivierung zu sehen war, würde dies auf einen unspezifischen Effekt der „scrambled“ Version des pHBSP hindeuten. In Anbetracht dessen, dass sich Entzündungsprozesse auf die Zellneubildung auswirken, könnte dies den Einfluss der Substanzen auf die hippocampale Zellproliferation bzw. bei pHBSP zusätzlich auf die Neuronenneubildungen erklären.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten einen modulierenden Effekt durch das EPO-mimetische Peptid pHBSP auf SE-bedingte Veränderungen sowohl auf zellulärer Ebene, als auch auf Modifikationen im Verhalten und Kognition. Die Tatsache, dass trotz des Einflusses von pHBSP auf die Neurogenese keine Effekte auf die Epileptogenese deutlich werden, spricht eher gegen einen Beitrag durch abnorme Neuronenneubildungen an der Epilepsieentstehung. Um das weitere therapeutische und prophylaktische Potential von pHBSP jedoch besser validieren zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei können dann auch zusätzliche Strategien zur Überprüfung der potentiellen Indikationen entwickelt werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Natalie Seeger

Prüfung des Erythropoetin-mimetischen Peptids pHBSP in einem chronischen Post-Status-Epilepticus-Modell

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hund, Katze und Mensch. Einem Großteil der Epilepsien liegen symptomatische Ursachen wie Schädel-Hirn-Traumata, Encephalitiden oder Gehirntumore zu Grunde. Bedingt durch diesen Insult kommt es im Gehirn zu Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene, die zur Generierung eines proepileptogenen Netzwerkes führen können und in der Folge in der Manifestation einer Epilepsie resultieren. Aktuell stellt die meist lebenslange Medikation mit antikonvulsiven Pharmaka die Therapie der Wahl dar. Ziel ist dabei eine Anfallssuppression, wobei häufig nur eine Anfallsreduktion erreicht wird. Trotz der zahlreichen Antiepileptika sprechen rund ein Drittel der Veterinär- und Humanpatienten nicht auf die medikamentelle Therapie an. In verschiedenen Studien der letzten Jahre konnte belegt werden, dass der Pharmakoresistenz ein multifaktorieller Prozess zu Grunde liegt. Diese refraktäre Form der Epilepsie stellt ein gravierendes Problem dar, da die Patienten von einer hohen Morbidität und Mortalität betroffen sind. Weiterhin können epilepsieassoziierte Komorbiditäten auftreten, die eine zusätzliche Beeinträchtigung in der Lebensqualität bedeuten. Bei therapieresistenten Veterinärpatienten folgt daher häufig die Euthanasie. Für die Zukunft wäre somit eine prophylaktische und antiepileptogene Therapie, die die Entstehung von Epilepsien verhindert, wünschenswert. Zum aktuellen Zeitpunkt ist ein konkreter Ansatz zur Entwicklung einer Prophylaxe limitiert, da die Mechanismen, die der Epileptogenese zugrunde liegen, weitestgehend unbekannt sind. Jedoch gaben in den letzten Jahren verschiedene Untersuchungen Hinweise darauf, dass Veränderungen der neuronalen Plastizität, insbesondere massive Neuronenverluste und eine gestörte Neuronenneubildung, eine zentrale Rolle in der Entstehung von Epilepsien darstellen könnten. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Studie sollte dazu beitragen die Mechanismen der Epileptogenese besser zu verstehen und neue Ansätze in der antiepileptogenen bzw. erkrankungsmodifizierenden Therapie durch das EPO-mimetische Peptid pHBSP zu untersuchen. Des Weiteren sollte der mögliche Einfluss von pHBSP auf epilepsieassoziierte Komorbiditäten in verschiedenen Verhaltensmodellen betrachtet werden. In vorhergehenden Forschungsarbeiten

konnten die neuroprotektiven, neurotrophen und kognitionsfördernden Eigenschaften von pHBSP bereits gezeigt werden. Somit standen im Rahmen dieser Arbeit vor allem die Effekte auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen, sowie der potentielle Einfluss auf SE-bedingte Verhaltensveränderungen im Mittelpunkt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von pHBSP die epilepsieassoziierte Verhaltensstörung im Elevated-Plus-Maze leicht abgeschwächt wurde. Zusätzlich wurden im Morris-Water-Maze verminderte SE-bedingte Defizite im räumlichen Lernvermögen und der Kontextverarbeitung deutlich. Auf zellulärer Ebene begünstigte pHBSP in signifikanter Weise das Überleben neugebildeter Neurone. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Helix B-Peptid pHBSP effizient SE-induzierte zelluläre und kognitive Veränderungen modulieren kann. Die Tatsache, dass pHBSP trotz gesteigerter hippocampaler Neurogenese die Epileptogenese nicht beeinflusst, spricht eher gegen die Beteiligung einer aberranten Neuronenbildung an der Epilepsieentstehung. Der Einfluss von pHBSP auf die Neurodegeneration konnte aufgrund eines vermuteten *genetic drift* im ausgewählten Tiermodell und damit einhergehender hoher Resistenz der Tiere bedauerlicherweise nicht weiter untersucht werden. Um das neuroprotektive Potential von pHBSP, sowie den tatsächlichen Beitrag der Neurogenese an der Epilepsieentstehung evaluieren zu können, müssen daher zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Des Weiteren muss in der Zukunft geklärt werden, ob pHBSP als neue Behandlungsstrategie geeignet ist.

8 SUMMARY

Natalie Seeger

Effect of the Erythropoietin-derived peptide mimetic pHBSP in a chronic post-status-epilepticus-model

Epilepsies are the most common chronic neurological diseases in dogs, cats and humans. Epilepsy is often due to symptomatic reasons like head trauma, encephalitis or brain tumours. On molecular and cellular levels these brain insults can result in alterations associated with a pro-epileptogenic network and manifestation of epilepsy. In the majority of patients a lifelong therapy is necessary to reduce or prevent spontaneous seizures. Despite the availability of multiple antiepileptic drugs one third of veterinary and human patients are resistant to current pharmacotherapies. During the last years several studies rendered evidence that drug resistance is a multifactorial problem. In view of the high morbidity and mortality rate, refractory epilepsy constitutes a major clinical problem. Furthermore, many patients complain about disease-associated co-morbidities which affect their quality of life. In veterinary patients lack of therapeutic success often results in euthanasia.

For the future it would be desirable to develop a prophylactic and antiepileptogenic strategy which prevents symptomatic epilepsies. However, a straight-forward development of preventive concepts is currently limited by the incomplete understanding of the mechanisms of epileptogenesis. Cellular alterations including neurodegeneration and aberrant neurogenesis might play an important role in the development of epilepsies. One aim of this doctoral thesis was to investigate the mechanisms contributing to the epileptogenic process and to examine the antiepileptogenic and disease-modifying potential of the EPO-derived peptide mimetic pHBSP. In addition, the impact of pHBSP on epilepsy-associated co-morbidities was analyzed in different behavioural paradigms. Recent investigations already demonstrated the neuroprotective and neurotrophic effects as well as improved cognitive abilities following pHBSP-treatment. The present study focussed on the impact of pHBSP on seizure-induced neuronal alterations and changes in behaviour. It was demonstrated that application of the peptide mimetic pHBSP attenuates epilepsy-associated behavioural disturbances in the Elevated Plus Maze as well as SE-induced deficits in spatial learning and context converting in Morris Water Maze paradigm. With regard to cellular alterations, pHBSP significantly enhanced the survival of newborn neurons. In conclusion,

the results demonstrate the efficacious modulation of SE-induced cellular alterations and cognitive deficits by pHBSP. The fact that pHBSP did not influence epileptogenesis despite its impact on hippocampal neurogenesis argues against the hypothesis of aberrant newborn neurons as a major contributor in the development of epilepsy. Unfortunately, it was not possible to investigate the impact of pHBSP on neurodegeneration as no robust neuronal cell loss was observed in the present experiments. Future studies are necessary to determine the neuroprotective potential of pHBSP and to evaluate the contribution of neurogenesis in the development of epilepsy. In addition, the potential of pHBSP for disease-modification needs to be further studied including efforts to optimize the treatment scheme.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- AARUM, J., K. SANDBERG, S. L. HAEBERLEIN u. M. A. PERSSON (2003):
Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia.
Proc Natl Acad Sci U S A 100, 15983-15988
- ABOOD, M. E. u. B. R. MARTIN (1996):
Molecular neurobiology of the cannabinoid receptor.
Int Rev Neurobiol 39, 197-221
- AGNELLO, D., P. BIGINI, P. VILLA, T. MENNINI, A. CERAMI, M. L. BRINES u. P. GHEZZI (2002):
Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis.
Brain Res 952, 128-134
- ALEMAN, M., L. C. GRAY, D. C. WILLIAMS, T. A. HOLLIDAY, J. E. MADIGAN, R. A. LECOULTEUR u. K. G. MAGDESIAN (2006):
Juvenile idiopathic epilepsy in Egyptian Arabian foals: 22 cases (1985-2005).
J Vet Intern Med 20, 1443-1449
- ALESSIO, A., E. KOBAYASHI, B. P. DAMASCENO, I. LOPES-CENDES u. F. CENDES (2004):
Evidence of memory impairment in asymptomatic individuals with hippocampal atrophy.
Epilepsy Behav 5, 981-987
- ALPER, K. R., J. J. BARRY u. A. J. BALABANOV (2002):
Treatment of psychosis, aggression, and irritability in patients with epilepsy.
Epilepsy Behav 3, 13-18
- ALTMAN, J. u. S. A. BAYER (1990):
Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods.
J Comp Neurol 301, 365-381
- ALTMAN, J. u. G. D. DAS (1967):
Postnatal neurogenesis in the guinea-pig.
Nature 214, 1098-1101
- ARISI, G. M. u. N. GARCIA-CAIRASCO (2007):
Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.
Brain Res 1165, 126-134
- ARONICA, E. u. J. A. GORTER (2007):
Gene expression profile in temporal lobe epilepsy.
Neuroscientist 13, 100-108
- AVIGNONE, E., L. ULMANN, F. LEVAVASSEUR, F. RASSENDREN u. E. AUDINAT (2008):
Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling.
J Neurosci 28, 9133-9144
- BAGLEY, R. S., M. L. HARRINGTON u. M. P. MOORE (1996):
Surgical treatments for seizure. Adaptability for dogs.
Vet Clin North Am Small Anim Pract 26, 827-842

- BANKS, W. A., N. L. JUMBE, C. L. FARRELL, M. L. NIEHOFF u. A. C. HEATHERINGTON (2004):
Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa.
Eur J Pharmacol 505, 93-101
- BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LOSCHER (1995):
Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.
Eur J Pharmacol 286, 167-175
- BARNES, H. L., C. L. CHRISMAN, C. L. MARIANI, M. SIMS u. A. R. ALLEMAN (2004):
Clinical signs, underlying cause, and outcome in cats with seizures: 17 cases (1997-2002).
J Am Vet Med Assoc 225, 1723-1726
- BARNETT, S. A. (1975):
The Rat: A Study in Behavior.
The University of Chicago Press Chicago.
- BARRACLOUGH, B. M. (1987):
The suicide rate of epilepsy.
Acta Psychiatr Scand 76, 339-345
- BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, D. RICHE, G. GHILINI u. R. NAQUET (1981):
Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy.
Neuroscience 6, 1361-1391
- BENGZON, J., Z. KOKAIA, E. ELMER, A. NANOBASHVILI, M. KOKAIA u. O. LINDVALL (1997):
Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10432-10437
- BERNIER, P. J., A. BEDARD, J. VINET, M. LEVESQUE u. A. PARENT (2002):
Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates.
Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11464-11469
- BERTRAM, E. H. (2009):
Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin?
Epilepsy Behav 14 Suppl 1, 32-37
- BEYENBURG, S., A. J. MITCHELL, D. SCHMIDT, C. E. ELGER u. M. REUBER (2005):
Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management.
Epilepsy Behav 7, 161-171
- BEYENBURG, S. u. D. SCHMIDT (2005):
[Patients with epilepsy and anxiety disorders. Diagnosis and treatment].
Nervenarzt 76, 1077-1078, 1081-1072, 1084-1076 passim
- BEYENBURG, S., B. STOFFEL-WAGNER, J. BAUER, M. WATZKA, I. BLUMCKE, F. BIDLINGMAIER u. C. E. ELGER (2001):
Neuroactive steroids and seizure susceptibility.
Epilepsy Res 44, 141-153

- BLADIN, P. F. (1992):
Psychosocial difficulties and outcome after temporal lobectomy.
Epilepsia 33, 898-907
- BLUMER, D., G. MONTOURIS u. K. DAVIES (2004):
The interictal dysphoric disorder: recognition, pathogenesis, and treatment of the major psychiatric disorder of epilepsy.
Epilepsy Behav 5, 826-840
- BOUILLERET, V., V. RIDOUX, A. DEPAULIS, C. MARESCAUX, A. NEHLIG u. G. LE GAL LA SALLE (1999):
Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy.
Neuroscience 89, 717-729
- BOYLAN, K. R., P. J. BIELING, M. MARRIOTT, H. BEGIN, L. T. YOUNG u. G. M. MACQUEEN (2004):
Impact of comorbid anxiety disorders on outcome in a cohort of patients with bipolar disorder.
J Clin Psychiatry 65, 1106-1113
- BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LOSCHER (2006):
Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.
Neuropharmacology 51, 789-804
- BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LOSCHER (2003a):
Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.
Epilepsy Res 55, 83-103
- BRANDT, C., H. POTSCHKA, W. LOSCHER u. U. EBERT (2003b):
N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy.
Neuroscience 118, 727-740
- BREIER, J. I., P. M. PLENGER, R. CASTILLO, K. FUCHS, J. W. WHELESS, A. B. THOMAS, B. L. BROOKSHIRE, L. J. WILLMORE u. A. PAPANICOLAOU (1996):
Effects of temporal lobe epilepsy on spatial and figural aspects of memory for a complex geometric figure.
J Int Neuropsychol Soc 2, 535-540
- BRINES, P. GHEZZI, S. KEENAN, D. AGNELLO, N. C. DE LANEROLLE, C. CERAMI, L. M. ITRI u. A. CERAMI (2000):
Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.
Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10526-10531
- BRINES, N. S. PATEL, P. VILLA, C. BRINES, T. MENNINI, M. DE PAOLA, Z. ERBAYRAKTAR, S. ERBAYRAKTAR, B. SEPODES, C. THIEMERMANN, P. GHEZZI, M. YAMIN, C. C. HAND, Q. W. XIE, T. COLEMAN u. A. CERAMI (2008):
Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin.
Proc Natl Acad Sci U S A 105, 10925-10930

BROOKS-KAYAL, A. R., M. D. SHUMATE, H. JIN, T. Y. RIKHTER u. D. A. COULTER (1998):

Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy.

Nat Med 4, 1166-1172

BUCKMASTER, P. S. u. F. E. DUDEK (1999):

In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats.

J Neurophysiol 81, 712-721

BUHL, E. H., T. S. OTIS u. I. MODY (1996):

Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model.

Science 271, 369-373

CAMERON, H. A., C. S. WOOLLEY, B. S. MCEWEN u. E. GOULD (1993):

Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.

Neuroscience 56, 337-344

CARPIO, A. u. W. A. HAUSER (2009):

Epilepsy in the developing world.

Curr Neurol Neurosci Rep 9, 319-326

CARRENO, M., A. DONAIRE u. R. SANCHEZ-CARPINTERO (2008):

Cognitive disorders associated with epilepsy: diagnosis and treatment.

Neurologist 14, S26-34

CAVALHEIRO, E. A., N. F. SANTOS u. M. R. PRIEL (1996):

The pilocarpine model of epilepsy in mice.

Epilepsia 37, 1015-1019

CAVAZOS, J. E., I. DAS u. T. P. SUTULA (1994):

Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures.

J Neurosci 14, 3106-3121

CAVAZOS, J. E. u. T. P. SUTULA (1990):

Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis.

Brain Res 527, 1-6

CHANDLER, K. (2006):

Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders?

Vet J 172, 207-217

CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):

Epilepsy.

N Engl J Med 349, 1257-1266

CHARNEY, D. S. (2003):

Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors.

Acta Psychiatr Scand Suppl 38-50

CHENG, C. M., M. COHEN, V. TSENG u. C. A. BONDY (2001):

Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus.

J Neurosci Res 64, 341-347

CHRISTMAS, A. J. u. D. R. MAXWELL (1970):

A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats.

Neuropharmacology 9, 17-29

CHU, K., K. H. JUNG, S. T. LEE, J. H. KIM, K. M. KANG, H. K. KIM, J. S. LIM, H. K. PARK, M. KIM, S. K. LEE u. J. K. ROH (2008):

Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus.

Epilepsia 49, 1723-1732

CORNAGGIA, C. M., M. BEGHI, M. PROVENZI u. E. BEGHI (2006):

Correlation between cognition and behavior in epilepsy.

Epilepsia 47 Suppl 2, 34-39

COSTALL, B., B. J. JONES, M. E. KELLY, R. J. NAYLOR u. D. M. TOMKINS (1989):

Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety.

Pharmacol Biochem Behav 32, 777-785

CRAMER, J. A., D. BLUM, M. REED u. K. FANNING (2003):

The influence of comorbid depression on seizure severity.

Epilepsia 44, 1578-1584

CRAWLEY (2000):

What's Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice.

Wiley-Liss: New York

CRAWLEY u. F. K. GOODWIN (1980):

Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.

Pharmacol Biochem Behav 13, 167-170

D'HOOGHE, R. u. P. P. DE DEYN (2001):

Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory.

Brain Res Brain Res Rev 36, 60-90

DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):

The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.

Curr Opin Neurol 14, 187-192

DAME, C., S. E. JUUL u. R. D. CHRISTENSEN (2001):

The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential.

Biol Neonate 79, 228-235

DASHTIPOUR, K., P. H. TRAN, M. M. OKAZAKI, J. V. NADLER u. C. E. RIBAK (2001):

Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer.

Brain Res 890, 261-271

DETOUR, J., H. SCHROEDER, D. DESOR u. A. NEHLIG (2005):

A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats.

Epilepsia 46, 499-508

DEVINSKY, O. (2003):

Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: implications for diagnosis and treatment.
Epilepsy Behav 4 Suppl 4, S2-10

DEWEY, C. W., R. GIULIANO, D. M. BOOTHE, J. M. BERG, G. D. KORTZ, R. J. JOSEPH u. S. C. BUDSBERG (2004):

Zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs.
J Am Anim Hosp Assoc 40, 285-291

DICHTER, M. A. (2009a):

Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis.
Arch Neurol 66, 443-447

DICHTER, M. A. (2009b):

Posttraumatic epilepsy: the challenge of translating discoveries in the laboratory to pathways to a cure.

Epilepsia 50 Suppl 2, 41-45

DODRILL, C. B. (2002):

Progressive cognitive decline in adolescents and adults with epilepsy.

Prog Brain Res 135, 399-407

DREIFUSS, F. E. (1994):

New antiepileptic drug development.

Epilepsia 35 Suppl 5, S6-9

DUDEK, F. E., J. L. HELLIER, P. A. WILLIAMS, D. J. FERRARO u. K. J. STALEY (2002):

The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus.

Prog Brain Res 135, 53-65

DUVERNOY, H. (2005):

The human hippocampus.

Springerverlag Berlin-Heidelberg

EHRENREICH, H., B. FISCHER, C. NORRA, F. SCHELLENBERGER, N. STENDER, M. STIEFEL, A. L. SIREN, W. PAULUS, K. A. NAVE, R. GOLD u. C. BARTELS (2007a):

Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis.

Brain 130, 2577-2588

EHRENREICH, H., D. HINZE-SELCH, S. STAWICKI, C. AUST, S. KNOLLE-VEENTJER, S. WILMS, G. HEINZ, S. ERDAG, H. JAHN, D. DEGNER, M. RITZEN, A. MOHR, M. WAGNER, U. SCHNEIDER, M. BOHN, M. HUBER, A. CZERNIK, T. POLLMACHER, W. MAIER, A. L. SIREN, J. KLOSTERKOTTER, P. FALKAI, E. RUTHER, J. B. ALDENHOFF u. H. KRAMPE (2007b):

Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin.

Mol Psychiatry 12, 206-220

EKDAHL, C. T., P. MOHAPEL, E. ELMER u. O. LINDVALL (2001):

Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus.

Eur J Neurosci 14, 937-945

EKDAHL, C. T., C. ZHU, S. BONDE, B. A. BAHR, K. BLOMGREN u. O. LINDVALL (2003):
Death mechanisms in status epilepticus-generated neurons and effects of additional seizures
on their survival.
Neurobiol Dis 14, 513-523

ENGEL, J., JR. (1996):
Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy.
Epilepsy Res Suppl 12, 9-20

ENGEL, J., JR. (2001):
Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?
Neuroscientist 7, 340-352

ERIKSSON, P. S., E. PERFILIEVA, T. BJORK-ERIKSSON, A. M. ALBORN, C.
NORDBORG, D. A. PETERSON u. F. H. GAGE (1998):
Neurogenesis in the adult human hippocampus.
Nat Med 4, 1313-1317

FAES, C., M. AERTS, H. GEYS u. L. DE SCHAEPDRIJVER (2010):
Modeling spatial learning in rats based on Morris water maze experiments.
Pharm Stat 9, 10-20

FALTER, U., A. J. GOWER u. J. GOBERT (1992):
Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences.
Behav Pharmacol 3, 123-128

FANDREY, J. u. H. F. BUNN (1993):
In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive
polymerase chain reaction.
Blood 81, 617-623

FEENEY, D. M. (1978):
Marihuana and epilepsy: paradoxical anticonvulsant and convulsant effects.
Adv Biosci 22-23, 643-657

FERNANDES, C. u. S. E. FILE (1996):
The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze.
Pharmacol Biochem Behav 54, 31-40

FISHER, E. F. SPERBER u. S. L. MOSHE (1998):
Hippocampal sclerosis revisited.
Brain Dev 20, 563-573

FISHER, W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL,
JR. (2005):
Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against
Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).
Epilepsia 46, 470-472

FRANCK, J. E., J. POKORNY, D. D. KUNKEL u. P. A. SCHWARTZKROIN (1995):
Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic
hippocampus.
Epilepsia 36, 543-558

FRENCH, J. A., P. D. WILLIAMSON, V. M. THADANI, T. M. DARCEY, R. H. MATTSON, S. S. SPENCER u. D. D. SPENCER (1993):

Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination.

Ann Neurol 34, 774-780

FRÖSCHER, U. V. (1994):

Epilepsien.

FUJIKAWA, D. G. (2005):

Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection.

Epilepsy Behav 7 Suppl 3, S3-11

GAGE, F. H. (2002):

Neurogenesis in the adult brain.

J Neurosci 22, 612-613

GARZILLO, C. L. u. L. E. MELLO (2002):

Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy.

Epilepsia 43 Suppl 5, 107-109

GE, S., E. L. GOH, K. A. SAILOR, Y. KITABATAKE, G. L. MING u. H. SONG (2006):

GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain.

Nature 439, 589-593

GENC, K., S. GENC, H. BASKIN u. I. SEMIN (2006):

Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes.

Physiol Res 55, 33-38

GILLIAM, F. G. u. B. ALBERTSON (2011):

Identifying epilepsy surgery candidates in the outpatient clinic.

Epilepsy Behav 20, 156-159

GILLIAM, F. G., A. J. FESSLER, G. BAKER, V. VAHLE, J. CARTER u. H. ATTARIAN (2004):
Systematic screening allows reduction of adverse antiepileptic drug effects: a randomized trial.

Neurology 62, 23-27

GILLIAM, F. G., B. M. MATON, R. C. MARTIN, S. M. SAWRIE, R. E. FAUGHT, J. W. HUGG, M. VIIKINSALO u. R. I. KUZNIECKY (2007):

Hippocampal 1H-MRSI correlates with severity of depression symptoms in temporal lobe epilepsy.

Neurology 68, 364-368

GIOVACCHINI, G., M. T. TOCZEK, R. BONWETSCH, A. BAGIC, L. LANG, C. FRASER, P. REEVES-TYER, P. HERSCOVITCH, W. C. ECKELMAN, R. E. CARSON u. W. H. THEODORE (2005):

5-HT 1A receptors are reduced in temporal lobe epilepsy after partial-volume correction.

J Nucl Med 46, 1128-1135

GLEISSNER, U., C. HELMSTAEDTER u. C. E. ELGER (1998):

Right hippocampal contribution to visual memory: a presurgical and postsurgical study in patients with temporal lobe epilepsy.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 65, 665-669

- GLEISSNER, U., C. HELMSTAEDTER, J. SCHRAMM u. C. E. ELGER (2002):
Memory outcome after selective amygdalohippocampectomy: a study in 140 patients with temporal lobe epilepsy.
Epilepsia 43, 87-95
- GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Exp Neurol 25, 295-330
- GORDON, E. u. O. DEVINSKY (2001):
Alcohol and marijuana: effects on epilepsy and use by patients with epilepsy.
Epilepsia 42, 1266-1272
- GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. H. LOPES DA SILVA (2001):
Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.
Eur J Neurosci 13, 657-669
- GOULD, E. (1999):
Serotonin and hippocampal neurogenesis.
Neuropsychopharmacology 21, 46S-51S
- GOULD, E. (2007):
How widespread is adult neurogenesis in mammals?
Nat Rev Neurosci 8, 481-488
- GOULD, E., A. BEYLIN, P. TANAPAT, A. REEVES u. T. J. SHORS (1999a):
Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.
Nat Neurosci 2, 260-265
- GOULD, E., A. J. REEVES, M. FALLAH, P. TANAPAT, C. G. GROSS u. E. FUCHS (1999b):
Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates.
Proc Natl Acad Sci U S A 96, 5263-5267
- GOULD, E., A. J. REEVES, M. S. GRAZIANO u. C. G. GROSS (1999c):
Neurogenesis in the neocortex of adult primates.
Science 286, 548-552
- GREEN, S. (1983):
Animal models in schizophrenia research.
In: *Animal models of human behavior*- Chapter 17. Ed by GCL Davey (Ed), pp 315 -338, John Wiley & Sons, Ltd, New York.
- GROTICKE, I., K. HOFFMANN u. W. LOSCHER (2007):
Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice.
Exp Neurol 207, 329-349
- GUNDERSEN, H. J., P. BAGGER, T. F. BENDTSEN, S. M. EVANS, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MOLLER, K. NIELSEN, J. R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG u. ET AL. (1988):
The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis.
APMIS 96, 857-881

- GUPTA, Y. K., S. BRIYAL u. G. CHAUDHARY (2002):
Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats.
Pharmacol Biochem Behav 71, 245-249
- HAAS, C. A. u. M. FROTSCHER (2010):
Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy.
Exp Brain Res 200, 141-149
- HALL, C. (1934):
Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.
Journal of Comparative Psychology, 18, 382-403
- HALONEN, T., J. NISSINEN u. A. PITKANEN (2001):
Effect of lamotrigine treatment on status epilepticus-induced neuronal damage and memory impairment in rat.
Epilepsy Res 46, 205-223
- HATTIANGADY, B., M. S. RAO u. A. K. SHETTY (2004):
Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus.
Neurobiol Dis 17, 473-490
- HATTIANGADY, B. u. A. K. SHETTY (2008):
Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy.
Epilepsia 49 Suppl 5, 26-41
- HATTIANGADY, B. u. A. K. SHETTY (2010):
Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy.
Hippocampus 20, 97-112
- HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. W. A. ROCCA (1996):
Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota.
Mayo Clin Proc 71, 576-586
- HELMSTAEDTER, C. (2002):
Effects of chronic epilepsy on declarative memory systems.
Prog Brain Res 135, 439-453
- HELMSTAEDTER, C., N. E. FRITZ, E. KOCKELMANN, N. KOSANETZKY u. C. E. ELGER (2008):
Positive and negative psychotropic effects of levetiracetam.
Epilepsy Behav 13, 535-541
- HELMSTAEDTER, C., T. GRUNWALD, K. LEHNERTZ, U. GLEISSNER u. C. E. ELGER (1997):
Differential involvement of left temporolateral and temporo mesial structures in verbal declarative learning and memory: evidence from temporal lobe epilepsy.
Brain Cogn 35, 110-131
- HELMSTAEDTER, C., M. KURTHEN, S. LUX, M. REUBER u. C. E. ELGER (2003):
Chronic epilepsy and cognition: a longitudinal study in temporal lobe epilepsy.
Ann Neurol 54, 425-432

HENSHALL, D. C. u. R. P. SIMON (2005):
Epilepsy and apoptosis pathways.
J Cereb Blood Flow Metab 25, 1557-1572

HERMANN, B. P., M. SEIDENBERG u. B. BELL (2000):
Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression.
Epilepsia 41 Suppl 2, S31-41

HERMANN, B. P., M. SEIDENBERG, J. SCHOENFELD u. K. DAVIES (1997):
Neuropsychological characteristics of the syndrome of mesial temporal lobe epilepsy.
Arch Neurol 54, 369-376

HESSEN, E., M. I. LOSSIUS, I. REINVANG u. L. GJERSTAD (2007):
Slight improvement in mood and irritability after antiepileptic drug withdrawal: a controlled study in patients on monotherapy.
Epilepsy Behav 10, 449-455

HITIRIS, N., R. MOHANRAJ, J. NORRIE, G. J. SILLS u. M. J. BRODIE (2007):
Predictors of pharmacoresistant epilepsy.
Epilepsy Res 75, 192-196

HOFFMAN, G. E., N. MOORE, G. FISKUM u. A. Z. MURPHY (2003):
Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment.
Exp Neurol 182, 124-134

HOGG, S. (1996):
A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety.
Pharmacol Biochem Behav 54, 21-30

HOLMES, G. L., J. L. GAIRSA, N. CHEVASSUS-AU-LOUIS u. Y. BEN-ARI (1998):
Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects.
Ann Neurol 44, 845-857

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.
Science 220, 323-325

HOPPENER, R. J., A. KUYER u. P. J. VAN DER LUGT (1983):
Epilepsy and alcohol: the influence of social alcohol intake on seizures and treatment in epilepsy.
Epilepsia 24, 459-471

HOUSER, C. R. (1990):
Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy.
Brain Res 535, 195-204

IGARASHI, E. u. S. TAKESHITA (1995):
Effects of illumination and handling upon rat open field activity.
Physiol Behav 57, 699-703

- INDULEKHA, C. L., R. SANALKUMAR, A. THEKKUVEETIL u. J. JAMES (2010):
Seizure induces activation of multiple subtypes of neural progenitors and growth factors in hippocampus with neuronal maturation confined to dentate gyrus.
Biochem Biophys Res Commun 393, 864-871
- JACOBS, M. P., G. G. LEBLANC, A. BROOKS-KAYAL, F. E. JENSEN, D. H. LOWENSTEIN, J. L. NOEBELS, D. D. SPENCER u. J. W. SWANN (2009):
Curing epilepsy: progress and future directions.
Epilepsy Behav 14, 438-445
- JEFFERYS, J. G. (1999):
Hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy: cause or consequence?
Brain 122 (Pt 6), 1007-1008
- JIN, K., X. O. MAO, Y. SUN, L. XIE, L. JIN, E. NISHI, M. KLAGSBRUN u. D. A. GREENBERG (2002):
Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo.
J Neurosci 22, 5365-5373
- JOKEIT, H. u. A. EBNER (1999):
Long term effects of refractory temporal lobe epilepsy on cognitive abilities: a cross sectional study.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 67, 44-50
- JORGENSEN, M. B., B. R. FINSEN, M. B. JENSEN, B. CASTELLANO, N. H. DIEMER u. J. ZIMMER (1993):
Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus.
Exp Neurol 120, 70-88
- JUN, Y., X. JIANGTAO, H. YUANGUI, S. YONGBIN, Z. JUN, M. XIAOJUN, X. JIANCHUN, X. HENG, Z. XIAOXIN u. X. XINXIANG (2009):
Erythropoietin pre-treatment prevents cognitive impairments following status epilepticus in rats.
Brain Res 1282, 57-66
- JUNG, K. H., K. CHU, M. KIM, S. W. JEONG, Y. M. SONG, S. T. LEE, J. Y. KIM, S. K. LEE u. J. K. ROH (2004):
Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus.
Eur J Neurosci 19, 3219-3226
- JUTILA, L., A. IMMONEN, K. PARTANEN, J. PARTANEN, E. MERVAALA, A. YLINEN, I. ALAFUZOFF, L. PALJARVI, K. KARKOLA, M. VAPALAHTI u. A. PITKANEN (2002):
Neurobiology of epileptogenesis in the temporal lobe.
Adv Tech Stand Neurosurg 27, 5-22
- KANNER, A. M. (2003a):
Depression in Epilepsy Is Much More Than a Reactive Process.
Epilepsy Curr 3, 202-203

- KANNER, A. M. (2003b):
Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment.
Biol Psychiatry 54, 388-398
- KANNER, A. M. (2008):
Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences.
Curr Opin Neurol 21, 190-194
- KANNER, A. M. (2009):
Psychiatric issues in epilepsy: the complex relation of mood, anxiety disorders, and epilepsy.
Epilepsy Behav 15, 83-87
- KEMPERMANN, G. (2006):
They are not too excited: the possible role of adult-born neurons in epilepsy.
Neuron 52, 935-937
- KEMPERMANN, G. u. F. H. GAGE (2000):
Neurogenesis in the adult hippocampus.
Novartis Found Symp 231, 220-235; discussion 235-241, 302-226
- KEMPERMANN, G., H. G. KUHN u. F. H. GAGE (1997):
More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.
Nature 386, 493-495
- KETTER, T. A., R. M. POST u. W. H. THEODORE (1999):
Positive and negative psychiatric effects of antiepileptic drugs in patients with seizure disorders.
Neurology 53, S53-67
- KIMISKIDIS, V. K., N. I. TRIANTAFYLLOU, E. KARARIZOU, S. S. GATZONIS, K. N. FOUNTOULAKIS, A. SIATOUNI, P. LOUCAIDIS, D. PSEFTOGIANNI, N. VLAIKIDIS u. G. S. KAPRINIS (2007):
Depression and anxiety in epilepsy: the association with demographic and seizure-related variables.
Ann Gen Psychiatry 6, 28
- KLEMENHAGEN, K. C., J. A. GORDON, D. J. DAVID, R. HEN u. C. T. GROSS (2006):
Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor.
Neuropsychopharmacology 31, 101-111
- KLUGER, E. K., R. MALIK u. M. GOVENDIR (2009):
Veterinarians' preferences for anticonvulsant drugs for treating seizure disorders in dogs and cats.
Aust Vet J 87, 445-449
- KNOWLES, K. (1998):
Idiopathic epilepsy.
Clin Tech Small Anim Pract 13, 144-151
- KOBAYASHI, T., H. YANASE, T. IWANAGA, R. SASAKI u. M. NAGAO (2002):
Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs.
Biochem Biophys Res Commun 296, 145-151

KOCH-STOECKER, S. (2002):

Personality disorders as predictors of severe postsurgical psychiatric complications in epilepsy patients undergoing temporal lobe resections.
Epilepsy Behav 3, 526-531

KONZIELLA, D., S. ALVESTAD, A. VAALER u. U. SONNEWALD (2007):

Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression?
J Neurochem 103, 2136-2152

KONESKI, J. A. u. E. B. CASELLA (2010):

Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: diagnosis and implications to the treatment.
Arq Neuropsiquiatr 68, 107-114

KOPPEL, B. S., L. SAMKOFF u. M. DARAS (1996):

Relation of cocaine use to seizures and epilepsy.
Epilepsia 37, 875-878

KORTE, S. M. u. S. F. DE BOER (2003):

A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze.
Eur J Pharmacol 463, 163-175

KUZNIECKY, R., S. HO, J. PAN, R. MARTIN, F. GILLIAM, E. FAUGHT u. H. HETHERINGTON (2002):

Modulation of cerebral GABA by topiramate, lamotrigine, and gabapentin in healthy adults.
Neurology 58, 368-372

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2000):

Early identification of refractory epilepsy.
N Engl J Med 342, 314-319

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):

Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.
Expert Rev Neurother 6, 397-406

LAMBERT, M. V. u. M. M. ROBERTSON (1999):

Depression in epilepsy: etiology, phenomenology, and treatment.
Epilepsia 40 Suppl 10, S21-47

LANGER, M., C. BRANDT u. W. LÖSCHER (2010):

Comparison of rats from different breeders in a model of temporal lobe epilepsy after induction of status epilepticus by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala.
FENS Abstr **5**:106.26

LEE, YIP u. JONES-GOTMAN (2002a):

Memory deficits after resection from left or right anterior temporal lobe in humans: a meta-analytic review.
Epilepsia 43, 283-291

LEE, J., W. DUAN u. M. P. MATTSON (2002b):

Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice.
J Neurochem 82, 1367-1375

LEIST, M., P. GHEZZI, G. GRASSO, R. BIANCHI, P. VILLA, M. FRATELLI, C. SAVINO, M. BIANCHI, J. NIELSEN, J. GERWIEN, P. KALLUNKI, A. K. LARSEN, L. HELBOE, S. CHRISTENSEN, L. O. PEDERSEN, M. NIELSEN, L. TORUP, T. SAGER, A. SFACTERIA, S. ERBAYRAKTAR, Z. ERBAYRAKTAR, N. GOKMEN, O. YILMAZ, C. CERAMI-HAND, Q. W. XIE, T. COLEMAN, A. CERAMI u. M. BRINES (2004):

Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic.
Science 305, 239-242

LICHTENWALNER, R. J., M. E. FORBES, S. A. BENNETT, C. D. LYNCH, W. E. SONNTAG u. D. R. RIDDLE (2001):

Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis.
Neuroscience 107, 603-613

LIU, B. u. J. S. HONG (2003):

Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention.
J Pharmacol Exp Ther 304, 1-7

LOPEZ-RODRIGUEZ, F., L. ALTSHULER, J. KAY, S. DELARHIM, M. MENDEZ u. J. ENGEL, JR. (1999):

Personality disorders among medically refractory epileptic patients.
J Neuropsychiatry Clin Neurosci 11, 464-469

LÖSCHER, W. (1997):

Animal models of intractable epilepsy.
Prog Neurobiol 53, 239-258

LÖSCHER, W. (1999):

Animal models of epilepsy and epileptic seizures.
In: Eadie MJ
und Vajda FJE (Eds.) Handbook of experimental pharmacology, Vol. 138,

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):

Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.
J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LOWENSTEIN, D. H., M. S. SEREN u. F. M. LONGO (1993):

Prolonged increases in neurotrophic activity associated with kainate-induced hippocampal synaptic reorganization.
Neuroscience 56, 597-604

LU, D., A. MAHMOOD, C. QU, A. GOUSSEV, T. SCHALLERT u. M. CHOPP (2005):

Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury.
J Neurotrauma 22, 1011-1017

LURTON, D., B. EL BAHH, L. SUNDSTROM u. A. ROUGIER (1998):

Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy.
J Neurol Sci 154, 133-136

LYDIARD, R. B. (2003):

The role of GABA in anxiety disorders.
J Clin Psychiatry 64 Suppl 3, 21-27

MAC, T. L., D. S. TRAN, F. QUET, P. ODERMATT, P. M. PREUX u. C. T. TAN (2007):
Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review.
Lancet Neurol 6, 533-543

MALLERET, G., R. HEN, J. L. GUILLOU, L. SEGU u. M. C. BUHOT (1999):
5-HT_{1B} receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial
memory performance in the Morris water maze.
J Neurosci 19, 6157-6168

MAMENISKIENE, R., D. JATUZIS, G. KAUBRYŠ u. V. BUDRYŠ (2006):
The decay of memory between delayed and long-term recall in patients with temporal lobe
epilepsy.
Epilepsy Behav 8, 278-288

MARCANGELO, M. J. u. F. OVSIEW (2007):
Psychiatric aspects of epilepsy.
Psychiatr Clin North Am 30, 781-802

MARQUES, C. M., L. O. CABOCLO, T. I. DA SILVA, M. H. NOFFS, H. CARRETE, JR., K.
LIN, J. LIN, A. C. SAKAMOTO u. E. M. YACUBIAN (2007):
Cognitive decline in temporal lobe epilepsy due to unilateral hippocampal sclerosis.
Epilepsy Behav 10, 477-485

MARTI, H. H. (2004):
Erythropoietin and the hypoxic brain.
J Exp Biol 207, 3233-3242

MARTI, H. H., R. H. WENGER, L. A. RIVAS, U. STRAUMANN, M. DIGICAYLIOGLU, V.
HENN, Y. YONEKAWA, C. BAUER u. M. GASSMANN (1996):
Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain.
Eur J Neurosci 8, 666-676

MARTINOVE, M. Epilepsy and dependence.
Neuropsychopharmacol Hung 12, 295-300

MASUDA, S., T. KOBAYASHI, M. CHIKUMA, M. NAGAO u. R. SASAKI (2000):
The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner.
Am J Physiol Endocrinol Metab 278, E1038-1044

MATHERN, G. W., J. L. LEIPHART, A. DE VERA, P. D. ADELSON, T. SEKI, L. NEDER u. J.
P. LEITE (2002):
Seizures decrease postnatal neurogenesis and granule cell development in the human fascia
dentata.
Epilepsia 43 Suppl 5, 68-73

MELDRUM, B. S. (1989):
GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy.
Br J Clin Pharmacol 27 Suppl 1, 3S-11S

MELETTI, S., F. BENUZZI, G. RUBBOLI, G. CANTALUPO, M. STANZANI MASERATI, P.
NICHELLI u. C. A. TASSINARI (2003):
Impaired facial emotion recognition in early-onset right mesial temporal lobe epilepsy.
Neurology 60, 426-431

- MILNER, B. (2003):
Visual recognition and recall after right temporal-lobe excision in man.
Epilepsy Behav 4, 799-812
- MING, G. L. u. H. SONG (2005):
Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.
Annu Rev Neurosci 28, 223-250
- MOHAPEL, P., C. T. EKDAHL u. O. LINDVALL (2004):
Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus.
Neurobiol Dis 15, 196-205
- MONTGOMERY, K. C. (1955):
The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.
J Comp Physiol Psychol 48, 254-260
- MOORE, P. M. u. G. A. BAKER (2002):
The neuropsychological and emotional consequences of living with intractable temporal lobe epilepsy: implications for clinical management.
Seizure 11, 224-230
- MORGAN, R. J. u. I. SOLTESZ (2008):
Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures.
Proc Natl Acad Sci U S A 105, 6179-6184
- MORRIS (1984):
Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.
J Neurosci Methods 11, 47-60
- MORRIS, P. GARRUD, J. N. RAWLINS u. J. O'KEEFE (1982):
Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.
Nature 297, 681-683
- NADAM, J., F. NAVARRO, P. SANCHEZ, C. MOULIN, B. GEORGES, A. LAGLAINE, J. M. PEQUIGNOT, A. MORALES, P. RYVLIN u. L. BEZIN (2007):
Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus.
Neurobiol Dis 25, 412-426
- NADLER, J. V. (2003):
The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain.
Neurochem Res 28, 1649-1658
- NAGAI, A., E. NAKAGAWA, H. B. CHOI, K. HATORI, S. KOBAYASHI u. S. U. KIM (2001):
Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture.
J Neuropathol Exp Neurol 60, 386-392
- NAKAGAWA, E., Y. AIMI, O. YASUHARA, I. TOOYAMA, M. SHIMADA, P. L. MCGEER u. H. KIMURA (2000):
Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy.
Epilepsia 41, 10-18

- NATSUME, J., Y. KUMAKURA, N. BERNASCONI, J. P. SOUCY, A. NAKAI, P. ROSA, M. FEDI, F. DUBEAU, F. ANDERMANN, R. LISBONA, A. BERNASCONI u. M. DIKSIC (2003):
Alpha-[11C] methyl-L-tryptophan and glucose metabolism in patients with temporal lobe epilepsy.
Neurology 60, 756-761
- NOH, H. S., Y. S. KIM, Y. H. KIM, J. Y. HAN, C. H. PARK, A. K. KANG, H. S. SHIN, S. S. KANG, G. J. CHO u. W. S. CHOI (2006):
Ketogenic diet protects the hippocampus from kainic acid toxicity by inhibiting the dissociation of bad from 14-3-3.
J Neurosci Res 84, 1829-1836
- NUNEZ, J. (2008):
Morris Water Maze Experiment.
J Vis Exp
- OLIVERIO, A., B. E. ELEFThERIOU u. D. W. BAILEY (1973):
Exploratory activity: genetic analysis of its modification by scopolamine and amphetamine.
Physiol Behav 10, 893-899
- PANKRATOVA, S., D. KIRYUSHKO, K. SONN, V. SOROKA, L. B. KOHLER, M. RATHJE, B. GU, K. GOTFRYD, O. CLAUSEN, A. ZHARKOVSKY, E. BOCK u. V. BEREZIN (2010):
Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor.
Brain
- PARENT, J. M., S. JANUMPALLI, J. O. MCNAMARA u. D. H. LOWENSTEIN (1998):
Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat.
Neurosci Lett 247, 9-12
- PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (1997):
Mossy fiber reorganization in the epileptic hippocampus.
Curr Opin Neurol 10, 103-109
- PARENT, J. M. u. G. G. MURPHY (2008):
Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis.
Epilepsia 49 Suppl 5, 19-25
- PARENT, J. M., T. W. YU, R. T. LEIBOWITZ, D. H. GESCHWIND, R. S. SLOVITER u. D. H. LOWENSTEIN (1997):
Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.
J Neurosci 17, 3727-3738
- PAULI, E., M. HILDEBRANDT, J. ROMSTOCK, H. STEFAN u. I. BLUMCKE (2006):
Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss.
Neurology 67, 1383-1389
- PAULI, E. u. H. STEFAN (2009a):
[Emotional and affective disorders in epilepsy].
Nervenarzt 80, 729-744
- PAULI, E. u. H. STEFAN (2009b):
[Emotional and affective disorders, anxiety and personality disorders in epilepsies].
Nervenarzt 80, 1440-1451

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005):

The rat brain in stereotactic coordinates.

Academic Press Sydney

PEKCEC, A., C. FUEST, M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u. H. POTSCCHKA (2008):

Targeting epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by enzymatic depolysialylation of NCAM counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact epilepsy development.

J Neurochem 105, 389-400

PEKCEC, A., M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u. H. POTSCCHKA (2007):

Impact of the PSA-NCAM system on pathophysiology in a chronic rodent model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiol Dis 27, 54-66

PEKCEC, A. u. H. POTSCCHKA (2007):

Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks.

Neuroreport 18, 585-589

PELLOW, S., P. CHOPIN, S. E. FILE u. M. BRILEY (1985):

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.

J Neurosci Methods 14, 149-167

PERTWEE, R. G. (1988):

The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids.

Pharmacol Ther 36, 189-261

PITKANEN, A. (2002):

Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models.

Epilepsy Res 50, 141-160

PITKANEN, A., I. KHARATISHVILI, H. KARHUNEN, K. LUKASIUK, R. IMMONEN, J. NAIRISMAGI, O. GROHN u. J. NISSINEN (2007):

Epileptogenesis in experimental models.

Epilepsia 48 Suppl 2, 13-20

PITKANEN, A. u. T. P. SUTULA (2002):

Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy.

Lancet Neurol 1, 173-181

PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995):

Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population.

J Am Vet Med Assoc 206, 1721-1728

POTSCCHKA, H., H. A. VOLK u. A. PEKCEC (2009):

Aktueller Stand und Trends in der

Epilepsitherapie bei Hund und Katze. Tierärztl Prax. 2009;37(K):211-7.

PRUT, L. u. C. BELZUNG (2003):

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.

Eur J Pharmacol 463, 3-33

- RABIE, T. u. H. H. MARTI (2008):
Brain protection by erythropoietin: a manifold task.
Physiology (Bethesda) 23, 263-274
- RACINE, R. J. (1975):
Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 38, 1-12
- RAMOS, A. (2008):
Animal models of anxiety: do I need multiple tests?
Trends Pharmacol Sci 29, 493-498
- RAO, M. S. u. A. K. SHETTY (2004):
Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.
Eur J Neurosci 19, 234-246
- REMY, S., S. GABRIEL, B. W. URBAN, D. DIETRICH, T. N. LEHMANN, C. E. ELGER, U. HEINEMANN u. H. BECK (2003):
A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.
Ann Neurol 53, 469-479
- RIBAK, C. E., P. H. TRAN, I. SPIGELMAN, M. M. OKAZAKI u. J. V. NADLER (2000):
Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry.
J Comp Neurol 428, 240-253
- RICHERSON, G. B. u. Y. WU (2004):
Role of the GABA transporter in epilepsy.
Adv Exp Med Biol 548, 76-91
- ROTHMAN, D. L., O. A. PETROFF, K. L. BEHAR u. R. H. MATTSON (1993):
Localized ¹H NMR measurements of gamma-aminobutyric acid in human brain in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A 90, 5662-5666
- SALUM, C., S. MORATO u. A. C. ROQUE-DA-SILVA (2000):
Anxiety-like behavior in rats: a computational model.
Neural Netw 13, 21-29
- SANCHEZ, C. (1997):
Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box.
Eur Neuropsychopharmacol 7, 283-288
- SANDER, J. W. u. S. D. SHORVON (1996):
Epidemiology of the epilepsies.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 61, 433-443
- SAVIC, I., P. LINDSTROM, B. GULYAS, C. HALLDIN, B. ANDREE u. L. FARDE (2004):
Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy.
Neurology 62, 1343-1351
- SCHARFMAN, H. E., J. H. GOODMAN u. A. L. SOLLAS (2000):
Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis.
J Neurosci 20, 6144-6158

SCHARFMAN, H. E. u. W. P. GRAY (2007):

Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy.
Epilepsia 48 Suppl 2, 33-41

SCHMIDT, D. (1992):

Taschenatlas Epilepsien.
W. Zuckschwerdt Verlag,
Germering.

SCHMITZ, B. (2006):

Effects of antiepileptic drugs on mood and behavior.
Epilepsia 47 Suppl 2, 28-33

SCOTT, B. W., S. WANG, W. M. BURNHAM, U. DE BONI u. J. M. WOJTOWICZ (1998):

Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat.
Neurosci Lett 248, 73-76

SERESS, L. u. L. MRZLJAK (1987):

Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations.
Brain Res 405, 169-174

SHANG, Y., Y. WU, S. YAO, X. WANG, D. FENG u. W. YANG (2007):

Protective effect of erythropoietin against ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons: involvement of PI3K/Akt and GSK-3 beta pathway.
Apoptosis 12, 2187-2195

SHAPIRO, L. A., C. E. RIBAK u. S. JESSBERGER (2008a):

Structural changes for adult-born dentate granule cells after status epilepticus.
Epilepsia 49 Suppl 5, 13-18

SHAPIRO, L. A., L. WANG u. C. E. RIBAK (2008b):

Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats.
Epilepsia 49 Suppl 2, 33-41

SHETTY, A. K., V. ZAMAN u. G. A. SHETTY (2003):

Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting.
J Neurochem 87, 147-159

SHIMADA, T., K. MATSUMOTO, M. OSANAI, H. MATSUDA, K. TERASAWA u. H. WATANABE (1995):

The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs.
Gen Pharmacol 26, 205-210

SHIN, H. J., J. Y. LEE, E. SON, D. H. LEE, H. J. KIM, S. S. KANG, G. J. CHO, W. S. CHOI u. G. S. ROH (2007):

Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice.
Neurosci Lett 416, 49-54

- SIMISTER, R. J., M. A. MCLEAN, G. J. BARKER u. J. S. DUNCAN (2003):
A proton magnetic resonance spectroscopy study of metabolites in the occipital lobes in epilepsy.
Epilepsia 44, 550-558
- SIMONATO, M., E. TONGIORGI u. M. KOKAIA (2006):
Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy.
Trends Pharmacol Sci 27, 631-638
- SIMONS, J. S. u. H. J. SPIERS (2003):
Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory.
Nat Rev Neurosci 4, 637-648
- SIREN, A. L. u. H. EHRENREICH (2001):
Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection.
Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 251, 179-184
- SIREN, A. L., T. FASSHAUER, C. BARTELS u. H. EHRENREICH (2009):
Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system.
Neurotherapeutics 6, 108-127
- SLOVITER, R. S. (1999):
Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization.
Epilepsia 40 Suppl 1, S34-39; discussion S40-31
- SLOVITER, R. S., E. DEAN, A. L. SOLLAS u. J. H. GOODMAN (1996):
Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat.
J Comp Neurol 366, 516-533
- SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009):
The seizing cat. Diagnostic work-up and therapy.
J Feline Med Surg 11, 385-394
- SPIGELMAN, I., X. X. YAN, A. OBENAU, E. Y. LEE, C. G. WASTERLAIN u. C. E. RIBAK (1998):
Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy.
Neuroscience 86, 109-120
- STAFSTROM, C. E. (2006):
Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science.
J Cereb Blood Flow Metab 26, 983-1004
- STEFAN, H. u. E. PAULI (2008):
[Cognition and epilepsies].
Nervenarzt 79 Suppl 2, 77-91; quiz 92
- STEPIEN, K., M. TOMASZEWSKI u. S. J. CZUCZWAR (2005):
Profile of anticonvulsant activity and neuroprotective effects of novel and potential antiepileptic drugs--an update.
Pharmacol Rep 57, 719-733
- STERIO, D. C. (1984):
The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector.
J Microsc 134, 127-136

- STRASSER, A., L. O'CONNOR u. V. M. DIXIT (2000):
Apoptosis signaling.
Annu Rev Biochem 69, 217-245
- STREIT, W. J., S. A. WALTER u. N. A. PENNELL (1999):
Reactive microgliosis.
Prog Neurobiol 57, 563-581
- SUTULA, T. (2002):
Seizure-Induced Axonal Sprouting: Assessing Connections Between Injury, Local Circuits, and Epileptogenesis.
Epilepsy Curr 2, 86-91
- SUTULA, T., G. CASCINO, J. CAVAZOS, I. PARADA u. L. RAMIREZ (1989):
Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe.
Ann Neurol 26, 321-330
- SUZUKI, F., M. P. JUNIER, D. GUILHEM, J. C. SORENSEN u. B. ONTENIENTE (1995):
Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor.
Neuroscience 64, 665-674
- SWINKELS, W. A., J. KUYK, E. H. DE GRAAF, R. VAN DYCK u. P. SPINHOVEN (2001):
Prevalence of Psychopathology in Dutch Epilepsy Inpatients: A Comparative Study.
Epilepsy Behav 2, 441-447
- SWINKELS, W. A., J. KUYK, R. VAN DYCK u. P. SPINHOVEN (2005):
Psychiatric comorbidity in epilepsy.
Epilepsy Behav 7, 37-50
- SYNTICHAKI, P. u. N. TAVERNARAKIS (2003):
The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?
Nat Rev Neurosci 4, 672-684
- SZYNDLER, J., T. WIERZBA-BOBROWICZ, A. SKORZEWSKA, P. MACIEJAK, J. WALKOWIAK, W. LECHOWICZ, D. TURZYNSKA, A. BIDZINSKI u. A. PLAZNIK (2005):
Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures.
Pharmacol Biochem Behav 81, 15-23
- TALLIS, R., G. HALL, I. CRAIG u. A. DEAN (1991):
How common are epileptic seizures in old age?
Age Ageing 20, 442-448
- TEJADA, J., G. G. BOSCO, S. MORATO u. A. C. ROQUE (2009):
Characterization of rat behavior in the elevated plus-maze using a directed graph.
J Neurosci Methods 184, 251-255
- THAPAR, A., M. ROLAND u. G. HAROLD (2005):
Do depression symptoms predict seizure frequency--or vice versa?
J Psychosom Res 59, 269-274

- THEODORE, W. H., S. S. SPENCER, S. WIEBE, J. T. LANGFITT, A. ALI, P. O. SHAFER, A. T. BERG u. B. G. VICKREY (2006):
Epilepsy in North America: a report prepared under the auspices of the global campaign against epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the International League Against Epilepsy, and the World Health Organization.
Epilepsia 47, 1700-1722
- THOMAS, W. B. Idiopathic epilepsy in dogs and cats.
Vet Clin North Am Small Anim Pract 40, 161-179
- TOCZEK, M. T., R. E. CARSON, L. LANG, Y. MA, M. V. SPANAKI, M. G. DER, S. FAZILAT, L. KOPYLEV, P. HERSCOVITCH, W. C. ECKELMAN u. W. H. THEODORE (2003):
PET imaging of 5-HT_{1A} receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy.
Neurology 60, 749-756
- TOOYAMA, I., J. P. BELLIER, M. PARK, P. MINNASCH, S. UEMURA, T. HISANO, M. IWAMI, Y. AIMI, O. YASUHARA u. H. KIMURA (2002):
Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy.
Epilepsia 43 Suppl 9, 39-43
- TREIT, D., J. MENARD u. C. ROYAN (1993):
Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.
Pharmacol Biochem Behav 44, 463-469
- TUUNANEN, J., T. HALONEN u. A. PITKANEN (1997):
Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 26, 315-327
- UZUM, G., A. SARPER DILER, N. BAHCEKAPILI u. Y. ZIYA ZIYLAN (2006):
Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures.
Life Sci 78, 2571-2576
- VAIDYA, V. A., J. A. SIUCIAK, F. DU u. R. S. DUMAN (1999):
Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures.
Neuroscience 89, 157-166
- VAN PRAAG, H., A. F. SCHINDER, B. R. CHRISTIE, N. TONI, T. D. PALMER u. F. H. GAGE (2002):
Functional neurogenesis in the adult hippocampus.
Nature 415, 1030-1034
- VAZQUEZ, B. u. O. DEVINSKY (2003):
Epilepsy and anxiety.
Epilepsy Behav 4 Suppl 4, S20-25
- VELISEK, L. u. S. L. MOSHE (2003):
Temporal lobe epileptogenesis and epilepsy in the developing brain: bridging the gap between the laboratory and the clinic. Progression, but in what direction?
Epilepsia 44 Suppl 12, 51-59

- VELISKOVA, J., L. VELISEK, A. S. GALANOPOULOU u. E. F. SPERBER (2000):
Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus.
Epilepsia 41 Suppl 6, S30-35
- VELLY, L., L. PELLEGRINI, B. GUILLET, N. BRUDER u. P. PISANO (2010):
Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword?
Pharmacol Ther 128, 445-459
- VERROTTI, A., A. CICONETTI, B. SCORRANO, D. DE BERARDIS, C. COTELLESA, F. CHIARELLI u. F. M. FERRO (2008):
Epilepsy and suicide: pathogenesis, risk factors, and prevention.
Neuropsychiatr Dis Treat 4, 365-370
- VILLA, P., P. BIGINI, T. MENNINI, D. AGNELLO, T. LARAGIONE, A. CAGNOTTO, B. VIVIANI, M. MARINOVICH, A. CERAMI, T. R. COLEMAN, M. BRINES u. P. GHEZZI (2003):
Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis.
J Exp Med 198, 971-975
- VOLLMANN-HONSDORF, G. (2001):
Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle morphologische Veränderungen in der Hippocampusformation von *Tupaia (Tupaia belangeri)* als Folge von chronisch psychosozialem Stress.
- VORHEES, C. V. u. M. T. WILLIAMS (2006):
Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory.
Nat Protoc 1, 848-858
- WALSH, R. N. u. R. A. CUMMINS (1976):
The Open-Field Test: a critical review.
Psychol Bull 83, 482-504
- WANG, Y. NODA, H. TSUNEKAWA, Y. ZHOU, M. MIYAZAKI, K. SENZAKI u. T. NABESHIMA (2007):
Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety.
Behav Brain Res 178, 262-273
- WANG, B. W. SCOTT u. J. M. WOJTOWICZ (2000):
Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat.
J Neurobiol 42, 248-257
- WANG, S. YU, A. SIMONYI, G. ROTTINGHAUS, G. Y. SUN u. A. Y. SUN (2004a):
Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid.
Neurochem Res 29, 2105-2112
- WANG, Z. ZHANG, Y. WANG, R. ZHANG u. M. CHOPP (2004b):
Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats.
Stroke 35, 1732-1737
- WENZEL, H. J., C. A. ROBBINS, L. H. TSAI u. P. A. SCHWARTZKROIN (2001):
Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures.

J Neurosci 21, 983-998

WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):
Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.
Anat Rec 231, 482-497

WILLIAMS, C. STEEL, G. B. SHARP, E. DELOSREYES, T. PHILLIPS, S. BATES, B. LANGE u. M. L. GRIEBEL (2003):
Anxiety in children with epilepsy.
Epilepsy Behav 4, 729-732

WILLIAMS, J. P. WUARIN, P. DOU, D. J. FERRARO u. F. E. DUDEK (2002):
Reassessment of the effects of cycloheximide on mossy fiber sprouting and epileptogenesis in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.
J Neurophysiol 88, 2075-2087

WITT, J. A., K. HOLLMANN u. C. HELMSTAEDTER (2008):
The impact of lesions and epilepsy on personality and mood in patients with symptomatic epilepsy: a pre- to postoperative follow-up study.
Epilepsy Res 82, 139-146

WOJTOWICZ, J. M. (2008):
Potential consequences of altered neurogenesis on learning and memory in the epileptic brain.
Epilepsia 49 Suppl 5, 42-49

WOLFER, D. P., M. STAGLJAR-BOZICEVIC, M. L. ERRINGTON u. H. P. LIPP (1998):
Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact?
News Physiol Sci 13, 118-123

WONG, C. G., T. BOTTIGLIERI u. O. C. SNEAD, 3RD (2003):
GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease.
Ann Neurol 54 Suppl 6, S3-12

YANG, F., Z. R. LIU, J. CHEN, S. J. ZHANG, Q. Y. QUAN, Y. G. HUANG u. W. JIANG (2010):
Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats.
J Neurosci Res 88, 519-529

YOSHIMURA, S., T. TERAMOTO, M. J. WHALEN, M. C. IRIZARRY, Y. TAKAGI, J. QIU, J. HARADA, C. WAEBER, X. O. BREAKFIELD u. M. A. MOSKOWITZ (2003):
FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice.
J Clin Invest 112, 1202-1210

YUAN, J., M. LIPINSKI u. A. DEGTEREV (2003):
Diversity in the mechanisms of neuronal cell death.
Neuron 40, 401-413

ZIMMERMANN, R., V. I. HULSMEYER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2009):
Status epilepticus and epileptic seizures in dogs.
J Vet Intern Med 23, 970-976

10 ANHANG

10.1 Geräte

Geräte für die Stimulation der BLA und die Überwachung

Geräte	Hersteller
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim
Stimulatoreinheit	World Precision Instruments, Berlin
Personal Computer	Diverse Bezugsquellen
Stimulations- und EEG-Kabel	Conrad Elektronik, München
EEG-Software	AD-Instruments, Spechbach
EEG-Ableitung	AD-Instruments, Spechbach
Beobachtungskäfige	Domes Aquaristik, München
Videokamera	Conrad Elektronik, München und Hannover

Geräte für die Verhaltensuntersuchungen

Geräte	Typ-Bezeichnung	Bezugsquelle
Videokamera	CCTV schwarz/weiß Kamera	Panasonic, Japan
Verhaltenssoftware	NoldusXT Programm	Noldus Ethovision, Niederlande
MP3-Player	Axxion AMP210	Axxion, Munsbach
Personal Computer	Panasonic CCTV	Panasonic, Japan

Sonstige Geräte

Geräte	Hersteller
Bildanalysesoftware: KS 400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision) und AxioVision Release 4.6	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Stereo Investigator	MicroBrightField Europe, Magdeburg
Leica DMLB Mikroskop	Leica, Bensheim
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss GmbH, Jena
BH2 Mikroskop	Olympus, Japan
Farbkamera AxioCam	Zeiss GmbH, Jena
Kryostat	Frigocut 2800, Reichert Jung, Wetzlar

10.2 Lösungen und Substanzen

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)

- in Aqua dest.
- 5,7% Na₂HPO₄
- 1,2% NaH₂PO₄
- mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung

- 0,2 Mol Phosphatpuffer + NaCl, mit Aqua dest. auffüllen

4% Paraformaldehyd

- 8% Paraformaldehyd in Aqua dest. auf 60 – 70 °C erhitzen abkühlen lassen
- mit 1 M NaOH Lösung klären
- filtrieren
- mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 4%ige Lösung verdünnen

0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)

- 18g NaCl
- 12,1g Tris[hydroxymethyl]-aminomethan (50mM)
- Ad 2l Aqua dest, pH 7,6

TRIS-Nickel-Lösung

- in 0,05 M TBS
- 0,6% Ammonium-Nickelsulfat
- mit 1 M NaOH auf pH 7,6 einstellen

DAB-Lösung

- 1mg DAB (in 100µl Aqua dest. lösen) + 4ml Tris/Ni-Lösung + 1 µl H₂O₂

Carrier-Lösung

- in 100 ml TBS
- 1ml Serum
- 1g Rinderserumalbumin
- 1,5ml 20% Triton X100

Blocking-Lösung

- in 9 ml Carrier
- 1ml Serum
- 200mg Rinderserumalbumin

Gefriermedium

- 4,28 g Glukose
- 0,07 MgCl-Hexahydrat in 25 ml 0,1 M PBS lösen
- ad 50 ml Glycerin

Thionin (Färbelösung)

- 100 ml 1M Essigsäure + 36 ml 1M NaOH
- auf 1L mit Aqua dest. auffüllen
- auf 60 – 70 °C erhitzen
- darin 1,25 g Thionin lösen
- 1h auf dem Magnetrührer rühren
- anschließend heiß filtrieren

Chrom-Gelantine-Lösung

- 0,7 g Gelantine + 0,07 g Chrom III
- mit 100 ml Aqua dest. vermischen
- langsam auf 60 °C hochheizen, bis sich Gelantine gelöst hat
- langsam abkühlen lassen
- eine Messerspitze Tymol dazu geben

Natrium-Citrat

- 10 mM Tri-NaCitrat Dihydrat: 2,94g NaCitrat Dihydrat auf 1000ml Aqua dest., pH 9,0

SSC-Stammlösung x20

- 3 M NaCl (175,32g/l) + 0,3M NaCitrat Dihydrat (88,23g/l)

Formamid/SSC

- 4xSSC: 20x SSC 1:5 verdünnt + 0,06M NaCitrat Dihydrat
- 2ml 100% Formamid + 2ml 4x SSC

Zuckerlösung

- 6g Zucker
- ad 20g 0,1mol Phosphatpuffer

Thionin-Färbung

- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Aqua dest.
- 20 sek in Thionin
- 3 min in 50% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Terpeneol/Xylol-Ersatzmedium 1:1
- 3 min in Xylol-Ersatzmedium
- 3 min in frisches Xylol-Ersatzmedium
- mit Entellan eindecken

Substanzen

Substanzen	Bezugsquelle
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromdesoxyuridinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bupivacain	Mibe GmbH, Brehna
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Roth, Karlsruhe
Diazepam (Diazepam-ratiopharm [®])	Heiland, Hamburg
Einbettmedium (Tissue Freezing)	Jung, Nussloch
Entellan-Eindeckmittel	E. Merck AG, Darmstadt
Essigsäure 99,8%	Roth, Karlsruhe
Erythropoetin (Erypo [®])	Janssen-Cilag, Neuss
Ethacridinlactat (Rivanol [®])	WDT, Garbsen
Ethanol 99,8%	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gelatine, gepulvert	E. Merck AG, Darmstadt
Gentamycinsulfat	WDT, Garbsen
Kunststoff, Kaltpolymerisat (Paladur [®])	Heraeus, Hanau
Marbocyl [®]	Vétoquinol, Ravensburg
Natrium-Chlorid-Lösung (isoton)	Braun, Tuttlingen
Natrium-Citratdihydrat	Roth, Karlsruhe
Objektträger Elka	Hartenstein, Würzburg
pHBSP und scrambled pHBSP	GL Biochem Ltd., Shanghai
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Serum	AbS Serotec, Santa Cruz
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Jackson Immuno Research
Streptavidin-Cy2	Jackson Immuno Research
Thionin (Acetate Salt)	Roth, Karlsruhe
Toluol	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan	Roth, Karlsruhe
Vitagel Augengel	Bausch und Lomb, Berlin
Triton X100	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Xylol-Ersatz-Medium (Rotinol [®])	Roth, Karlsruhe

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Potschka für die Überlassung des Themas, der wissenschaftlichen Anleitung bei der Planung und Durchführung der Versuche, den jederzeit großen persönlichen Einsatz, sowie der Abfassung dieser Dissertation. Des Weiteren bedanke ich mich für die uneingeschränkte Hilfestellung bei allen wissenschaftlichen Fragen, dem mir entgegen gebrachten Vertrauen, sowie der Förderung meines beruflichen Werdegangs.

Christina Zellinger danke ich für die kompetente Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Erlaubnis, sie an jedem Tag und zu jeder Zeit für jedes Problem oder Problemchen anrufen oder anschreiben zu können. Des Weiteren danke ich ihr für die unermüdliche Hilfsbereitschaft, Geduld und Motivation.

Ariane Schmidt danke ich für sämtliche Hilfestellungen, vor allem bei der Etablierung der Verhaltensuntersuchungen, sowie ihrer jederzeit freundlichen Unterstützung.

Janine Avemary und Martin Hadamitzky möchte ich für ihre Bereitschaft danken mir mit Rat und Tat vor allem bei Statistikfragen zur Seite zu stehen. Des Weiteren danke ich ihnen für ihr stets offenes Ohr zu wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Belangen und Fragen.

Anton Pekcec danke ich für die Mitgestaltung des Projektes und der tatkräftigen Unterstützung zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Meinen Doktorandenkollegen Hannes, Vera und Sarah möchte ich für ihre großartige Unterstützung bei allen „Gemeinschaftsprojekten“ und für viele interessante und lustige Gespräche im Doktorandenzimmer danken. Des Weiteren danke ich Josie, Lotta und Mehrnoosh.

Katharina Gabriel danke ich für die fürsorgliche Pflege und Versorgung der Versuchstiere.

Besonders bedanken möchte ich mich für die tägliche freundliche und kompetente Unterstützung vor allem bei Heidi Zankl, Marion Fisch, Carmen Meyer, Andrea Wehmeyer, Angela Vicidomini, Sieglinde Fischlein, Regina Rentsch und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts.

Der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, welche die Umsetzung dieses Projektes ermöglicht hat (DFG FOR 1103).