

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.- Prof. Dr. H. Potschka

---

**Pharmakologische Modulation des  
Endocannabinoidsystems im Amygdala-Kindling-  
Modell der Temporallappenepilepsie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

von

**Hannes Wendt**

**aus Baden-Baden**

**München 2011**

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

*Für meine Eltern*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Epilepsien.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Bedeutung und Definition.....	3
1.2.	Tiermodelle.....	5
<b>2.</b>	<b>Antiepileptika.....</b>	<b>7</b>
2.1.	Therapie beim Haustier.....	8
2.2.	Therapie beim Menschen.....	9
<b>3.</b>	<b>Hippocampale Neurogenese.....</b>	<b>10</b>
3.1.	Neurogenese im adulten Gehirn.....	10
3.2.	Neurogenese im epileptischen Gehirn.....	12
3.3.	Pharmakologische Modulation der hippocampalen Neurogenese.....	13
<b>4.</b>	<b>Endocannabinoidsystem.....</b>	<b>14</b>
4.1.	Einführung.....	14
4.2.	Cannabinoide und andere Modulatoren des Endocannabinoidsystems.....	17
<b>III.</b>	<b>ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>1.</b>	<b>Modulation des Endocannabinoidsystems im Kindling-Modell 22</b>	
1.1.	Versuchstiere.....	22
1.2.	Implantation der Elektrode.....	22
1.3.	Kindling.....	24
1.4.	Substanzversuche.....	27
1.5.	Histologische Gewebeaufbereitung.....	29
1.6.	Immunhistochemie.....	30
1.7.	Auswertung.....	32
1.8.	Statistik.....	33
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>

---

<b>1.</b>	<b>Effekt von Modulatoren des Endocannabinoid-systems auf die Kindling-Progression und assoziierte zellulare Veränderungen .....</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>Effekt von Modulatoren des Endocannabinoid-systems auf Krampfschwellen an vollgekindelten Tieren .....</b>	<b>42</b>
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>54</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>
<b>X.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>77</b>
<b>2.</b>	<b>Lösungen und Substanzen .....</b>	<b>78</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>82</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
ADD	Nachentladungsdauer
ADT	Nachentladungsschwelle
AE	Antiepileptika
Aqua dest.	Aqua destillata
ap	anterior posterior
BLA	basolaterale Amygdala
BrdU	5'Bromodeoxyuridin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
ca.	zirka
d	day (Tag)
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
dv	dorsoventral
GD	Gyrus Dentatus
d.h.	das heißt
ECS	Endocannabinoidsystem
EEG	Elektroenzephalogramm
etc.	et cetera
Fa.	Firma
g	Gramm
h	hour (Stunde)
HRP	Horseraddish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
lat	lateral
max.	maximal
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
µA	Mikroampère
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
Nr	Nummer
OP	Operation

---

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
s.c.	subkutan
sek	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SE	Status epilepticus
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SGZ	subgranuläre Zone
s.o.	siehe oben
sog.	so genanntes
SS	Anfallsschwere
s.u.	siehe unten
SVZ	subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TLE	Temporallappenepilepsie
u.a.	unter anderem
URB	URB 597
VEH	Vehikel
WIN	WIN55.212-2
Wo	Woche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem



## I. EINLEITUNG

Die Epilepsie stellt die häufigste primär nicht entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems bei Hund und Katze dar. Mit 50 Millionen Betroffenen weltweit gilt die Epilepsie auch beim Menschen als häufigste chronisch neurologische Erkrankung.

Dieser Krankheit liegt zumeist eine symptomatische Ursache, wie ein Schädelhirntrauma, ein Tumor oder eine Enzephalitis zugrunde. Die bei der Entstehung von Epilepsien beteiligten Veränderungen werden unter dem Begriff Epileptogenese zusammengefasst und sind durch entzündliche, neurodegenerative sowie funktionelle neuronale Veränderungen charakterisiert. Die Standardtherapie basiert nach wie vor auf der symptomatischen Unterdrückung der Anfallsaktivität durch chronische Applikation von Antiepileptika. Die Therapieziele Anfallsfreiheit oder relative Reduktion der Anfallsfrequenz werden allerdings bei bis zu 30% der Tiere nicht erreicht. Da in der Veterinärmedizin therapeutische Alternativen, wie z.B. die chirurgische Behandlung, nicht etabliert sind, werden Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie und hoher Anfallsfrequenz häufig euthanasiert. Aus diesem Grund wären präventive Strategien zur Vorbeugung der Entstehung einer symptomatischen Epilepsie, die sich nach einer initialen Hirnschädigung entwickelt, von besonderem Interesse. Da sich Veränderungen häufig nur langsam nach einem initialen Hirninsult entwickeln, gibt dies die Möglichkeit pharmakologisch in die Prozesse der Epileptogenese einzugreifen. Von großer Bedeutung für die Epileptogenese scheinen Veränderungen in der neuronalen Plastizität und insbesondere Störungen bei der Neurogenese, also der Neubildung von Neuronen, zu sein. Diese anfallsinduzierten Veränderungen könnten an der Ausbildung eines sogenannten übererregbaren epileptischen Netzwerks beteiligt sein.

Diese Arbeit sollte zeigen, in wieweit solche Prozesse durch eine Beeinflussung des Endocannabinoidsystems zu modulieren sind. Speziell das therapeutische Potential eines Cannabinoid1-Rezeptor-Agonisten und eines FAAH-Inhibitors wurde hierbei untersucht. Da die genauen

Mechanismen der Epileptogenese noch weitgehend unbekannt sind, wollten wir eine mögliche Rolle des Endocannabinoidsystems im Verlauf der Krankheitsentstehung beleuchten. Frühere Studien zeigten aber bereits erste Hinweise für einen krankheitsmodulierenden Effekt durch die Beeinflussung des endocannabinoiden Systems.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zudem zu einer Erweiterung des Wissenstandes auf dem Gebiet der pharmakologischen Modulation der Neurogenese im Epilepsiemodell beitragen.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Epilepsien**

#### **1.1. Bedeutung und Definition**

Bei der Epilepsie handelt es sich um die häufigste chronische Krankheit des zentralen Nervensystems bei Hund, Katze und Mensch. Etwa 5% der Bevölkerung erleiden im Laufe ihres Lebens einen epileptischen Anfällen (LOSCHER 1993). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) entwickelt sich eine aktive Epilepsie hingegen bei etwa 0,6% in Europa, dies entspricht ca. 500.000 Menschen in Deutschland. Man spricht erst dann vom eigenständigen Krankheitsbild der Epilepsie, wenn der Betroffene mindestens zwei aufeinanderfolgende Anfälle hatte. Die Prävalenz liegt beim Hund bei 0,5-5,7% (BIELFELT et al. 1971; PATTERSON et al. 2005; CHANDLER 2006). In der Tiermedizin sind vor allem Hund und Katze betroffen, wobei auch andere Spezies an Epilepsie erkranken können (z.B. juvenile idiopathische Epilepsie bei Araberfohlen) (POTSCHKA et al. 2009).

Das Risiko für den Menschen, an Epilepsie zu erkranken, ist in den ersten Lebensjahren und ab dem 60. Lebensjahr besonders hoch. Die jährliche Rate an Neuerkrankungen in Deutschland entspricht ca. 35.000 Menschen. Diese Rate fällt in Entwicklungsländern doppelt so hoch aus, was mit einem erhöhten Risiko für Gehirnschädigungen (Meningitis, Malaria) zu erklären ist. Oft sind organische Veränderungen des Großhirns (Infektionen, Neoplasien, vaskuläre Insulte) oder extrazerebrale, metabolische Störungen wie Intoxikationen der Ursprung einer Epilepsie (HAUSER u. BEGHI 2008).

Seit 1981 ist die International League against Epilepsy (ILAE) und das International Bureau for Epilepsy (IBE) maßgeblich zuständig für die Terminologie und Klassifikation von Anfalls- und Epilepsieformen. Laut ILAE bezeichnet der Begriff Epilepsie eine Funktionsstörung des Gehirns, die in erster Linie durch wiederkehrende und unvorhersehbare Unterbrechungen einer normalen Gehirnfunktion, den sogenannten

epileptischen Anfällen, charakterisiert ist. Dabei besteht eine Prädisposition zur Entwicklung von epileptischen Anfällen, welche als ein vorübergehendes Auftreten von Symptomen durch abnormale, übermäßige oder synchrone neuronale Aktivität im Gehirn definiert werden. Epileptische Anfälle können als fokal (partiell), generalisiert und unklassifizierbar eingestuft werden (KWAN u. BRODIE 2006). Der fokale (partielle) Anfall ist dadurch gekennzeichnet, dass es ein Zeichen für einen Beginn des Anfallsgeschehens in einer umschriebenen Region des Gehirns gibt. Dabei kann es auch zu einer sekundären Ausbreitung auf die restliche Hirnrinde kommen (sekundäre Generalisierung) (MELDRUM 1990). Der generalisierte Anfall wird als solcher bezeichnet, wenn der Verlauf und die Symptome keine Hinweise auf eine anatomisch begrenzte Lokalisation geben und keine Zeichen eines lokalen (herdförmigen) Ursprungs zu erkennen sind (BROWNE u. HOLMES 2001). Fokale Anfälle zeigen sich klinisch oft nur als unwillkürliche Bewegungen einzelner Muskelgruppen. Komplex-fokale Anfälle können mit Störungen des Bewusstseins einhergehen. Des Weiteren können motorische Funktionsstörungen in tonisch (Streckkrämpfe), klonisch (Ruderkrämpfe), tonisch-klonisch, atonisch (Erschlaffung) oder myoklonisch (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt) unterteilt werden. Bei Hund und Katze sind generalisierte Anfälle zumeist myoklonischer oder tonisch-klonischer Natur.

Anfälle, die ausreichend lange andauern oder sich schnell genug wiederholen damit eine Erholung zwischen den Anfällen nicht stattfindet, werden als Status epilepticus bezeichnet.

Die Vielzahl von Syndromen, die als Epilepsie bezeichnet werden, können aufgrund ihrer Ätiologie unterteilt werden in idiopathisch, symptomatisch und kryptogen (KWAN u. BRODIE 2006). Allerdings beabsichtigt die ILEA diese Einteilung zukünftig durch genetisch, strukturell-metabolisch und unbekannt zu ersetzen (BERG et al. 2010).

Nach einer Klassifikation der ILAE gibt es Anfallsgeschehen (akuter Anfall), die die Diagnose einer Epilepsie nicht begründen. Dazu zählen Fieberkrämpfe bei Kleinkindern oder auch Anfälle durch ein akutes Ereignis wie z.B. Drogen, Alkohol oder Schlafmangel.

Anders als in der Humanmedizin, in der epileptische Anfälle und Syndrome in viele Subtypen eingeteilt werden, erfolgt die Einteilung beim Tier primär nach Anfallsmuster und Ätiologie (POTSCHKA et al. 2009).

In der Tiermedizin wird eine kryptogene Ursache terminologisch nur selten verwendet. Additiv zur idiopathischen und symptomatischen Epilepsie werden die sogenannten reaktiven epileptischen Anfälle aufgeführt (PODELL u. FENNER 1993; BERENDT et al. 2004). Reaktive epileptische Anfälle werden jedoch auch bei wiederholten Anfällen nicht als Epilepsie bezeichnet, da keine primär chronische Funktionsstörung des Gehirns zugrunde liegt (PODELL 1996). Es handelt sich indessen um eine vorübergehende systemische Störung wie z.B. eine Elektrolytimbalance (endogen) oder eine Vergiftung (exogen).

Je nach anatomischer Lokalisation des epileptischen Kerns, können fokale Epilepsien in Temporal-, Frontal-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsie unterteilt werden. 70-80% der komplex-fokalen Anfälle entstehen in den Temporallappen und dort vor allem im Hippocampus, in der Amygdala und dem parahippocampalen Cortex. Als Ursache einer Temporallappenepilepsie ist oft eine Infektion, eine Neoplasie oder ein Trauma zu finden (CHANG u. LOWENSTEIN 2003).

Nach wie vor unbefriedigend ist die Therapie der Epilepsie. Trotz der fortlaufenden Entwicklung neuer Antiepileptika bleiben etwa 1/3 der betroffenen Menschen und Hunde resistent gegen Wirkstoffe (PODELL u. FENNER 1993; TREPANIER et al. 1998; LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

## **1.2. Tiermodelle**

Für eine Untersuchung pathophysiologischer Grundlagen und neuer Behandlungsstrategien sind geeignete Tiermodelle unabdingbar. Eine Validität von Tiermodellen wird durch drei Kriterien bestimmt: (1) die Symptome im Modell sollten denen der Erkrankung ähneln, (2) der Pathomechanismus sollte identisch sein, (3) das Modell sollte für die klinische Wirksamkeit von Arzneimitteln prädiktiv sein.

Bei Tiermodellen der Epilepsie können akute Modelle (sog. Anfallsmodelle) und chronische Modelle (Untersuchung Epileptogenese) unterschieden werden (Abb.1). Akute Modelle werden vor allem für die Untersuchung der antikonvulsiven Wirkung von pharmakologischen Wirkstoffen benutzt. Chronische Modelle können nach induzierten oder spontan auftretenden Anfällen eingeteilt werden. Induzierte Anfälle lassen sich chemisch oder elektrisch auslösen, im Gegensatz zu spontanen Anfällen, die als Folge eines elektrischen oder chemischen Insultes nach einer Latenzzeit spontane, wiederkehrende Anfälle entwickeln. Es scheint zur Generierung eines prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes zu kommen, auf Grund dessen sich dieses Modell zur Untersuchung der Epileptogenese eignet.

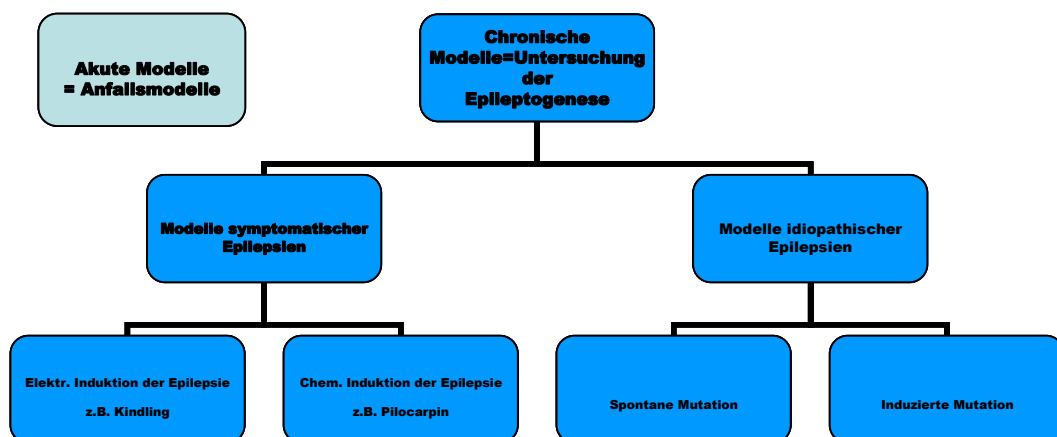


Abb.1: Schematische Darstellung der Epilepsie-Modelle

### *Amygdala-Kindling-Modell*

Dieses Kindling-Modell ist ein Epilepsiemodell, in dem Anfälle elektrisch induziert werden. Die Tiere entwickeln ohne diese Induktion keine Anfälle. Die Arbeitsgruppe des Psychologen Graham Goddard entwickelte im Jahr 1969 das Kindling-Modell an Ratten (GODDARD 1967). Das Kindling-Prinzip (engl.: *to kindle* = entflammen) basiert darauf, dass wiederholte elektrische Stimulationen zu Anfällen führen, die sich in ihrer Stärke und Dauer im Verlauf der Stimulationen mit der Zeit steigern (SATO et al. 1990). Dabei werden die Stimulationen über eine unilaterale Reiz- und

Ableitelektrode im Bereich der basolateralen Amygdala gesetzt. Die wiederholten subkonvulsiven elektrischen Stimulationen führen zu epileptischen Anfällen, die bei weiteren Stimulationen an Schwere und Dauer zunehmen. Die Tiere werden einmal täglich für eine Sekunde stimuliert. Nach einigen elektrischen Stimulationen mit gleichbleibender Stimulationsstärke zeigen die Tiere zunächst fokale Anfälle, die bei Fortführung der Stimulation sekundär generalisieren. Die Empfindlichkeit des Gehirns auf den Stimulus nimmt fortlaufend bis zu einem bestimmten Zeitpunkt zu, an dem sich der erhöhte Grad der Empfindlichkeit nicht weiter verändert. Die Tiere gelten zu diesem Zeitpunkt als „vollgekindelt“ (MCNAMARA 1984). An vollgekindelten Tieren kann ermittelt werden, ob Wirkstoffe Krampfschwellen verändern können.

Der Kindling-Prozess spiegelt einen Teil der Latenzzeit wider, die nach einem initialen Insult vor dem Auftreten spontaner epileptischer Anfälle auftritt. Die durch das Kindling verursachte Epileptogenese stellt demnach eine stark ausgedehnte Latenzzeit dar (GODDARD 1967), die schließlich, bei ausreichender Anzahl von Stimulationen, auch zur Ausbildung spontaner Anfälle führt (PINEL 1981).

## **2. Antiepileptika**

Die in der Regel erforderliche Langzeitverabreichung von Antiepileptika gilt als Therapie der Wahl von Epilepsien. Mittels einer kontinuierlichen Applikation wird versucht, die Krampfschwelle zu erhöhen und somit die Anfallsaktivität zu unterdrücken. Die meisten Antiepileptika wirken durch eine Verstärkung der hemmenden oder eine Unterdrückung der erregenden Neurotransmission. Da die Zahl der Anfälle vor der Therapie negativ mit dem Therapieerfolg korreliert ist, sollte eine Behandlung zeitnah zur Diagnose erfolgen.

## 2.1. Therapie beim Haustier

Aufgrund verschiedener Aspekte sind eine Vielzahl humanmedizinischer Antiepileptika nicht, oder nur eingeschränkt, bei Hund und Katze anwendbar. Da der Hund viele Medikamente rasch metabolisiert, ist es für den Patientenbesitzer oft schwierig kurze Applikationsintervalle einzuhalten, wodurch Antiepileptika mit einer geringen Eliminationshalbwertszeit nur selten eingesetzt werden (Tab.1). Für viele Antiepileptika liegen bei der Katze keine pharmakokinetischen Daten vor, wodurch eine gezielte Therapie nur eingeschränkt durchführbar ist (POTSCHKA et al. 2009).

Für die Behandlung von fokalen und generalisierten Anfällen gilt Phenobarbital als Mittel der Wahl bei Hund und Katze. Da 20-40 % der Hunde auf eine Behandlung mit Phenobarbital nicht zufriedenstellend ansprechen, kann eine Zusatztherapie (Add-on) mit Kaliumbromid die antikonvulsive Effizienz steigern. Hinsichtlich starker Nebenwirkungen (Hustenreiz) ist die Verwendung von Kaliumbromid bei der Katze nur eingeschränkt einsetzbar. Aufgrund von Resistenzen und hoher Kosten einer Langzeitbehandlung mit Antiepileptika, entscheiden sich viele Patientenbesitzer für die Euthanasie ihres Tieres. Daher besteht ein großes Interesse an therapeutischen Alternativen für die Veterinärmedizin (POTSCHKA et al. 2009).

Antiepileptikum	Wirkung	Eliminationshalbwertszeit [h]	Nebenwirkungen
Phenobarbital	GABA-Rez.-Agonist	Hd.:24-40 Ktz.:34-43	Sedation, Ataxie Hepatotoxizität
Kaliumbromid	Hyperpolarisation von Nervenzellen	Hd.:15-20 Tage	Geringe therapeutische Breite, Sedation Bromismus
Benzodiazepine	GABA-Rez.-Agonist	Ktz.: 15-20	Sedation hepatotoxische Nekrose
Felbammat	NMDA-Rez.-Antagonist Reduktion von Na <sup>+</sup> -Strömen	Hd.: 5-7 Ktz.: unbekannt	Sedation hämatopoetische Effekte Keratoconjunctivitis sicca



Zonisamid	Hemmung Ca <sup>2+</sup> -Kanäle, Reduktion von Na <sup>+</sup> -Strömen	Hd.: 15-20 Ktz.: 33	Sedation, Ataxie Vomitus Keratokonjunctivitis sicca
Gabapentin	Hemmung Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	Hd.: 2-4 Ktz.: unbekannt	Sedation
Levetiracetam	Modulation der Transmitter-freisetzung	Hd.: 4-6 Ktz.: 3	Sedation Inappetenz
Pregabalin	Hemmung Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	Hd.: 3-7 Ktz.: unbekannt	Sedation, Ataxie

**Tab.1: Übersicht über geeignete relevante veterinärmedizinische Antiepileptika**  
(modifiziert nach POTSCHKA et al. 2009)

## 2.2. Therapie beim Menschen

Nach der Diagnose „Epilepsie“ werden nach Auswahl einer potentiell geeigneten Therapieform meist krampfunterdrückende Medikamente verschrieben. Falls die Ergebnisse einer medikamentösen Therapie nicht zufriedenstellend sind, sollten Operation, eine spezielle Diät, eine ergänzende Therapie oder eine Vagusnerv-Stimulation in Betracht gezogen werden. Ziel einer Therapie ist die Verhinderung weiterer Krämpfe oder die größtmögliche Reduktion der Anfallsfrequenz, sowie die Vermeidung von Nebeneffekten. Des Weiteren wird damit versucht dem Patienten ein normales psychosoziales und berufliches Leben zu ermöglichen (GOLDENBERG 2010). Die Entscheidung für eine Therapie mit Antiepileptika, sollte u.a. davon abhängig gemacht werden, wie groß die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Auftretens von Krämpfen ist. Außerdem zu berücksichtigen ist die Konsequenz für den Patienten durch weitere Anfälle, ebenso wie die positiven und negativen Effekte des gewählten Medikamentes (ELLENBERG et al. 1986). Das relative Risiko eines Wiederauftretens der Epilepsie hängt u.a. vom Anfallstyp und Syndrom ab. Je früher eine Therapie mit Antiepileptika begonnen wird, desto besser sind die Chancen weitere Anfälle zu verhindern. Das Risiko für Nebenwirkungen bei der initialen medikamentösen Therapie liegt jedoch bei annähernd 30% (GOLDENBERG 2010).

Demnach sollte ein ideales Antiepileptikum alle Krämpfe unterdrücken

ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen (GOLDENBERG 2010). Im Gegensatz zur Tiermedizin, in der nach wie vor Phenobarbital die Standardtherapie darstellt, finden in der Humanmedizin deutlich mehr Antiepileptika Anwendung. Zu den gängigen und anerkannten Antiepileptika in den Vereinigten Staaten von Amerika und Europa gehören u.a. Carbamazepin, Ethosuximid, Valproinsäure, Phenytoin, Lamotrigen, Oxcarbazepin, Zonisamid, Phenobarbital, Felbamat, Levetiracetam, Gabapentin, Lacosamid und Topiramamat (SCHMIDT 2009).

### **3. Hippocampale Neurogenese**

#### **3.1. Neurogenese im adulten Gehirn**

Obwohl bereits 1965 (ALTMAN u. DAS 1965) über sich teilende Zellen im postnatalen Hippocampus berichtet wurde, ging man weiterhin davon aus, dass im adulten Gehirn keine neuen Neurone produziert werden. Erst Mitte der Neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass sich in zwei Gehirnregionen neue Zellen bilden können: Neurone in der Subventrikulärzone des Riechkolbens (REYNOLDS u. WEISS 1992) und Körnerzellen in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus (GD) im Hippocampus (CAMERON et al. 1993). Eine Integration von neugebildeten Nervenzellen in ein Netzwerk konnte auch im prefrontalen, temporalen, parietalen und piriformen Cortex, dem Striatum und der Amygdala nachgewiesen werden (GOULD et al. 1999; BERNIER et al. 2002; ZHAO et al. 2003).

In Anbetracht seiner besonderen pathophysiologischen Bedeutung im epileptischen Geschehen soll in dieser Arbeit die hippocampale Neurogenese hervorgehoben werden.

Der Hippocampus besteht aus einer Formation von Gyrus dentatus, Cornu ammonis (CA1-4) und Subiculum. Jedoch sind nur CA1 und 3 von anatomischer und funktionaler Bedeutung (Abb.2).

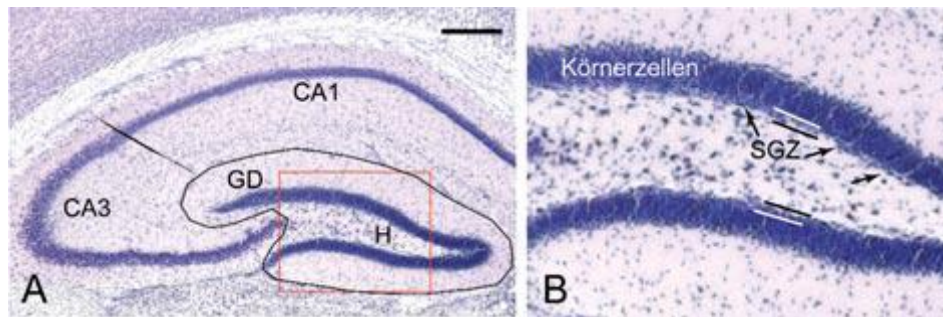


Abb. 2: A) Fotografie eines Gewebeschnittes durch den Hippocampus der Maus (Nissl-Färbung). Der Hippocampus besteht aus drei Regionen: Gyrus dentatus (GD; umrahmt), CA3, und CA1. Der rot umrandete Ausschnitt ist im Bild B vergrößert dargestellt. Die Subgranulärzone (SGZ) befindet sich direkt unter der Körnerzellschicht und enthält Stamm- und Vorläuferzellen (Pfeile), H, Hilus des Gyrus dentatus. (LEDERGERBER und FRITSCHY 2006)

In der SGZ teilen sich Stammzellen (radiale Gliazellen) und neuronale Vorläuferzellen. Die Mehrheit dieser Neurone wird jedoch nicht in das Netzwerk eingebaut und stirbt nach kurzer Zeit wieder ab (DAYER et al. 2003). Im Verlauf ihrer Reifezeit exprimieren junge Neurone spezifische Proteine, die mittels Immunhistochemie detektierbar sind und sich dadurch von Astrozyten unterscheiden lassen (Abb.3).

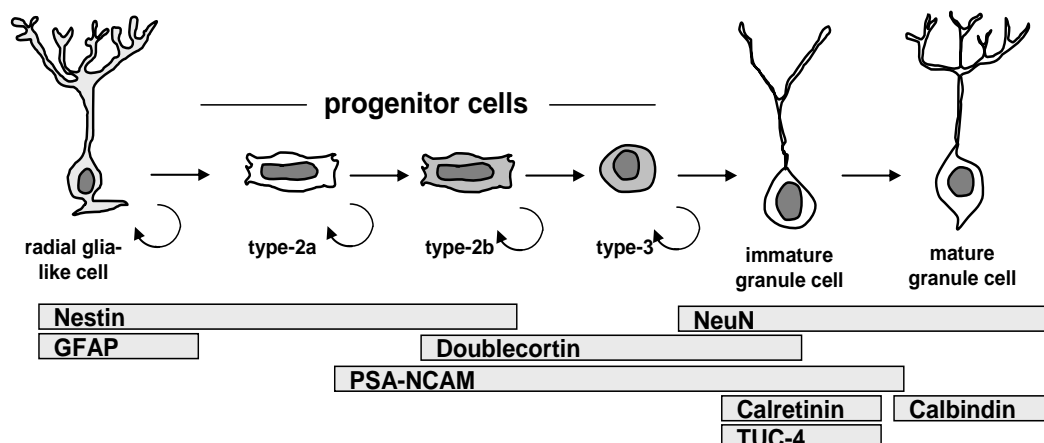


Abb.3: Verlauf der hippocampalen Neurogenese in der Körnerzellschicht. Eingeteilt nach Morphologie, Proliferationsfähigkeit und Expression verschiedener neuronaler Proteine, die mittels immunhistochemischer Marker detektierbar sind. (KEMPERMANN 2004) mod. von H. Potschka

Die neugebildeten Neurone nehmen durch ihre Dendriten Kontakt zur Molekularschicht des GD und über ihre Axone Kontakt mit Pyramidenzellen des Hilus und der CA3-Region auf (HASTINGS u. GOULD 1999).

### **3.2. Neurogenese im epileptischen Gehirn**

Bei der Entstehung der Epilepsie, der Epileptogenese, treten mannigfaltige neuropathologische Veränderungen auf (DALBY u. MODY 2001). Ein Verlust von Neuronen durch Apoptose und Nekrose kann mitverantwortlich sein für eine Induktion plastischer Veränderungen und eine gestörte hippocampale Funktion (PITKANEN u. SUTULA 2002). Axonale Reorganisation und Veränderungen der dendritischen Morphologie führen zu abnormen synaptischen Verbindungen zwischen den Neuronen (COVOLAN et al. 2000). Im Einzelnen kommt es zur Aussproßung von Moosfasern der Körnerzellen ohne Verbindung zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Sie bilden abnorme synaptische Verbindungen zu anderen Zellen der Körnerzellschicht, was zu sogenannten amplifizierten Feedback-Kreisläufen führen kann (KOYAMA et al. 2004). Diese aberrante Moosfasersproßung geht allerdings nicht nur von neuen Körnerzellen aus, sondern auch von reifen Neuronen (COVOLAN et al. 2000). Zudem sezernieren aktivierte Mikroglia Cytokine, welche Neurone gegenüber Anfällen sensibilisieren können (BERNARDINO et al. 2005).

Alle diese Veränderungen können zur Ausbildung eines prokonvulsiven, epileptischen Netzwerk führen von dem eine Hyperexzitabilität ausgeht (COVOLAN et al. 2000; RATZLIFF et al. 2002).

Zahlreiche Studien im Tiermodell zeigten einen Unterschied in der Neurogenese in Bezug auf die Art des Anfalles. Akute Anfälle oder ein Status epilepticus führen zu einer abnormen Erhöhung der hippocampalen Neurogenese und einer Migration neugebildeter Körnerzellen in den Hilus oder die Molekularschicht des Gyrus dentatus (BENGZON et al. 1997; PARENT et al. 1997; SCHARFMAN u. GRAY 2007; HATTIANGADY u. SHETTY 2008). Diese Körnerzellen integrieren

sich abnorm in das Netzwerk der CA3-Region und werden aktiviert sobald sich spontane Anfälle entwickeln (SCHARFMAN et al. 2000; JESSBERGER et al. 2007). Ähnlich dislozierte Körnerzellen konnten in hippocampalen Gewebe von Patienten mit Temporallappenepilepsie gezeigt werden (PARENT et al. 2006).

Einen bzw. zwei Monate nach dem akuten Anfall konnte jedoch beobachtet werden, dass die Neurogenese auf Basalniveau zurückkehrte (PARENT et al. 1997; JESSBERGER et al. 2007). In der chronischen Phase einer Epilepsie konnte sogar ein Rückgang der Neurogenese beobachtet werden, wenn eine erhebliche Anzahl an spontanen Anfällen auftrat (HATTIANGADY et al. 2004). Andere Studien zeigten, dass die Zahl von neugebildeten Zellen bei der chronischen Epilepsie analog zu intakten Hippocampi ist. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich nur ungefähr 4% der neugebildeten Zellen unter chronischen epileptischen Bedingungen zu reifen Neuronen differenzierten, im Vergleich zu 80% in gesunden Hippocampi (HATTIANGADY u. SHETTY 2008). Eine weitere Studie im Mausmodell der Temporallappenepilepsie wies eine vermehrte Produktion von neuen Astrozyten (Astrogliose) bei insgesamt reduzierter Neurogenese auf (KRALIC et al. 2005).

### **3.3. Pharmakologische Modulation der hippocampalen Neurogenese**

Aufgrund der wichtigen Rolle der Neurogenese im Geschehen der Epileptogenese, stellt deren pharmakologische Modulation einen möglichen Angriffspunkt bei der Epilepsieentstehung dar. Die Untersuchung auf dem Markt befindlicher Antiepileptika bezüglich eines neuroprotektiven Potentials und die Entwicklung neuer neuroprotektiver Antiepileptika gewinnt zunehmend an Bedeutung (BRANDT et al. 2006). Weitere Behandlungen, die neurodegenerativen Prozessen entgegenwirken könnten, werden untersucht. Unter anderem zählen hierzu die Verabreichung von Antioxidantien (VELISKOVA et al. 2000; SHIN et al. 2007), Östrogen (VELISKOVA et al. 2000) bzw. Progesteron (HOFFMAN et al. 2003), neurotrophen Faktoren (SIMONATO et al. 2006)

oder einer ketogenen Diät (NOH et al. 2006).

Aufgrund seiner erheblichen Bedeutung für die neuronale Plastizität und die Modulation synaptischer Signalübertragung (KATONA u. FREUND 2008) ist das Endocannabinoidsystem (ECS) von gesteigertem Interesse. Ein therapeutisches Potential einer Modulation des ECS bei neurologischen Erkrankung wurde bereits diskutiert (GRANT u. CAHN 2005). Durch pharmakologische und genetische Modulation des ECS konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivitätsverstärkung des ECS akute Anfallsaktivität reduzieren oder sogar verhindern kann (WALLACE et al. 2002; MONORY et al. 2006).

Neuronale Vorläuferzellen des Hippocampus produzieren Endocannabinoide (EC) und exprimieren den Cannabinoid-1 (CB1)-Rezeptor (AGUADO et al. 2005). Mäuse mit fehlenden CB1-Rezeptoren zeigten eine Verminderung der hippocampalen Zellproliferation (JIN et al. 2004). Mäuse hingegen mit fehlender Fettsäuren-Amidohydrolase (*fatty acid amide hydrolase*=FAAH), ein Enzym für die Elimination von EC, wiesen eine Erhöhung der hippocampalen Zellproliferation auf (AGUADO et al. 2005). Eine Behandlung von Ratten mit einem synthetischen Cannabinoid erhöhte die hippocampale Neurogenese (JIANG et al. 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass eine Behandlung mit einem CB1-Rezeptor-Antagonisten die Zellproliferation erhöhte, während ein EC-Aufnahmehemmer keinen Effekt aufwies (HILL et al. 2006). Diese Studien deuten darauf hin, dass das ECS eine Rolle bei der Regulation der hippocampalen Neurogenese spielt und somit als Prophylaxe oder Therapie der Epilepsie von Bedeutung sein könnte.

## **4. Endocannabinoidsystem**

### **4.1. Einführung**

Das Endocannabinoidsystem spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl kognitiver, sensorischer und motorischer Funktionen. Dementsprechend richtet sich das Augenmerk der Forschung verstärkt auf das therapeutische Potential von Wirkstoffen, die dieses System beeinflussen.

Sowohl psychoaktive als auch medizinische Wirkungen der Marihuana-Pflanze sind der Menschheit seit Jahrtausenden bekannt. In der arabischen Medizin des Mittelalters sind viele der heute bekannten Indikationen von Cannabinoiden bereits beschrieben (LOZANO et al. 2001). Gesicherte Kenntnisse zur Wirkung dieser Substanzen konnten jedoch erst nach Identifizierung der chemischen Struktur von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), dem Hauptwirkstoff der Marihuana-Pflanze, im Jahre 1964 gewonnen werden (GAONI et al. 1964). 1988 wurden zwei Cannabinoid-Rezeptor-Typen identifiziert (DEVANE et al. 1988) und anschließend kloniert (MATSUDA et al. 1990; GERARD et al. 1991): Cannabinoid (CB)1-Rezeptoren (mit dem CBA-Subtyp) sind sowohl zentral als auch peripher in verschiedenen Geweben lokalisiert. CB2-Rezeptoren (MUNRO et al. 1993), die nur zu 44% homolog mit CB1-Rezeptoren sind, werden fast ausschließlich auf Immunzellen exprimiert.

Die hydrophoben Eigenschaften von THC ließen vermuten, dass es sich bei dem endogenen Liganden um ein Lipid handelt und tatsächlich konnte 1992 das Arachidonsäure-Derivat Arachidonylethanolamid (Anandamid) (DEVANE et al. 1992) aus Gehirnen von Schweinen isoliert werden. Wenig später wurde ein zweites Endocannabinoid, 2-Arachidonylglycerid (2-AG) (MECHOULAM et al. 1995) entdeckt. In ihrer biologischen Wirkung stimmen Endocannabinoide mit THC fast vollständig überein. Anandamid (Sanskrit, ananda = Glückseligkeit) ist ein CB1-Rezeptor-Agonist. Dieser entsteht aus N-Arachidonyl-Phosphatidyl-Ethanolamid unter Abspaltung von phosphoriger Säure und wird durch das Enzym Anandamid-Amidohydrolase zu Arachidonsäure und Ethanolamid abgebaut (HILLARD u. CAMPBELL 1997). Die physiologische Wirkung kann zudem durch einen in Neuronen (BELTRAMO et al. 1997) und in Makrophagen (BISOGNO et al. 1997) lokalisierten selektiven Wiederaufnahmemechanismus beendet werden. 2-AG ist ein Arachidonsäureester (SUGIURA et al. 1999), der CB1- und CB2-Rezeptoren aktiviert und aus anderen Vorstufen entsteht als Anandamid. Abgebaut wird 2-AG durch zelluläre Esterasen (BISOGNO et al. 1997), wodurch Phospholipide, Diacylglycerole und Triglyceride entstehen. Des Weiteren kann 2-AG durch Fettsäuren-Amidohydrolase (*fatty acid amide*

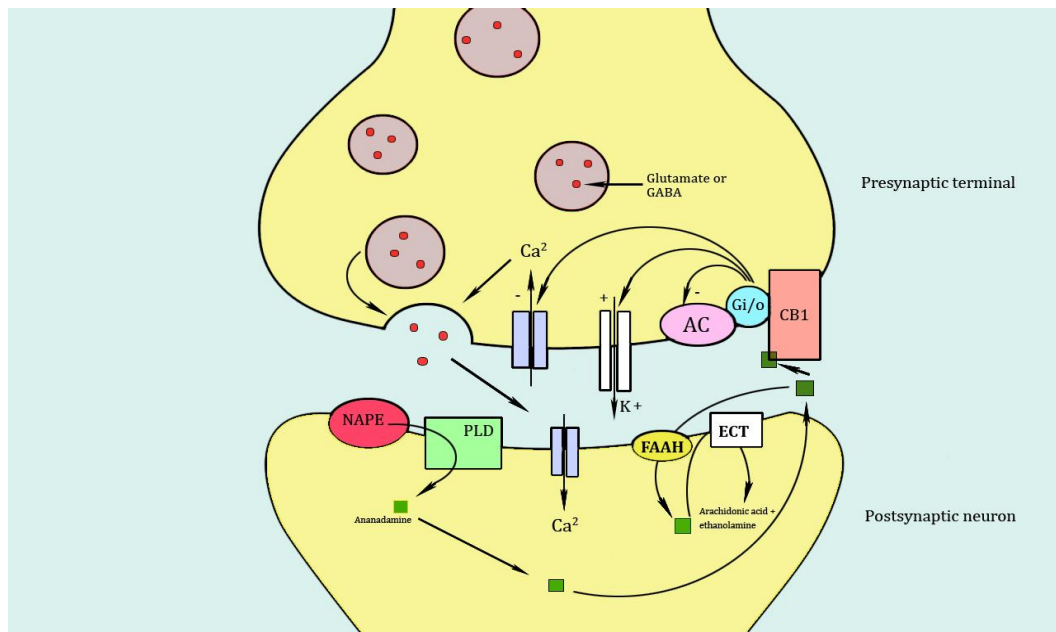
*hydrolase=FAAH*) und Monoglycerid-Lipase die auch Anandamid abbauen, zu Arachidonsäure und Glycerol hydrolysiert werden (CRAVATT et al. 1996). Dabei können Cyclooxygenasemetabolite entstehen (JARAI et al. 2000).

2-AG hat eine geringere Stabilität als Anandamid *in vivo* und *in vitro*. Daher werden Ligandenbindungsversuche erschwert, wodurch seine Wirkungsweise bislang weniger intensiv erforscht werden konnte.

Die Aktivierung des CB1-Rezeptors, der sieben transmembranäre Domänen aufweist, löst durch die Aktivierung von G-Proteinen verschiedene Signaltransduktionskaskaden aus (PERTWEE 1999b). Unter anderem wird der Kalzium-Einstrom durch N- und P/Q-spannungsabhängige Kalziumkanäle inhibiert, die Öffnungswahrscheinlichkeit von verschiedenen Kaliumkanälen erhöht und die Aktivität der Adenylatzyklase inhibiert (TWITCHELL et al. 1997). Folge der Aktivierung sind funktionelle Veränderungen insbesondere in erregbaren Zellen wie Neuronen.

Endocannabinoide wirken unter anderem auch als retrograde Neurotransmitter (MAEJIMA et al. 2001) und unterdrücken die Freisetzung von „klassischen“ Neurotransmittern wie Glutamat oder Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) (Abb.4). Besondere Bedeutung in Bezug auf Epilepsie hat der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, dessen vermehrte Ausschüttung bei epileptischen Anfällen zu epilepsieassoziierten Veränderungen führt (KÖHLING 2006). Ebenfalls zu betrachten ist die hemmende Wirkung auf die inhibitorische Gamma-Amino-Buttersäure (GABA). Wobei noch durch weitere Untersuchungen zu klären ist, wie und ob GABA eine antikonvulsive Wirkung entfalten könnte.





**Abb. 4: Schematische Darstellung des endocannabinoiden Signalweges:**

Einstrom von Kalzium in die postsynaptische Zelle (z.B. durch einen Reiz) aktiviert Phospholipase-D (PLD). Daraufhin produziert N-arachidonoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NAPE) Anandamide. Die Anandamide werden in den synaptischen Spalt freigesetzt und binden an den präsynaptischen Cannabinoid-1-Rezeptor (CB1-Rezeptor). Die Aktivierung dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors führt zur Inhibition der Adenylatcyclase (AC), zur Öffnung präsynaptischer Kalium-Kanäle und zur Inhibition präsynaptischer Kalzium-Kanäle. Diese Effekte führen zu einer Hemmung der Freisetzung von Glutamat oder Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) aus dem präsynaptischen Terminal. Anandamide werden mittels Endocannabinoidtransporter (ECT) in die Zelle transportiert und durch das Enzym Fettsäureamidohydrolase (FAAH) abgebaut.

(Modifiziert nach E. BENARROCH Neurology 2007;69:306-309)

#### 4.2. Cannabinoide und andere Modulatoren des Endocannabinoidsystems

Vor über 40 Jahren wurde das wohl bekannteste Cannabinoid  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) erstmals isoliert und synthetisiert (MECHOULAM et al. 1967). Zeitnah konnten auch seine psychoaktiven Effekte nachgewiesen werden (MECHOULAM u. GAONI 1967). In den darauffolgenden Jahren wurde eine große Zahl an weiteren Cannabinoidanaloga synthetisiert und im Tiermodell getestet (u.a. motorische Dysfunktion, Hypothermie und Gedächtnis) (MARTIN 1986; RAZDAN 1986; COMPTON et al. 1992b; PERTWEE 1999a). Die Wirkungen wurden der Aktivierung der sog. CB-Rezeptoren

zugeschrieben, die hauptsächlich im Gehirn zu finden sind.

1992 wurde von der Sterling Research Group eine neue Klasse von Aminoalkylindol-Analgetika entdeckt, welche als Agonisten am wahrscheinlich ausschließlich präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptor im Gehirn agieren (PACHECO et al. 1991). Die Substanz WIN55.212-2 gilt dabei als Prototyp. Es konnte festgestellt werden, dass WIN55.212-2 eine sehr ähnliche stereochemische Struktur hat wie  $\Delta$ 9-THC. Jedoch besteht, wie auch bei vielen anderen synthetischen Cannabinoiden, eine höhere Affinität bzw. Selektivität gegenüber dem CB1- und auch CB2-Rezeptor. Beide senken die Körpertemperatur, wirken antinozizeptiv und reduzieren spontane Aktivität (PACHECO et al. 1991; COMPTON et al. 1992a). Zusätzlich wird WIN55.212-2 eine antikonvulsive Wirkung zugeschrieben, da gezeigt wurde, dass es spontane epileptische Anfälle komplett aufzuheben vermag (WALLACE et al. 2003). Dies wird durch eine Inhibition der Glutamatfreisetzung erklärt.

Eine weitere Substanz, die viel zum Verständnis des Endocannabinoid-Systems beiträgt, ist der erste spezifische CB1-Rezeptorantagonist SR 141716. Unter dem Namen Rimonabant® kam dieser Stoff in der Humanmedizin z.B. bei der Behandlung von Übergewicht und Alkohol- oder Nikotinabhängigkeit (PONCELET et al. 2003; BLACK 2004; DUARTE et al. 2004) zum Einsatz. Es wurde allerdings aufgrund seiner Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen. Ebenfalls könnte Rimonabant® als hochselektiver CB1-Rezeptorantagonist dazu benutzt werden, die Rolle des CB1-Rezeptors in Hinsicht einer Manipulation des Krankheitskomplexes der Epilepsie näher zu beleuchten (ECHEGOYEN et al. 2009).

Eine Verlängerung bzw. Verstärkung der Endocannabinoid-vermittelten Wirkung am CB1-Rezeptor ist von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Mittlerweile existieren verschiedene Substanzen, welche beispielsweise die Eliminierung endogener Cannabinoide aus dem synaptischen Spalt verlangsamen oder die Aktivität der FAAH hemmen (PERTWEE 2006). Dazu zählt unter anderem der FAAH-Inhibitor URB 597. Auch das relativ neue Arachidonoylserotonin (AA-5-HT) hemmt die FAAH, zusätzlich jedoch auch den „transient receptor potential vanilloid“

Rezeptor Typ 1 (TRPV1-Rezeptor), was diese Substanz sehr interessant für weitere Forschungen macht. Der TRPV1-Rezeptor ist ein Kationenkanal, der bei Aktivierung einen Einwärtsstrom von Kationen zur Folge hat, was zu einer Depolarisation eines Neurons führt. Dessen Inhibition kann eine hemmende Wirkung auf exzitatorische Synapsen haben (FU et al. 2009).

Die Ergebnisse von Modulatoren des Endocannabinoid-Systems zeigen neue Möglichkeiten auf, in den Krankheitsablauf der Epilepsie einzugreifen.

### III. ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN

Nach wie vor sind die Mechanismen, die zur Entwicklung einer Epilepsie führen weitest gehend unbekannt. Für eine Optimierung der Therapie der Epilepsie ist es unabdingbar das Wissen über mögliche Angriffspunkte in der Epileptogenese zu erweitern. Vor allem die Therapie beim Hund ist derzeit nur eingeschränkt möglich, da verfügbare Antiepileptika für den Menschen entwickelt wurden und beim Hund überwiegend zu schnell abgebaut werden. Auch beim Menschen ist eine Epilepsieerkrankung oftmals mit erheblichen Einschränkungen verbunden. Unter Umständen muss die berufliche Tätigkeit oder die private Freizeitgestaltung aufgegeben werden. Gesellschaftliche Stigmatisierung und eingeschränkte Mobilität erhöhen den Leidensdruck zusätzlich. Eine lebenslang andauernde Therapie mit gegenwärtig eingesetzten Antiepileptika ist zum Teil mit schweren Nebenwirkungen verbunden und führt somit zu einer weiteren Beeinträchtigung der Lebensqualität und Limitierung der Lebenserwartung von Veterinär- und Humanpatienten. Aufgrund dessen wäre eine interdisziplinäre Entwicklung neuer Ansätze zum Krankheitsverständnis und zur Therapieentwicklung unter Verwendung von Epilepsiemodellen von großer Bedeutung.

Wie bereits bekannt ist, treten bei der Entstehung einer Epilepsie vielfältige neuropathologische Veränderungen auf. Diese Veränderungen können zur Ausbildung eines prokonvulsiven epileptischen Netzwerks führen. Aufgrund der vermuteten Rolle der Neurogenese im Geschehen der Epileptogenese, stellt deren pharmakologische Modulation einen möglichen Angriffspunkt bei der Epilepsieentwicklung dar. In Betracht seiner erheblichen Bedeutung für die neuronale Plastizität und die Modulation synaptischer Signalübertragung ist das Endocannabinoidsystem von gesteigertem Interesse. Einige Studien in verschiedenen Anfalls- und Epilepsiemodellen zeigten bereits anti- und prokonvulsive Effekte durch eine Aktivierung von Cannabinoid1-Rezeptoren. Allerdings waren die Ergebnisse abhängig von der Art des Modells und der verabreichten Dosis. Diese Studie soll nun auch im Mausmodell für komplex-fokale Anfälle mögliche Effekte einer Beeinflussung des

Endocannabinoidsystems zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Fragestellungen zu klären:

► Wie wirkt sich im Amygdala-Kindling-Modell eine Behandlung mit dem CB1-Rezeptor-Agonisten WIN55.212-2 bzw. mit dem FAAH-Inhibitor URB 597 auf die Kindling-Progression und die Entstehung eines hyperexzitablen Netzwerks aus. Wie werden die Krampfschwellen bei vollgekindelten Mäusen beeinflusst?

► Können anfallsinduzierte Veränderungen der neuronalen Plastizität, insbesondere die gestörte hippocampale Neurogenese durch Applikation von WIN55.212-2 bzw. URB 597 moduliert werden?

Diese Dissertation soll zur Beantwortung der Frage beitragen, ob sich eine Modulation des Endocannabinoidsystems auf die Ausbildung eines hyperexzitablen epileptischen Netzwerks und auf den Prozess der Epileptogenese auswirken könnte.

## **IV. MATERIAL UND METHODEN**

### **1. Modulation des Endocannabinoidsystems im Kindling-Modell**

#### **1.1. Versuchstiere**

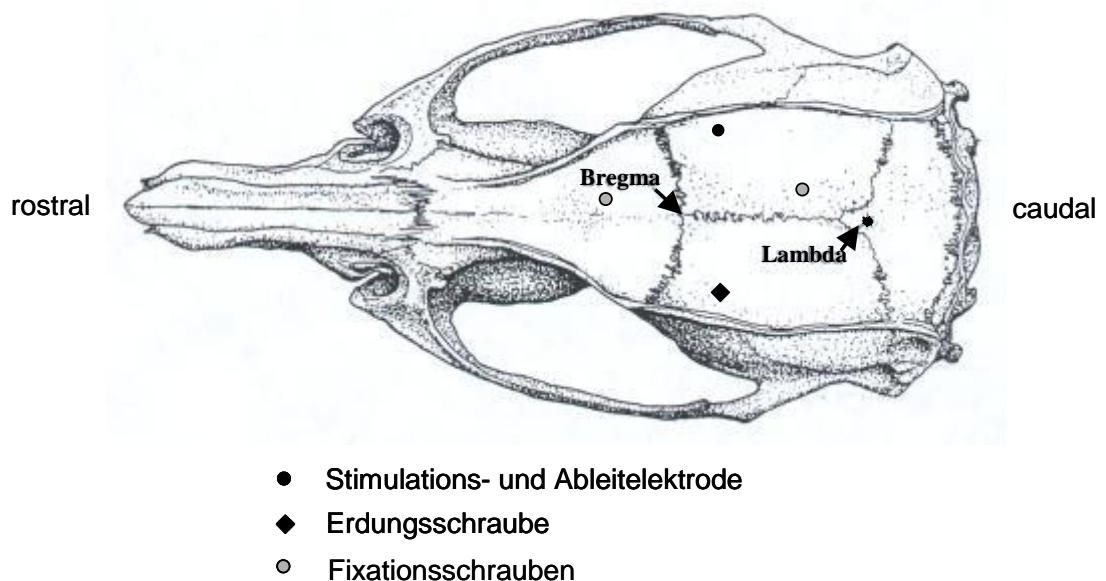
Für die Versuche im Amygdala-Kindling Epilepsiemodell wurden männliche NMRI-Mäuse (Harlan) verwendet, die bei ihrer Ankunft ein Körpergewicht von 21 bis 25g aufwiesen. Die Versuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-58-07) durchgeführt.

Alle Tiere wurden separat in Makrolon Typ 3 Käfigen gehalten, welche mit Weichholzgranulat (WH- Grade 5, Altromin, Lage) ausgestattet waren. Den Mäusen wurde Leitungswasser und eine Standarddiät (R/M- Haltung 10mm, Sniff, Soest) ad libitum zur Verfügung gestellt, welches wöchentlich erneuert wurde. Ebenfalls wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt, wobei darauf geachtet wurde dies 1-2 Tage vor den Experimenten durchzuführen, um die Stressbelastung für die Tiere vor Versuchen zu minimieren. Die Tiere wurden bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (ab 7.00 MEZ hell; ab 19.00 MEZ dunkel, bei einer Umgebungstemperatur von 20-22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 37-40% gehalten. Die Mäuse wurden frühestens 12 Tage nach ihrer Ankunft für die Implantation einer Elektrode operiert, damit den Tieren eine Akklimatisierung ermöglicht werden konnte. Um tagesrhythmische Einflüsse möglichst gering zu halten, wurde mit den Versuchen zwischen 8.00 und 9.00 MEZ begonnen.

#### **1.2. Implantation der Elektrode**

Die Mäuse wurden mittels Chloralhydrat (400 mg/kg in 10 ml/kg 0,9%ige NaCl- Lösung, i.p.) für die Operation narkotisiert. Für eine exakte Operationstechnik wurden die Tiere in einen stereotaktischen Apparat (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) eingespannt. Als Orientierungshilfe für eine genaue Implantation wurde der stereotaktische Atlas von

PAXINOS und FRANKLIN (2004) herangezogen. Dieser zeigt die Lage der Hirnstrukturen in Bezug auf Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte). Die Oberkieferhalterung wurde auf 0,0 mm der Interaurallinie eingestellt, so dass Lambda (caudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) und Bregma auf der gleichen Höhe lagen, wie es im stereotaktischen Atlas vorgegeben ist (Abb.5).



**Abb.5: Aufsicht auf den Mäuseschädel mit Darstellung der Lokalisation der Stimulations- bzw. Ableitelektrode und der Fixationsschrauben. Nach PAXINOS und WATSON ( 2005 #502).**

Die Implantation der Stimulationselektrode in die basolaterale Amygdala erfolgte, basierend auf im Vorfeld durchgeführten Lokalisationsversuchen, im Bereich der rechten Hemisphäre anteriorposterior +1,0; lateral (lat) +3,2; dorsoventral (dv) +5,3. In Ergänzung zu den beiden Fixationsschrauben wurde gegenüberliegend der implantierten Tiefenelektrode mittels einer Schraube eine indifferente Erdungselektrode am Schädelknochen der Maus befestigt. Diese bestand aus einer Schädelschraube, die über einen teflonisolierten Draht mit einer Messingbuchse verbunden war. Zur dauerhaften Befestigung der Elektroden und der Fixationsschrauben am Schädelknochen wurde

kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur<sup>®</sup>, Fa. Kutzer, Weinheim) verwendet. Auf die Operation folgte eine zweiwöchige Regenerationsphase.

### **1.3. Kindling**

Auf die Regenerationsphase folgte das Kindling, wobei die Mäuse mit einem dreipoligen, abgeschirmten und ummantelten Kabel über ihren Steckeraufsatz mit einer Stimulatoreinheit (Typ215/I oder Nr.6872, Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten) verbunden wurden. Mittels einer zwischengeschalteten „Switchbox“ konnte synchron und kontinuierlich ein Enzephalogramm (EEG) abgeleitet werden. Ein Computer mit der Software „Chart for Windows“ zeichnete die EEGs auf. Als Stimulationsstrom wurde ein monophasischer Rechteckimpuls verwendet mit einer Dauer von einer Millisekunde und einer Frequenz von 50 Hz für die Gesamtdauer von einer Sekunde.

Um für jedes Tier eine Reizstromstärke in  $\mu\text{A}$  festzusetzen, die dafür nötig ist, mit dem Stimulationsstrom im EEG ein Nachentladungsmuster von mindestens vier Sekunden und einer mindestens doppelt so hohen Amplitude zur Grundlinie im Basal-EEG auszulösen, wurde die initiale Nachentladungsschwelle (afterdischarge threshold, ADT) individuell bestimmt. Dieses Nachentladungsmuster kann sowohl mit, als auch ohne motorische Krampfaktivität einhergehen. Die Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle begann bei einer Stromstärke von  $36 \mu\text{A}$ . Falls kein Anfall beobachtet wurde, wurde nach einer Minute erneut stimuliert, allerdings jeweils mit einer um 20% erhöhten Stromstärke. Die maximale Stromstärke betrug  $1440 \mu\text{A}$ . Als initiale Nachentladungsschwelle wurde die Stromstärke notiert, bei der das erste Mal Nachentladungen auftraten.

Die Krampfschwere der gekindelten Anfälle wurde nach einer Skala von RACINE (1972) beurteilt (Tab.2). Hierbei bezeichnen die Stadien I-III fokale, Stadium IV und V generalisierte Anfälle.



<b>Krampfschwere</b>	<b>Anfallscharakteristika</b>	
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 der Stellreflexe	

**Tab.2: Skala der Krampfstadien nach RACINE et al. 1972**

Die darauffolgenden Tage wurden die Tiere mit der Stromstärke stimuliert, die 20% über ihrer initialen Nachentladungsschwelle lag. Im Verlauf des Kindling wurden 5 Parameter protokolliert, die für die spätere Auswertung von Bedeutung waren.

Die Krampfschwere (seizure severity, SS) ist bereits in Tabelle 2 erläutert.

Die Krampfdauer (seizure duration, SD) wurde weiter unterteilt in SD1 und SD2 und beschreibt die Zeit vom Stimulationsbeginn bis zum Ende der sichtbaren Verhaltensveränderungen. SD1 bestimmt die Dauer der gesamten motorischen Krampfaktivität (fokal und generalisiert). SD2 umfasst die gesamte Zeit vom Stimulationsbeginn, der motorischen Krampfaktivität inklusive der postiktalen Phase bis zur Normalisierung des Verhaltens der Maus.

Die Nachentladungsdauer (afterdischarge duration, ADD), unterteilt in ADD1 und ADD2, wird definiert als die Zeit, in der nach der Stimulation Spikes im EEG auftreten, die eine Frequenz von mindestens 1 Hz aufzeigen und deren Amplitude doppelt so hoch wie die Grundlinie ist. Kurze Unterbrechungen im Spikemuster bis 3 Sekunden werden

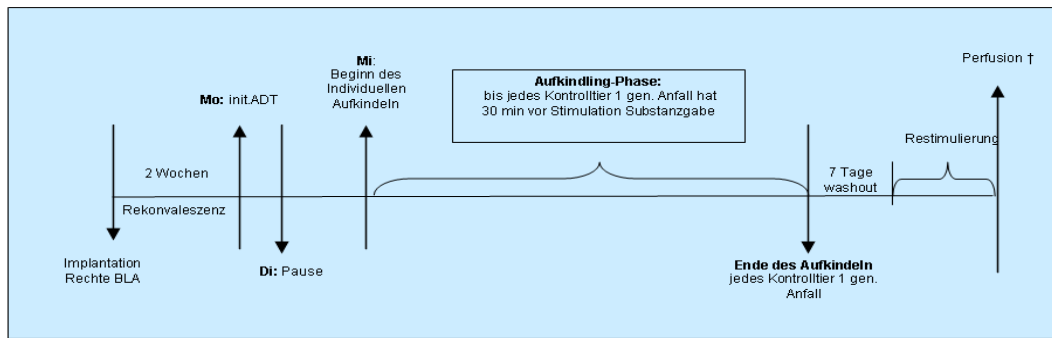
vernachlässigt. Die ADD1 beschreibt die Gesamtdauer der auftretenden Spikes. Selten kommen Veränderungen des Spikemusters im EEG vor, worauf die Zeit bis zur Veränderung als ADD1 und die Gesamtdauer der Nachentladungen als ADD2 bezeichnet wird.

Bei jeder Stimulation wurden individuelle digitale EEGs der Mäuse aufgezeichnet und gespeichert. Im Verlauf des Kindling nahmen die epileptischen Anfälle der Tiere mit Anzahl der Stimulationen sowohl an Schwere als auch an Dauer zu.

#### *Studiendesign: Effekt auf den Kindlingprozess*

In dieser Studie wurden drei Gruppen je 13 Mäuse verwendet: zwei Substanzgruppen (WIN55.212-2 und URB 597) und eine Vehikelgruppe bei welcher nur das Lösungsmittel der Substanzen appliziert wurde.

Nach der Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle für jedes Tier wurden die Tiere einmal täglich für eine Sekunde stimuliert nachdem ihnen 30 Minuten zuvor Vehikel oder Substanz i.p. verabreicht wurde. Die Tiere wurden so lange stimuliert, bis die Mehrzahl der Tiere der Kontrollgruppe einen generalisierten Anfall hatte. Insgesamt wurden elf Stimulationen benötigt bis die Mehrzahl der Tiere der Kontrollgruppe einen Anfall des Stadiums IV oder V hatten. Es folgte eine einwöchige Washout-Phase, in der die Tiere nicht stimuliert wurden und keine Substanzen appliziert bekommen haben. Danach wurden die Tiere fünf Mal restimuliert (ohne Substanzapplikation) bis alle Tiere, auch die der Substanzgruppen, einen generalisierten Anfall hatten. Im Anschluss wurde einmalig die sog. post ADT bestimmt, die zeigen sollte, ob sich die Schwellen im Laufe des Versuches veränderten. Daraufhin wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert (Abb.6).



**Abb.6: Versuchsdesign und zeitlicher Ablauf Kindling-Prozess-Studie**

*Studiendesign: Effekt auf die Anfallsgenerierung in vollgekindelten Tieren*

In dieser Studie wurden 18 Tiere ebenfalls täglich nach Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle stimuliert. Im Anschluss an den Kindling-Prozess wurde bei den Tieren jeden zweiten Tag die post-GST (generalized seizure treshold) bestimmt, bis die Schwellen nur noch geringfügig voneinander abwichen. Daraufhin konnte mit den Substanzversuchen begonnen werden. Hierzu erhielt jedes Tier am ersten Tag eine intraperitoneale Vehikelapplikation vor der Stimulation mit folgender Dokumentation einiger Krampfparameter. Gleiches galt für die zwei Tage später folgende Substanzverabreichung. Nach jeweils einer Pause von mindestens einem Tag konnten nach gleichem Schema die Substanzen in unterschiedlichen Dosen und Vorbehandlungszeiten untersucht werden.

#### 1.4. Substanzversuche

##### *Kindlingprozess*

Nachdem die initiale ADT und Schwelle bestimmt wurde, wurde den entsprechenden Tiergruppen die Vehikellösung (Cremophor EL, Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), und Saline) oder die Substanzen WIN55.212-2 und URB 597 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) täglich intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Der CB1-Rezeptor-Agonist WIN55.212-2 (2,5 mg/kg) und der FAAH-Inhibitor URB 597 (1 mg/kg) wurden in Cremophor EL,

DMSO und Saline (1:1:18) gelöst und 30 Minuten in einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg vor der Stimulation appliziert. Die Behandlung dauerte die elf Tage lange Stimulationsprozedur an.

Alle Tiere erhielten sofort nach der Stimulation sechs intraperitoneale Injektionen von 5'Bromodeoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg, gelöst in Saline, Verabreichungsvolumen 10ml/kg), einem Thymidin-Analogon, welches in die DNA eingebaut wird.

#### *Vollgekindelte Tiere*

WIN55.212-2 wurde in Dosen von 2,5 und 4 mg/kg, URB 597 in 1 mg/kg und 3 mg/kg bei Vorbehandlungszeiten von 30 bzw. 60 Minuten verabreicht. Die Dosierungen wurden basierend auf Naderi et al. (2008) bzw. Micale et al. (2009) ausgewählt, da beide zentralnervöse Effekte darstellen konnten. Eine höhere Dosierung von WIN55.212-2 führte zu unerwünschten Effekten, wie Sedation, Hypolokomotion und Ataxie. Beide Substanzen wurden i.p. in einem Volumen von 10 ml/kg 30 Minuten vor der Stimulation verabreicht.

Die höchste Dosis ohne Nebenwirkungen wurde jeweils mit einer Vorbehandlungszeit von 60 Minuten getestet.

Jedem Substanzversuch ging ein Vehikelkontrollversuch voraus, bei dem zwei bis drei Tage vor dem Substanzversuch die Vehikellösung appliziert wurde. Bei beiden Versuchen wurde anschließend die ADT bestimmt. Nach mindestens zwei Tagen Pause begann der nächste Vehikelkontrollversuch. Die Tieranzahl variierte zwischen den Experimenten aufgrund von Elektrodenverlust oder nicht mehr stabilen Schwellen der Tiere (n=9-12).

## 1.5. Histologische Gewebeaufbereitung

### *Perfusion*

Zur Perfusionsfixierung wurden die Tiere zunächst mit 500 mg/kg Chloralhydrat i.p. narkotisiert. Bei der Perfusionsfixierung wird das natürliche Gefäßsystem des Körpers für eine schnelle Fixierung des Gewebes verwendet. Hierfür wurde eine Knopfkanüle vom linken Herzventrikel in die Aorta geschoben. Das rechte Herzhorn wurde aufgeschnitten, um den Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung zu erlauben. Der gleichbleibende Perfusionsdruck wurde durch eine Pumpe gewährleistet. Dieser entsprach ungefähr dem Blutdruck des Tieres. Bevor das Fixans verwendet wurde, ist der Blutkreislauf der Ratte mit 0,01 M phosphatgepufferter 0,9%iger Kochsalzlösung (pH-Wert 7,6) gespült worden. Zur Fixierung wurde ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) mit einer Temperatur von 4°C verwendet. Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und in ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) überführt. Nach 24 Stunden wurden die Gehirne in 30%ige Saccharoselösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) für mindestens drei Tage verbracht, um einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten. Die Protokolle zur Herstellung der Pufferlösungen und des Fixans sind im Kapitel 10.2 aufgeführt.

### *Herstellung der Gefrierschnitte*

Die coronalen Gehirnschnitte wurden an einem Kryostaten (2800 Frigocut N, Fa. Leica, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Hierzu wurde das perfusionsfixierte Gehirn aufgefroren und es wurden 40 µm dicke coronale Serien angefertigt. Geschnitten wurde bei einer Objekttemperatur von etwa -25°C und einer Messertemperatur von -22°C. Die hergestellten Gehirnschnitte wurden zunächst in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen und anschließend in Gefriermedium überführt. Im Anschluss wurden die Schnittserien bei -80°C aufbewahrt.

## 1.6. Immunhistochemie

Die Immunhistologie wurde dazu benutzt mögliche Veränderungen in der neuronalen Plastizität darzustellen. Insbesondere wurde dabei der Effekt der Substanzen auf die Neurogenese analysiert.

### *Nissl-Färbung*

Zusätzlich zu den immunhistologischen Färbungen wurde eine Thioninfärbung angefertigt, um die Lokalisation der Elektrode zu bestimmen.

### *Doublecortin-Färbung*

Alle immunhistochemischen Färbungen, so auch die Doublecortin (DCX)-Färbung, wurden im sogenannten „Free-floating“-Verfahren durchgeführt. Die 40µm dicken Gehirnschnitte wurden zuerst drei mal fünf Minuten in 0,05 M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung (TBS; pH-Wert 7,6) gewaschen.

Bei der DCX-Färbung wurden die Schnitte in Natriumcitrat (pH-Wert 9) 30 Minuten bei 85°C demaskiert. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut mit TBS gewaschen wurden, wurde die endogene Peroxidase mittels 60minütiger Inkubation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destrukturiert. Nach erneutem Waschen, wurden die Schnitte für eine Stunde in eine Blocklösung (donkey serum) verbracht, um elektrostatische Ladungen zu neutralisieren. Über Nacht wurden die Schnitte nach sorgfältiger Spülung mit einem primären polyklonalen goat-anti-doublecortin Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) 1:200 inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit einem sekundären biotinilierten donkey-anti-goat Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) 1:500 behandelt. Durch ein erneutes mehrmaliges Spülen mit TBS im Anschluss hieran wurden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Als letzter Schritt erfolgt eine 60minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP, 1:4000; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA), die die Inkubation beendete. Ein erneutes Spülen mit TBS beseitigte überschüssige Meerrettich-Peroxidase. Die Sichtbarmachung der Antikörper erfolgte mittels einer

schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Hierzu wurden die Gehirnschnitte in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung verbracht (Peroxidase substrate kit DAB; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010). Nach 10 Minuten wurde diese Reaktion durch ein mehrmaliges Spülen mit TBS beendet. Die Schnitte wurden auf entfettete Objektträger aufgezogen, getrocknet, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### *BrdU-Färbung*

Die Färbung mit 5'Bromodeoxyuridin ist sehr ähnlich zu der von DCX. Ein Unterschied liegt in der Vorbehandlung, da bei der BrdU-Färbung die DNA mittels zweistündiger Inkubation bei 65°C in Formamid/SSC (Saline sodium citrat) und 30minütiger Spülung mit 2 N HCl bei 37°C denaturiert werden musste. Um überschüssiges HCl zu neutralisieren wurden die Schnitte in 0,1M Borsäure (pH 8,5) gewaschen. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler rat-anti-BrdU (AbD serotec, Düsseldorf, Deutschland) 1:150 und als sekundärer ein biotinylierter „rabbit-anti-rat“-Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) verwendet. Die Verdünnung von Streptavidin/HRP lag bei 1:3500.

#### *Doppel-Färbung*

Neugeborene Neurone wurden durch Doppelfärbung von BrdU und NeuN identifiziert.

Der Färbevorgang ist identisch mit dem der BrdU-Färbung. Folgende Antikörper wurden verwendet:

<b>primäre Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>	<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Monoklonaler rat-anti-BrdU	AbD serotec, USA	1:30	Cy3 donkey-anti-rat	Jackson Immuno Research, USA	1:1000
Monoklonaler mouse-anti-NeuN	Millipore, Hofheim	1:300	Cy2-Streptavidin	Jackson Immuno Research, USA	1:1000

**Tab.3: Bei immunhistochemischen Untersuchungen verwendete primäre und sekundäre Antikörper**

### **1.7. Auswertung**

Die Schnittebenen, die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach PAXINOS und FRANKLIN (2004) definiert. Die immunhistochemischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt.

#### *Bestimmung der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen und BrdU-positiver Zellen mittels der „optical fractionator“ Methode*

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen und DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen erfolgte mit der computergestützten Bildanalyse-Software Stereoinvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Das hierfür erforderliche 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 64er-Rechenprozessor. Die Zählung der Zellen erfolgte stereologisch mit der sogenannten „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Diese stereologische Zählmethode ist dazu geeignet, die absolute Zahl an Neuronen bzw. neuronalen Vorläuferzellen in diversen Gehirnbereichen, unbeeinflusst von deren Größe, Form und Orientierung oder einer jedweden Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes,



abzuschätzen. Wie bei der Schätzung großer Zellzahlen eines Gehirnareales üblich, werden auch bei der "optical fractionator" Methode aus der Gesamtheit der Zellen Proben genommen, deren Zellzahl exemplarisch gezählt wird. Die gezählte Zellzahl wird im Anschluss auf das gesamte Areal extrapoliert. Die Besonderheit der "optical fractionator" Methode ist, dass eine Aussage über die Zellzahl pro Volumeneinheit möglich ist. Dies ist von wesentlicher Bedeutung, da assoziiert mit der Pathophysiologie oder der Applikation von Festsubstanzen Veränderungen im Volumen der zu analysierenden Gehirnregion auftreten können.

Diese dreidimensionale Probe innerhalb der nach festgelegten Regeln quantifiziert wird, ist der „optical disector“. Mit dem Ziel bei der Quantifizierung der Zellzahl einen möglichst ausgedehnten Bereich des relevanten Gehirngbietes auswerten zu können, wurden pro Tier und Seite jeweils fünf Schnitte in gleichmäßigem Abstand ausgezählt.

## **1.8. Statistik**

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean, Standardfehler). Für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben, die nicht normalverteilt und deren Einzelwerte nicht verbunden sind, wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden Dunn's post hoc-Test verwendet. Zudem wurde geprüft, ob sich die Daten entsprechend einer Normalverteilung nach Gauß verhalten.

Für den Vergleich von zwei Stichproben bei Vorliegen parametrischer Daten wurde der Student's t-Test angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten (z.B. alle über ein Score-System ermittelten Daten) wurde ein Mann-Whitney U-Test angewendet. Für die Analyse der Anzahl von Tieren mit generalisierten Anfällen wurde der Fisher's exact-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Prinzipiell wurden alle statistischen Berechnungen zweiseitig durchgeführt.

Allein wenn basierend auf der bekannten Literatur oder eigener Daten eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

## V. ERGEBNISSE

### 1. Effekt von Modulatoren des Endocannabinoidsystems auf die Kindling-Progression und assoziierte zelluläre Veränderungen

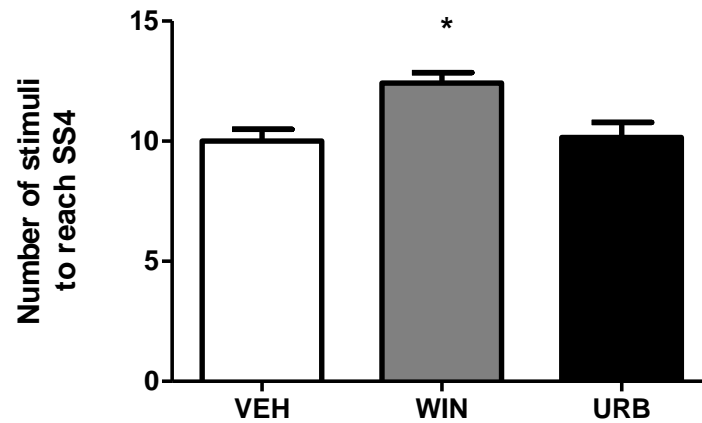
Zur Untersuchung der Modulatoren des Endocannabinoidsystems auf die Kindling-Progression und assoziierte zelluläre Veränderungen wurde in dieser Studie das Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie verwendet. Hierfür wurde bei 39 männlichen NMRI-Mäusen eine Stimulations- bzw. Ableitungselektrode chronisch in die rechte basolaterale Amygdala implantiert. Drei Tiere konnten für die Studie nicht mehr verwendet werden. Ein Tier verstarb kurz nach der OP. Ein weiteres verlor aufgrund einer Entzündung im Verlauf der Rekonvaleszenzphase ihre Implantationselektrode. Eine Maus musste aus der Studie genommen werden, da bei dieser im Kindling kein Basal-EEG abgeleitet werden konnte. Aufgrund dieses Verlustes umfassten die Gruppen folgende Tierzahlen: Gruppe Vehikel 12 Mäuse, Gruppe WIN55.212-2 12 Mäuse, Gruppe URB 597 13 Mäuse.

#### *Auswirkung des CB1-Rezeptor-Agonists und des FAAH-Inhibitors auf das Kindling*

Es ist zu erwähnen, dass die Dauer des Kindling-Prozesses begrenzt wurde. Sobald die Mehrheit der vehikel-behandelten Tiere einen generalisierten Anfall hatte, wurde die Stimulation abgebrochen. Aufgrund des Fehlens einer Progression bei der Anfallsschwere in dieser Phase als auch in der Phase der Restimulation wurde angenommen, dass die Elektrode bei einem Tier nicht korrekt platziert wurde. Eine spätere Analyse zeigte jedoch eine korrekte Lokalisation in der rechten Amygdala. Demzufolge wurde dieses Tier für die Datenanalyse der Kontrollgruppe herangezogen.

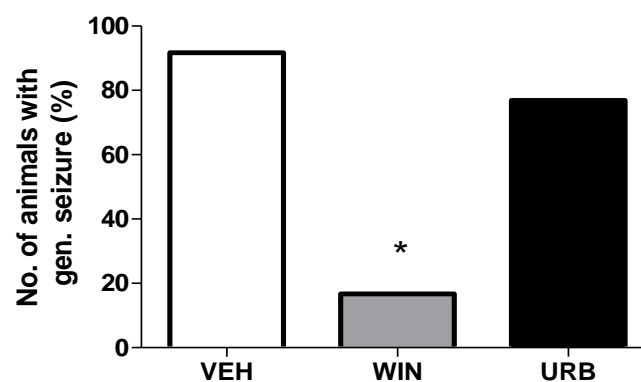
Der CB1-Rezeptor-Agonist WIN55.212-2 retardierte die Kindling-Progression signifikant. Die durchschnittliche Anzahl an Stimulationen, die

notwendig sind, einen generalisierten Anfall (mind. Typ 4) auszulösen, stieg bedingt durch die Verabreichung von WIN55.212-2 signifikant um 24% an (Abb.7).



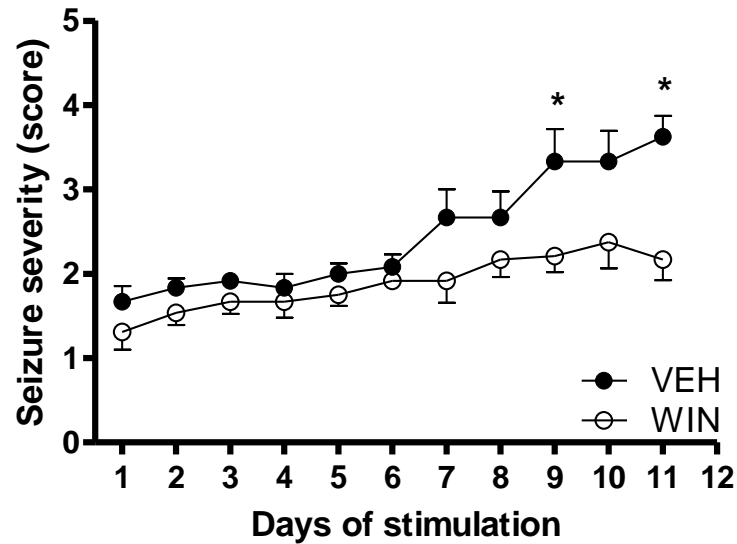
**Abb.7: Anzahl an Stimulationen, die nötig waren, um einen Anfall Typ 4 auszulösen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Mit WIN55.212-2 behandelte Tiere benötigten signifikant mehr Stimulationen zur Ausbildung eines Typ 4-Anfalls. \*  $p = 0,05$**

Darüber hinaus reduzierte sich die Zahl an Tieren, die während der 12 Stimulationstage einen generalisierten Anfall zeigten auf 17% (Abb.8).



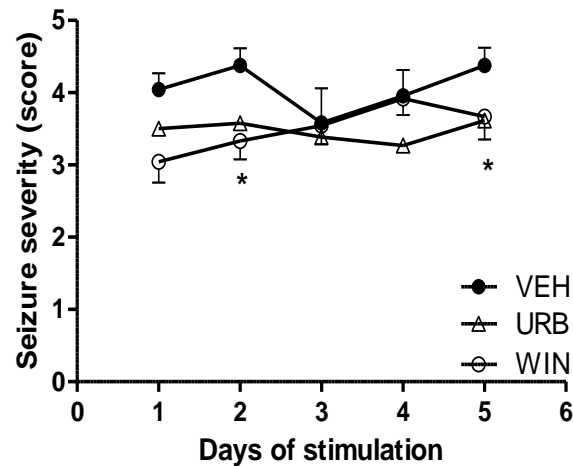
**Abb.8: Anzahl der Tiere in %, die einen generalisierten Anfall zeigten. Nur 17% der WIN-behandelten Tiere bildeten einen generalisierten Anfall aus. \*  $p = 0,05$**

An den Stimulationstagen neun und elf war die durchschnittliche Anfallsschwere bei WIN-behandelten Tieren niedriger im Vergleich zur Vehikelgruppe (Abb.9).



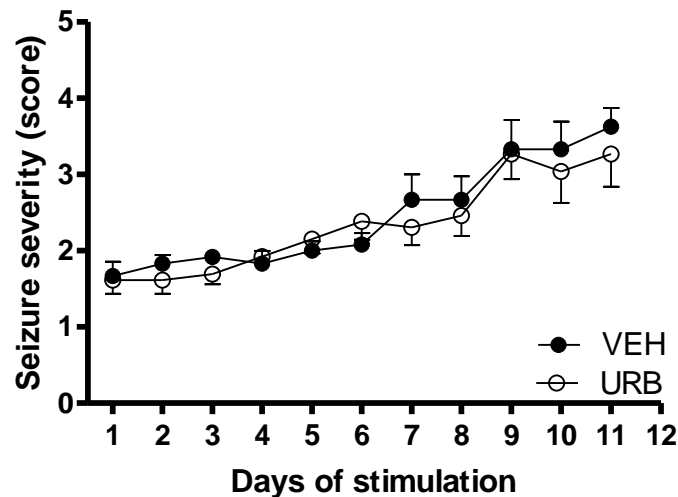
**Abb.9: Kindling-Verlauf der WIN-behandelten Gruppe und der Vehikelkontrolltiere (Mittelwert  $\pm$  SEM). An Tag neun und elf war die Anfallsschwere der Tiere, die mit WIN55.212-2 behandelt wurden, signifikant niedriger. \* p = 0,05**

Während Tag zwei und fünf der Restimulation zeigten die Mäuse, welche mit WIN55.212-2 vorbehandelt wurden, eine durchschnittlich niedrigere Anfallsschwere (Abb.10).



**Abb.10: Kindling-Verlauf der drei Behandlungsgruppen während der Restimulation (Mittelwert  $\pm$  SEM). An Tag zwei und fünf war die Anfallsschwere der Tiere, die mit WIN55.212-2 behandelt wurden, signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. \*  $p = 0,05$**

Im Gegensatz zum CB1-Rezeptor-Agonist übte der FAAH-Inhibitor URB 597 keinen signifikanten Effekt auf die Kindling-Progression aus (Abb.11). Die durchschnittliche Anfallsschwere an den verschiedenen Stimulationstagen und die Anzahl an Stimulationen, die notwendig sind, um einen generalisierten Anfall zu erzeugen, lagen in einem ähnlichen Bereich wie bei vehikel-behandelten Mäusen.

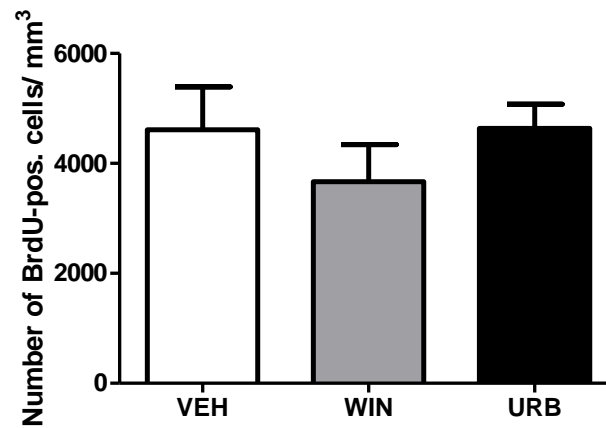


**Abb.11: Kindling-Verlauf der URB-behandelten Gruppe und der Vehikel-Kontrolltiere (Mittelwert  $\pm$  SEM). Der Verlauf wurde von URB 597 nicht beeinflusst.**

*Auswirkung von WIN55.212-2 und URB 597 auf die hippocampale Zellproliferation und Neurogenese im Amygdala-Kindling Modell.*

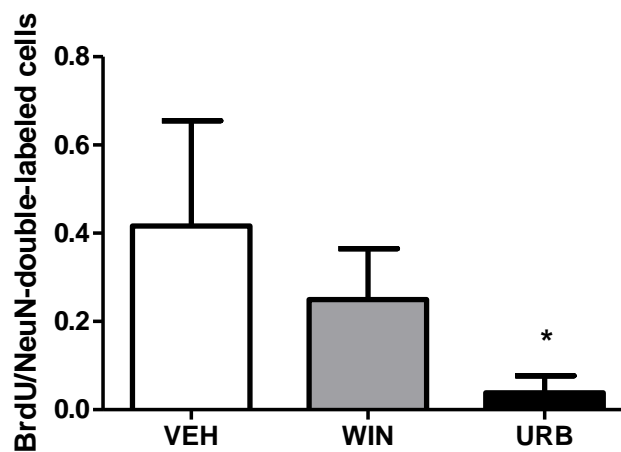
Basierend auf der BrdU-Verabreichung während des Kindling wurde der Grad der hippocampalen Zellproliferation analysiert. Die Doppelmarkierung mit NeuN wurde verwendet, um den Einfluss der Testsubstanzen auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen zu beurteilen. In allen drei Behandlungsgruppen waren doppelmarkierte Zellen in der Proliferationszone und in der Körnerzellschicht nachweisbar. Eine gründliche Analyse des Hilus ergab keinen Hinweis für eine aberrante Migration neugeborener Körnerzellen.

WIN55.212-2 und URB 597 beeinflussten die Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus nicht (Abb.12).



**Abb.12: Anzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus (Mittelwert  $\pm$  SEM). Zwischen den Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.**

Der CB1-Rezeptor-Agonist übte ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl doppelmarkierter BrdU/NeuN-Zellen aus. Der FAAH-Inhibitor jedoch senkte die Anzahl neugeborener Zellen signifikant um 93% (Abb.13).

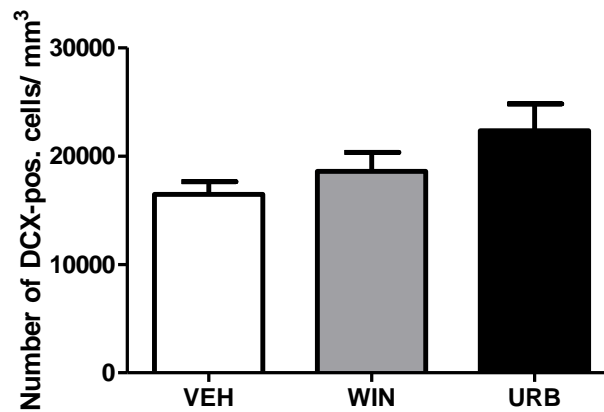


**Abb.13: Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen im Gyrus dentatus (Mittelwert  $\pm$  SEM). URB-behandelte Tiere zeigen signifikant weniger doppelmarkierte Zellen im Vergleich zur Vehikelgruppe. \*  $p = 0,05$**



Aufgrund mangelhafter Färbung der, für die BrdU/NeuN Doppelmarkierung ausgewählten Schnitte, konnten die Daten von sechs Tieren der Kontrollgruppe nicht ausgewertet werden.

Doublecortin gilt als einer der Schlüsselmarker für neuronale Vorläuferzellen im Hippocampus (COUILLARD-DESPRES et al. 2005). Bei der Analyse der Immunhistochemie von DCX wurde überprüft, ob die Substanzen einen Einfluss auf die Zellpopulation im Gyrus dentatus ausüben. Unabhängig von der Behandlung ist die Anzahl neuronaler Vorläuferzellen ähnlich (Abb.14).



**Abb.14: Anzahl DCX-positiver Zellen im Gyrus dentatus (Mittelwert  $\pm$  SEM). Zwischen den Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.**

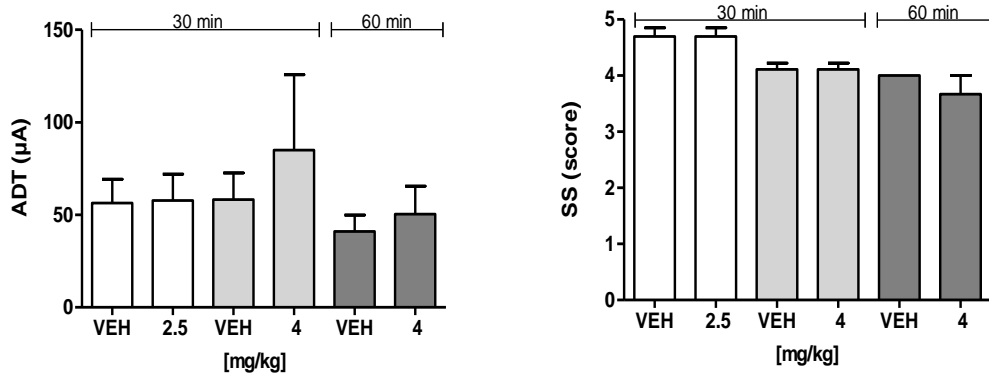
DCX-positive Zellen in der Proliferationszone wurden hinsichtlich der Ausbildung persistierender basaler Dendriten untersucht. Es war jedoch in keiner Behandlungsgruppe eine relevante Anzahl basaler Dendriten zu ermitteln.

## 2. Effekt von Modulatoren des Endocannabinoidsystems auf Krampfschwellen an vollgekindelten Tieren

Zur Untersuchung der Wirkung von Modulatoren des Endocannabinoidsystems auf die Krampfschwellen an vollgekindelten Tieren wurde in dieser Studie ebenfalls das Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie angewendet.

### *Einfluss eines CB1-Rezeptor-Agonisten auf die Anfallsauslösung in vollgekindelten Mäusen*

Der CB1-Rezeptor-Agonist WIN55.212-2 wurde mit den Dosierungen von 2,5 und 4 mg/kg und einer Vorbehandlungszeit von 30 min an vollgekindelten Mäusen getestet. Keine dieser Dosierungen beeinflusste die Nachentladungsschwelle im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe. WIN55.212-2 hatte ebenfalls keinen Effekt auf die während der Stimulation aufgezeichneten Parameter Anfallsschwere, Anfallsdauer und Nachentladungsdauer (Abb.15).

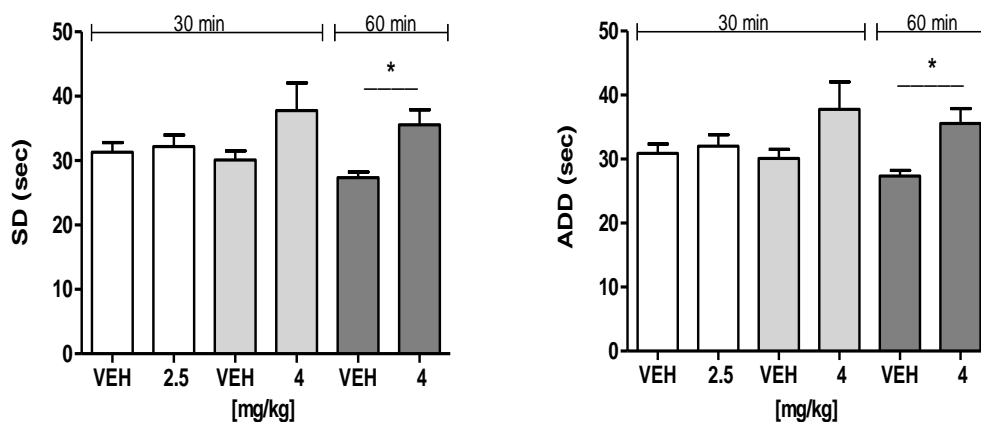


**Abb.15: Nachentladungsschwelle (ADT) und Anfallsschwere (SS) WIN-behandelter Tiere im Vergleich zur Vehikelgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM).**

Eine Maus zeigte vor der Stimulation einen spontanen Anfall beim Experiment mit 2,5 mg/kg WIN55.212-2. Aus diesem Grund wurden die

Daten dieses Tieres bei diesem Versuch nicht für die Analyse verwendet.

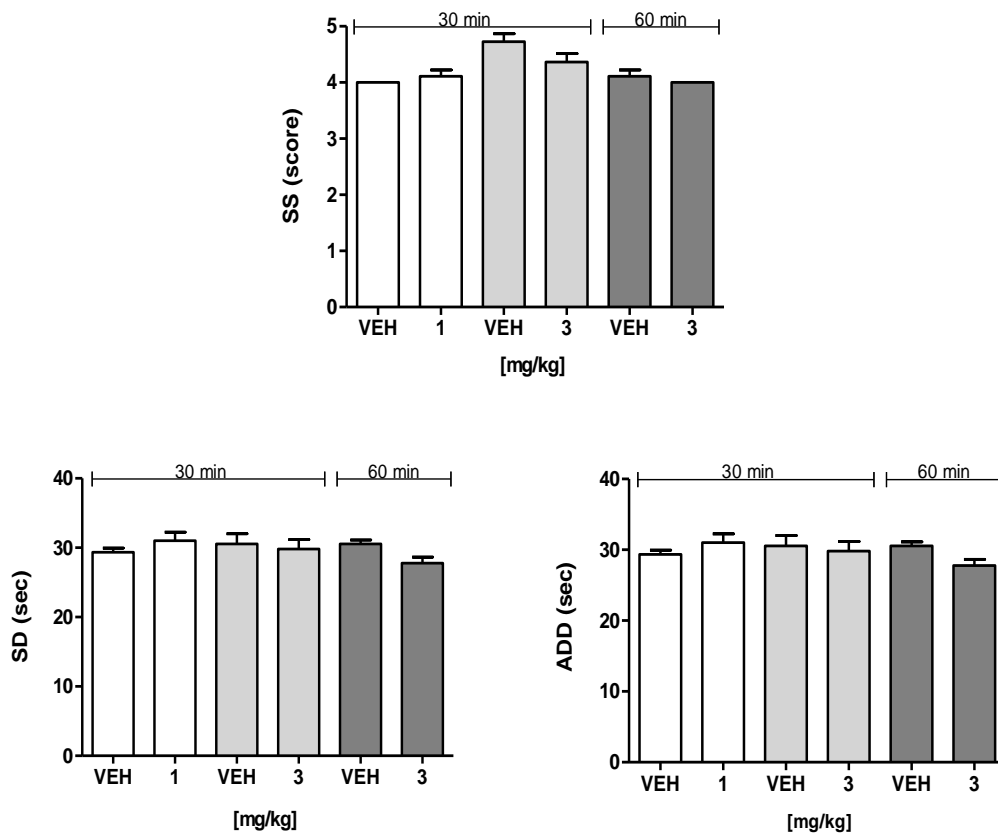
Die höchste Dosis, die verwendet wurde, wurde zusätzlich mit einer Vorbehandlungszeit von 60 min getestet. WIN55.212-2 erhöhte bei dieser Vorbehandlungszeit mit der Dosis 4 mg/kg signifikant die Dauer der Anfallsaktivität (Abb.16). Auf die weiteren aufgezeichneten Parameter hatte WIN55.212-2 keinen Effekt.



**Abb.16: Anfallsdauer (SD) und Nachentladungsdauer (ADD) WIN-behandelter Tiere im Vergleich zur Vehikelgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM). Bei einer Vorbehandlungszeit von 60 min und einer Dosis von 4 mg/kg erhöhte WIN55.212-2 Anfallsdauer und Nachentladungsdauer signifikant. \*  $p = 0,05$**

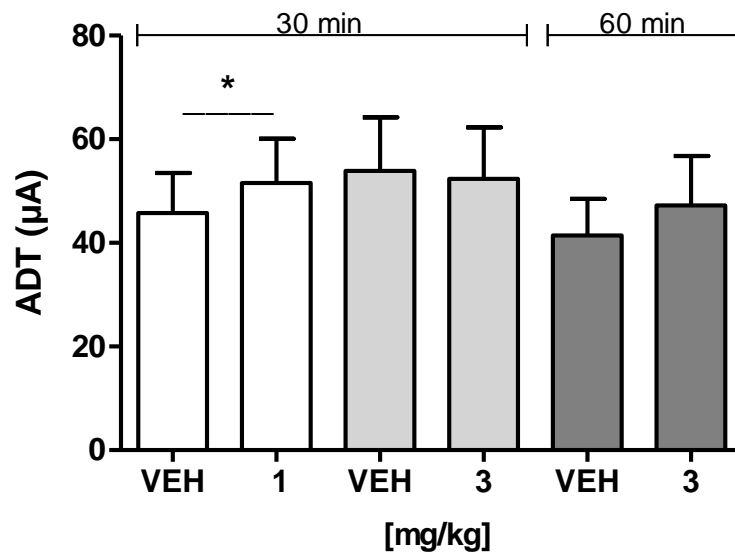
#### *Auswirkung der FAAH-Inhibition auf die Anfallsauslösung in vollgekindelten Mäusen*

Unabhängig von der Vorbehandlungszeit (30 oder 60 min) hatte der FAAH-Inhibitor URB 597 in einer Dosierung von 3 mg/kg weder einen Effekt auf die Schwelle von Nachentladungen noch auf die Anfallsparameter, die während der Stimulation aufgezeichnet wurden (Abb.17).



**Abb.17: Anfallsschwere (SS), Anfallsdauer (SD) und Nachentladungsdauer (ADD) bei URB-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM).**

Im Gegensatz dazu erhöhte die Applikation von URB 597 in einer geringeren Dosierung (1 mg/kg) 30 min vor der Stimulation die Nachentladungsschwelle signifikant um 13% (Abb.18). Die Anfallsparameter waren denen der Kontrollgruppe ähnlich.



**Abb.18: Nachentladungsschwelle (ADT) bei URB-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM). URB 597 erhöhte die Nachentladungsschwelle bei einer Vorbehandlungszeit von 30 min und der Dosierung 1 mg/kg signifikant. \*  $p = 0,05$**

## VI. DISKUSSION

Eine Aktivierung des Endocannabinoidsystems kann die synaptische Signalübertragung effektiv modulieren (KATONA u. FREUND 2008). Seine inhibitorischen Feedback-Mechanismen können im Besonderen vor einer übermäßigen präsynaptischen Aktivität schützen. Darüberhinaus wurde beschrieben, dass sich eine Aktivierung des CB1-Rezeptors möglicherweise auf die neuronale Plastizität auswirkt. Dazu zählt die Bildung und das weitere Schicksal neugebildeter Neurone im Gyrus dentatus. Aufgrund seiner Wirkung wird die pharmakologische Modulation des Endocannabinoidsystems intensiv als mögliche therapeutische Strategie erörtert, welche Anfallsschwellen und Iktogenese beeinflussen könnte (GORDON u. DEVINSKY 2001; LUTZ 2004; GRANT u. CAHN 2005). Des Weiteren nehmen wir an, dass sich eine Modulation des Endocannabinoidsystems auch auf die Ausbildung eines hyperexzitablen epileptischen Netzwerkes und auf den Prozess der Epileptogenese auswirken könnte.

Versuche an vollgekindelten Mäusen zeigten keinen signifikanten Einfluss des CB1-Rezeptor-Agonisten WIN55.212-2 auf die Anfallsschwellen. Eine Modulation des endocannabinoiden Signalweges durch die Applikation des FAAH-Inhibitors URB 597 übte ebenfalls keinen Einfluss auf die Anfallsschwellen im Kindling-Modell aus.

In Betracht der guten prädiktiven Validität des Amygdala Kindling-Modells für komplex-fokale Anfälle (LOSCHER 2002) sprechen diese Daten gegen ein therapeutisches Potential des CB1-Rezeptor-Agonisten und des FAAH-Inhibitors für diesen Anfallstyp. Des Weiteren wird diese Aussage durch die Beobachtung gestützt, dass WIN55.212-2 in hoher Dosierung die Anfallsdauer verlängerte. Das deutet daraufhin, dass eine Aktivierung des CB1-Rezeptors störend auf den endogenen Mechanismus einwirkt, welcher die Anfallsaktivität limitiert. Die pharmakologische Beeinflussung des Endocannabinoidsystem wurde bereits in vielen anderen Anfalls- und Epilepsiemodellen getestet (WALLACE et al. 2002; MARSICANO et al. 2003; WALLACE et al. 2003; LUTZ 2004; CHEN et al. 2007; MONORY et

al. 2007; DUDEK et al. 2010). In diesen Studien übte die direkte und indirekte Aktivierung der CB1-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Art des Modells und der gewählten Dosierungen einen pro- od. antikonvulsiven Effekt aus (LUTZ 2004).

Die meisten dieser Modelle zählen zu den akuten Anfallsmodellen mit Induktion von Anfällen bei naiven Tieren. Die Expression und die Funktion des Endocannabinoidsystems kann durch eine Epilepsie signifikante Veränderungen erfahren (CHEN et al. 2007; MONORY et al. 2007; LUDANYI et al. 2008; NADERI et al. 2008). Die Ergebnisse von akuten Anfällen sind jedoch nicht direkt mit einem chronischen Modell zu vergleichen, welches zahlreiche molekulare und zelluläre Veränderungen widerspiegelt, die für ein epileptisches Gehirn charakteristisch sind. Daten aus chronischen Modellen waren bisher beschränkt auf die Evaluierung des CB1-Rezeptor-Agonisten Delta9-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) und der Effekte von WIN55.212 in der chronischen Phase des Pilocarpin-Modells bei Ratten (WALLACE et al. 2003). In diesem Post-Status-epilepticus-Modell entwickeln die Tiere Wochen nach einer chemischen Induktion eines Status epilepticus spontane Anfälle. Sowohl  $\Delta$ 9-THC als auch WIN55.212 konnten effektiv wiederkehrende spontane Anfälle unterdrücken, wohingegen der CB1-Rezeptor-Antagonist SR141716A die Anfallsfrequenz und Anfallsdauer erhöhte. Die Ergebnisse scheinen im Gegensatz zum Fehlen eines antikonvulsiven Effekts des CB1-Rezeptor-Agonisten bei vollgekindelten Mäusen zu stehen. Diese Diskrepanz könnte durch eine unterschiedliche Prädiktivität der Modelle, Unterschiede zwischen den Spezies und verschiedene Behandlungsprotokolle erklärt werden.

Klinische Daten von Epilepsiepatienten sind auf Erzählungen, Fallberichte und Interviews über Marihuanakonsum beschränkt. Die Mehrheit der Patienten (90,2%) beschrieben in Gesprächen keinen Zusammenhang zwischen ihrem Marihuanakonsum und der Anfallsfrequenz (GORDON u. DEVINSKY 2001). Obwohl sich diese Daten mit Ergebnissen von gekindelten Tieren decken, sollten die Grenzen solcher Interviews berücksichtigt werden. Zu erwähnen ist vor allem ein möglicher Einfluss durch eine mangelnde Compliance, Erinnerungslücken und weiterem

Drogenmißbrauchs, welcher im Zusammenhang mit dem Genuss von Marihuana auftreten kann.

Eines der Hauptziele der Epilepsieforschung ist die Entwicklung präventiver Strategien, die sich auf die Krankheitsentstehung und den Verlauf auswirken (PITKANEN u. LUKASIUK 2009). Vor allem für Patienten, die einen Gehirninsult erleiden, könnten solche Forschungsansätze von großer Bedeutung sein. Insulte wie ein Schädelhirntrauma oder eine Ischämie stehen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung epileptischer Symptome in Verbindung. Wiederholte Kindlingstimulationen gehen mit einer progressiven Entwicklung von Anfallsschwere und -dauer einher. Das spiegelt die Entstehung eines hyperexzitablen Netzwerks und die damit auftretenden zellulären Veränderungen wider, wie sie in ähnlicher Weise bei einem Patienten mit Temporallappenepilepsie zu sehen sind (LOSCHER 2002). In dieser Studie verzögerte WIN55.212-2 den Kindlingverlauf signifikant. Das deutet daraufhin, dass durch den CB1-Rezeptor-Agonist Effekte einsetzen, die die Entwicklung eines übererregbaren Netzwerks verzögern und vor epileptischen Symptomen infolge eines initialen Gehirninsults schützen. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung der CB1-Rezeptor-vermittelten Plastizität bei der Ausbildung eines hyperexzitablen Netzwerks im epileptischen Gehirn. Demzufolge zielt eine pharmakologische Modulation des Endocannabinoidsystems darauf ab, die CB1-Rezeptor-Signalübertragung zu verstärken. Diese Strategie könnte für eine Krankheitsmodifikation oder die Entwicklung antiepileptogener Strategien in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass ein gegensätzlicher pharmakologischer Ansatz im Rattenmodell für traumatische Hirnverletzung bereits geschildert wurde (ECHEGOYEN et al. 2009). In diesem Modell wurde gezeigt, dass eine einzelne Applikation des CB1-Rezeptor-Antagonisten SR141716 gegen eine dauerhafte Übererregbarkeit schützte. Eine weitere Überprüfung durch Dudek und Kollegen (DUDEK et al. 2010) konnte diesen Ansatz nicht als geeignete allgemeine antiepileptogene Strategie bestätigen. In der frühen Phase der Epileptogenese im adulten Kainat-Modell bei der Ratte übte SR141716 keinen messbaren Effekt auf die Entwicklung der spontanen



Anfallsaktivität aus.

Beruhend auf unseren Daten, die wir durch den CB1-Rezeptor-Agonisten erhielten, erwarteten wir durch eine FAAH-Inhibition vergleichbare Effekte auf den Kindlingverlauf. Allerdings wirkte sich die Inhibition während des Kindlings nicht auf den Anfallsverlauf aus. Die Verstärkung der Signalübertragung im endocannabinoiden System wird allgemein als vielversprechende alternative therapeutische Möglichkeit angesehen. Sie sollte, ähnlich wie beim direkten CB1-Rezeptor-Agonismus, mit wenigen Nebeneffekten einhergehen (KATONA u. FREUND 2008). Der synaptische Endocannabinoidmechanismus wird an bestimmten Synapsen aktiviert, sobald die Modulation der synaptischen Neurotransmitterfreisetzung nötig ist, um homöostatische Bedingungen zu schaffen oder zu erhalten. Folglich sollte die Inhibition des Abbaus von Endocannabinoiden einen Lösungsansatz liefern, der sich nur auf Synapsen mit erhöhter oder sogar exzessiver Aktivität auswirkt. Wie bekannt ist, baut das Enzym FAAH das Endocannabinoid Anandamid ab. Dessen Hemmung führt zu einer erhöhten Konzentration von Anandamid (PACHER et al. 2006; PIOMELLI et al. 2006). Anandamid wurde ursprünglich als ein wichtiger endogener Ligand des CB1-Rezeptors betrachtet. Diese Ansicht wurde jedoch durch Ergebnisse, die gegen eine Schlüsselrolle der Anandamide in der CB1-Rezeptor-Signalübertragung sprechen, angezweifelt. Die Erhöhung etwa des Anandamidlevels durch FAAH-Hemmung hatte keinen Einfluss auf die CB1-Rezeptor-Signalübertragung, die bei Gefrierschnitten von Rattengehirnen analysiert wurden (PALOMAKI et al. 2007). Das Fehlen eines möglichen Einflusses auf die CB1-Rezeptor-Aktivität könnte auch mit den spezifischen Eigenschaften von FAAH zusammenhängen. Dazu zählt seine intrazelluläre Lage mit Zugang zur postsynaptischen Zelle, der von der Anandamidaufnahme abhängig ist (GULYAS et al. 2004). Bei der pharmakologischen Modulation der Anandamidkonzentration sollte beachtet werden, dass dieses Endocannabinoid möglicherweise verschiedene Funktionen in Bezug auf die CB1-Signalübertragung besitzt. Es gibt Hinweise, dass Anandamid womöglich als Inhibitor fungiert, der die Biosynthese des Endocannabinoids und CB1-Rezeptor-Liganden

2-Arachidonylglycerid hemmt (MACCARRONE 2008). In Anbetracht des momentanen Wissensstands ist weitere Forschung notwendig, um die direkten und indirekten Effekte von Anandamid auf die CB1 Rezeptor-Aktivität besser verstehen zu können. Zusätzlich wird dieses Endocannabinoid in Verbindung gebracht mit der Beeinflussung vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse durch die Aktivierung einiger molekularer Zielstrukturen (PERTWEE 2005). Darunter wurde der „transient receptor potential vanilloid“ Rezeptor Typ 1 (TRPV1) als antiepileptogene Zielstruktur bezeichnet (FU et al. 2009). Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass TRPV1 die aktivitätsabhängige synaptische Wirksamkeit modulieren kann. Genauer wurde gezeigt, dass es selektiv exzitatorische Synapsen an hippocampalen Interneuronen hemmt, was wiederum die Erregbarkeit innervierter Pyramidenzellen erhöhen sollte (FU et al. 2009). In Betracht der Komplexität der Vorgänge, die durch Anandamid aktiviert werden, ist das Fehlen von Effekten von URB 597 im Kindling-Modell eventuell mit nützlichen und schädlichen Effekten in Verbindung zu bringen, die sich gegenseitig aufheben.

Die Modulation der aberranten Neurogenese, die während der Entstehung eines übererregbaren epileptischen Netzwerks abläuft, wird als mögliches Ziel für präventive Strategien diskutiert (SCHARFMAN u. GRAY 2007; PARENT u. MURPHY 2008). Es konnte festgestellt werden, dass neuronale Vorläuferzellen ein funktionales Endocannabinoidsystem aufweisen, welches einen Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung ausübt (GALVE-ROPERH et al. 2007). Aus diesem Grund beurteilten wir den Einfluss des CB1-Agonisten und des FAAH-Inhibitors in Bezug auf die Zellproliferationsrate und auf die Anzahl von Vorläuferzellen und neugebildeter Neuronen. Allerdings blieb die Zellproliferationsrate während des Kindlings und die Anzahl neuronaler Vorläuferzellen nach Beendigung des Prozesses durch beide Wirkstoffe unverändert. Die Zahl neugebildeter Neurone, die während des Kindlingverlaufs entstanden sind, wurde durch den FAAH-Inhibitor gesenkt. Da kein vergleichbarer Effekt bei der Behandlung mit dem CB1-Rezeptor-Agonisten auftrat, ist es unwahrscheinlich, dass die Wirkung CB1-Rezeptor vermittelt ist. Der CB1-Rezeptor-Agonist verzögerte zwar

die Kindling-Progression. Hingegen wurde die hippocampale Zellproliferation und Neurogenese nicht beeinflusst. Der FAAH-Inhibitor wirkte sich in umgekehrter Weise nicht auf das Kindling aus, obwohl er die Neurogenese modulierte. Diese Tatsachen sprechen gegen eine Schlüsselrolle der Neurogenese bei der Entstehung eines übererregbaren Netzwerks.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass eine CB1-Rezeptor-Aktivierung als mögliche krankheitsverändernde antiepileptogene Strategie in Betracht zu ziehen ist. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um die Wirksamkeit in anderen chronischen Epilepsiemodellen zu bestätigen. Eine weitere Schwierigkeit betrifft die Entwicklung von Strategien zur Beeinflussung des Endocannabinoidsystems, da CB1-Rezeptoren sowohl an exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen exprimiert werden. Erste Untersuchungen bei Knockout Mäusen mit fehlendem CB1-Rezeptor in einer ausgewählten neuronalen Subpopulation zeigten, dass CB1-Rezeptoren die an glutamatergen hippocampalen Neuronen exprimiert wurden, überwiegend für den schützenden Effekt des Endocannabinoidsystems in der akuten Phase des Status epilepticus Modell verantwortlich sind (MONORY et al. 2007). Diesen Ansatz aufgreifend, sind weitere Studien bei diesem Mausstamm im Amygdala-Kindling-Modell geplant, um den Einfluss des CB1-Rezeptors in verschiedenen neuronalen Subpopulationen auf die Entstehung eines hyperexzitablen Netzwerks zu untersuchen. Zusätzlich sollen die Folgen der TRPV1-Deletion beurteilt werden. Diese Experimente sollten unser Verständnis über die Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Epileptogenese verbessern. Ebenso sollten sie die Grundlage für die zukünftige Entwicklung von präventiven Strategien stärken.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Hannes Wendt

### **Pharmakologische Modulation der hippocampalen Neurogenese im Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie**

Epilepsien sind durch das wiederholte und spontane Auftreten von Anfällen zentralen Ursprungs charakterisiert. Für die Verhinderung oder zumindest eine Reduktion der Anfälle gilt die chronische Applikation von Antiepileptika als Therapie der Wahl. Trotz der Entwicklung neuer Antiepileptika sprechen nach wie vor bis zu 30% der Veterinär- und Humanpatienten auf eine Pharmakotherapie nicht an. Die genauen Mechanismen, die der Entstehung einer Epilepsie zugrunde liegen, sind nicht im Detail bekannt. Daher sind Therapiestrategien, die in solche Prozesse eingreifen könnten, sehr schwierig zu entwickeln.

Endocannabinoide wie 2-Arachidonylglycerid und Anandamid wirken über den Cannabinoid1-Rezeptor an präsynaptischen Nervenendigungen. Diese retrograde Signalübertragung führt zu Kalium-Ausstrom, Kalzium-Einstrom, Neurotransmitter-Freisetzung und verschiedenen Arten von synaptischer Plastizität. Zudem kann die Aktivierung der CB1-Rezeptoren eine Übererregbarkeit glutamaterger Neurone reduzieren. Exzessive Glutamatausschüttung ist ein pathophysiologischer Hauptfaktor im epileptischen Gehirn, der sich auf die Entstehung von Anfällen und assoziierten zelluläre Prozesse, wie einen Verlust von Neuronen, auswirkt. Während der Epileptogenese scheint die neuronale Plastizität die glutamaterge Signalübertragung zu erhöhen. Studien in akuten Anfallsmodellen und einem chronischen Epilepsiemodell zeigten nach Modulation des endocannabinoiden Systems unterschiedliche Ergebnisse was eine anti- oder prokonvulsive Wirkung betrifft. Aufgrund dieser Daten lag unser Interesse nun darin heraus zu finden, in wieweit sich eine pharmakologische Modulation des Endocannabinoidsystems auf Anfallsschwellen in einem chronischen Epilepsiemodell der Temporallappenepilepsie auswirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das

Endocannabinoidsystem in den Prozessen der Epileptogenese eine Rolle spielen kann. Wir untersuchten die Effekte des CB1 Rezeptor-Agonisten WIN55.212-2 und URB 597. URB 597 hemmt das Enzym „fatty acid amide hydrolase“ (FAAH), wodurch der Abbau von Anandamid reduziert wird.

In vollgekindelten Mäusen waren die Effekte auf die Anfallsschwelle und andere Anfallsparameter nur gering ausgeprägt, wobei keine Dosisabhängigkeit erkannt werden konnte. Nach einigen elektrischen Stimulationen mit gleichbleibender Stimulationsstärke zeigen die Tiere im Kindling zunächst fokale Anfälle, die bei Fortführung der Stimulation sekundär generalisieren. Die Empfindlichkeit des Gehirns auf den Stimulus nimmt fortlaufend bis zu einem bestimmten Zeitpunkt zu, an dem sich der erhöhte Grad der Empfindlichkeit nicht weiter verändert. Die Tiere gelten zu diesem Zeitpunkt als „vollgekindelt“. Bei Versuchen für die Beurteilung des Einflusses auf den Kindlingverlauf, verminderte WIN55.212-2 signifikant die Progression der Anfallsschwere. Die Anzahl an Stimulationen, die notwendig waren, um einen generalisierten Anfall auszulösen, wurde durch den CB1-Rezeptor-Agonisten signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu, hatte URB 597 keinen Effekt auf die Entwicklung von Anfällen während des Kindling. Analysen der Zellproliferation und Neurogenese während des Kindlingprozesses zeigten eine signifikante Reduktion neugebildeter Zellen durch URB 597 im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe. WIN55.212-2 wies keinen vergleichbaren Effekt auf.

Diese Ergebnisse sprechen für eine CB1-Rezeptor-Aktivierung als krankheitsmodifizierenden und potenziellen antiepileptogenen Ansatz. Da kein Zusammenhang zwischen der Neurogenese und dem Einfluss auf die Kindling-Progression zu erkennen ist, gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Neurogenese bei der Ausbildung eines übererregbaren epileptischen Netzwerks eine Schlüsselrolle spielt.

Es sind weitere Studien notwendig, um die Wirksamkeit von CB1-Rezeptor-Agonisten in anderen chronischen Epilepsiemodellen zu bestätigen. Des Weiteren sollte die Rolle verschiedener Faktoren, die bei der endocannabinoiden Signalübertragung während der Epileptogenese beteiligt sind, geklärt werden.

## VIII. SUMMARY

Hannes Wendt

### **Pharmacological modulation of hippocampal neurogenesis in the kindling model of temporal lobe epilepsy**

Epilepsy is characterized by the repeated and spontaneous occurrence of seizures of central origin. For the prevention or at least the reduction of seizures, the chronic application of antiepileptic drugs is considered the therapy of choice. Despite the development of new antiepileptic drugs, up to 30 percent of veterinary and human patients do not respond to therapies that are based on medication. The precise mechanisms that cause epilepsy continue to be unknown. Consequently, therapeutic strategies that affect such processes are difficult to develop.

Endocannabinoids such as 2-arachidonylglycerol (2-AG) and anandamide act upon CB1 cannabinoid receptors in presynaptic nerve terminals. This retrograde signaling affects potassium efflux, calcium influx, neurotransmitter release, neuronal activity, and different forms of synaptic plasticity. CB1 receptor activation can reduce neuronal excitability in glutamatergic neurons. Excessive glutamatergic transmission is a major pathophysiological factor in the epileptic brain, contributing to seizure generation and its cellular consequences such as neuronal cell loss. During epileptogenesis, i.e. during the development of a hyperexcitable epileptic network as a consequence of an initial brain insult, neuronal plasticity that enhances glutamatergic signalling seems to play a central role. Studies in mice with conditional deletion of the CB1 gene in cortical glutamatergic neurons rendered first evidence that endocannabinoids provide a CB1 receptor-mediated protection against chemically induced acute epileptic activity. Moreover, several studies in acute seizure models and one study in a chronic model revealed contrasting data concerning anti- and proconvulsant effects of different modulations of endocannabinoid signalling.

Taking these data into consideration, it is of particular interest to test whether targeting endocannabinoid signalling affects seizure thresholds in

a chronic epilepsy model with excellent predictivity for efficacy and tolerability in temporal lobe epilepsy. In addition, we hypothesized that a modulation of endocannabinoid signalling might affect the generation of an epileptic network. In this study, we evaluated the effects of the CB1 receptor agonist WIN55.212-2 as well as of URB 597, which inhibits the catabolic enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) and thereby reduces the degradation of anandamide. The two compounds were tested in the mouse amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy to evaluate an impact on kindling progression and on kindled seizure thresholds.

Only minor effects on seizure thresholds and seizure parameters without a clear dose-dependency were observed when testing the effect of the compounds in fully kindled mice. When evaluating the impact on kindling acquisition, WIN55.212-2 significantly delayed the progression of seizure severity. The number of stimulations necessary to elicit a generalized seizure was significantly increased by the CB1 receptor agonist. In contrast, URB597 did not affect the development of seizures in the kindling paradigm.

Analysis of cell proliferation and neurogenesis during the kindling process revealed that URB 597 significantly reduced the number of newborn neurons as compared to vehicle-treated kindled mice. In contrast, WIN55.212-2 did not exert a comparable effect.

The data suggest CB1 receptor activation as a disease-modifying and putative antiepileptogenic approach. The lack of a correlation between an impact on kindling progression and an impact on neurogenesis argues against a key role of neurogenesis in the generation of a hyperexcitable epileptic network.

Additional studies are necessary to confirm the efficacy of CB1 receptor agonists in other chronic epilepsy models and to further elucidate the role of different components in endocannabinoid signalling during epileptogenesis.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

AGUADO, T., K. MONORY, J. PALAZUELOS, N. STELLA, B. CRAVATT, B. LUTZ, G. MARSICANO, Z. KOKAIA, M. GUZMAN u. I. GALVE-ROPERH (2005):

The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation.

FASEB J 19, 1704-1706

ALTMAN, J. u. G. D. DAS (1965):

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.

J Comp Neurol 124, 319-335

BELTRAMO, M., N. STELLA, A. CALIGNANO, S. Y. LIN, A. MAKRIYANNIS u. D. PIOMELLI (1997):

Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.

Science 277, 1094-1097

BENZON, 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

BERENDT, M., H. GREDAL u. J. ALVING (2004):

Characteristics and phenomenology of epileptic partial seizures in dogs: similarities with human seizure semiology.

Epilepsy Res 61, 167-173



BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010):

Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009.

Epilepsia 51, 676-685

BERNARDINO, L., R. FERREIRA, A. J. CRISTOVAO, F. SALES u. J. O. MALVA (2005):

Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy.

Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4, 349-360

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

BIELFELT, S. W., H. C. REDMAN u. R. O. MCCLELLAN (1971):

Sire- and sex-related differences in rates of epileptiform seizures in a purebred beagle dog colony.

Am J Vet Res 32, 2039-2048

BISOGNO, T., S. MAURELLI, D. MELCK, L. DE PETROCELLIS u. V. DI MARZO (1997):

Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes.

J Biol Chem 272, 3315-3323

BLACK, S. C. (2004):

Cannabinoid receptor antagonists and obesity.

Curr Opin Investig Drugs 5, 389-394

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

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):

Epilepsy.

N Engl J Med 344, 1145-1151

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

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

CHEN, K., A. NEU, A. L. HOWARD, C. FOLDY, J. ECHEGOYEN, L. HILGENBERG, M. SMITH, K. MACKIE u. I. SOLTESZ (2007):

Prevention of plasticity of endocannabinoid signaling inhibits persistent limbic hyperexcitability caused by developmental seizures.

J Neurosci 27, 46-58

COMPTON, D. R., L. H. GOLD, S. J. WARD, R. L. BALSTER u. B. R. MARTIN (1992a):

Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol.

J Pharmacol Exp Ther 263, 1118-1126

COMPTON, D. R., M. R. JOHNSON, L. S. MELVIN u. B. R. MARTIN (1992b):

Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents.

J Pharmacol Exp Ther 260, 201-209

COUILLARD-DESPRES, S., B. WINNER, S. SCHAUBECK, R. AIGNER, M. VROEMEN, N. WEIDNER, U. BOGDAHN, J. WINKLER, H. G. KUHN u. L. AIGNER (2005):

Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.

Eur J Neurosci 21, 1-14

COVOLAN, L., L. T. RIBEIRO, B. M. LONGO u. L. E. MELLO (2000):

Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus.

Hippocampus 10, 169-180

CRAVATT, B. F., D. K. GIANG, S. P. MAYFIELD, D. L. BOGER, R. A. LERNER u. N. B. GILULA (1996):

Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.

Nature 384, 83-87

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

The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.

Curr Opin Neurol 14, 187-192

DAYER, A. G., A. A. FORD, K. M. CLEAVER, M. YASSAEE u. H. A. CAMERON (2003):

Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus.

J Comp Neurol 460, 563-572

DEVANE, W. A., A. BREUER, T. SHESKIN, T. U. JARBE, M. S. EISEN u. R. MECHOULAM (1992):

A novel probe for the cannabinoid receptor.

J Med Chem 35, 2065-2069

DEVANE, W. A., F. A. DYSARZ, 3RD, M. R. JOHNSON, L. S. MELVIN u. A. C. HOWLETT (1988):

Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.

Mol Pharmacol 34, 605-613

DUARTE, C., R. ALONSO, N. BICHET, C. COHEN, P. SOUBRIE u. M. H. THIEBOT (2004):

Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant (SR141716), of the potentiation by quinolorane of food-primed

reinstatement of food-seeking behavior.

Neuropsychopharmacology 29, 911-920

DUDEK, F. E., W. A. POULIOT, C. A. ROSSI u. K. J. STALEY (2010):

The effect of the cannabinoid-receptor antagonist, SR141716, on the early stage of kainate-induced epileptogenesis in the adult rat.

Epilepsia 51 Suppl 3, 126-130

ECHEGOYEN, J., C. ARMSTRONG, R. J. MORGAN u. I. SOLTESZ (2009):

Single application of a CB1 receptor antagonist rapidly following head injury prevents long-term hyperexcitability in a rat model.

Epilepsy Res 85, 123-127

ELLENBERG, J. H., D. G. HIRTZ u. K. B. NELSON (1986):

Do seizures in children cause intellectual deterioration?

N Engl J Med 314, 1085-1088

FU, M., Z. XIE u. H. ZUO (2009):

TRPV1: a potential target for antiepileptogenesis.

Med Hypotheses 73, 100-102

GALVE-ROPERH, I., T. AGUADO, J. PALAZUELOS u. M. GUZMAN (2007):

The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease.

Neuroscientist 13, 109-114

GERARD, C. M., C. MOLLEREAU, G. VASSART u. M. PARMENTIER (1991):

Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis.

Biochem J 279 ( Pt 1), 129-134

GODDARD, G. V. (1967):

Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity.

Nature 214, 1020-1021

GOLDENBERG, M. M. (2010):

Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment.

P T 35, 392-415

GORDON, E. u. O. DEVINSKY (2001):

Alcohol and marijuana: effects on epilepsy and use by patients with epilepsy.

Epilepsia 42, 1266-1272

GOULD, E., A. J. REEVES, M. S. GRAZIANO u. C. G. GROSS (1999):

Neurogenesis in the neocortex of adult primates.

Science 286, 548-552

GRANT, I. u. B. R. CAHN (2005):

Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges.

Clin Neurosci Res 5, 185-199

GULYAS, A. I., B. F. CRAVATT, M. H. BRACEY, T. P. DINH, D. PIOMELLI, F. BOSCIA u. T. F. FREUND (2004):

Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala.

Eur J Neurosci 20, 441-458

HASTINGS, N. B. u. E. GOULD (1999):

Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells.

J Comp Neurol 413, 146-154

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

HAUSER, W. A. u. E. BEGHI (2008):

First seizure definitions and worldwide incidence and mortality.

Epilepsia 49 Suppl 1, 8-12

HILL, M. N., J. S. KAMBO, J. C. SUN, B. B. GORZALKA u. L. A. GALEA (2006):

Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal

cell proliferation and activation of defensive behaviours.

Eur J Neurosci 24, 1845-1849

HILLARD, C. J. u. W. B. CAMPBELL (1997):

Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid.

J Lipid Res 38, 2383-2398

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

JARAI, Z., J. A. WAGNER, S. K. GOPARAJU, L. WANG, R. K. RAZDAN, T. SUGIURA, A. M. ZIMMER, T. I. BONNER, A. ZIMMER u. G. KUNOS (2000):

Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice.

Hypertension 35, 679-684

JESSBERGER, S., K. NAKASHIMA, G. D. CLEMENSON, JR., E. MEJIA, E. MATHEWS, K. URE, S. OGAWA, C. M. SINTON, F. H. GAGE u. J. HSIEH (2007):

Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline.

J Neurosci 27, 5967-5975

JIANG, W., Y. ZHANG, L. XIAO, J. VAN CLEEMPUT, S. P. JI, G. BAI u. X. ZHANG (2005):

Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis



and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects.

J Clin Invest 115, 3104-3116

JIN, K., L. XIE, S. H. KIM, S. PARMENTIER-BATTEUR, Y. SUN, X. O. MAO, J. CHILDS u. D. A. GREENBERG (2004):

Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice.

Mol Pharmacol 66, 204-208

KATONA, I. u. T. F. FREUND (2008):

Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease.

Nat Med 14, 923-930

KOYAMA, R., M. K. YAMADA, S. FUJISAWA, R. KATOH-SEMBA, N. MATSUKI u. Y. IKEGAYA (2004):

Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus.

J Neurosci 24, 7215-7224

KRALIC, J. E., D. A. LEDERGERBER u. J. M. FRITSCHY (2005):

Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures.

Eur J Neurosci 22, 1916-1927

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

Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.

Expert Rev Neurother 6, 397-406

LOSCHER, W. (1993):

Basic aspects of epilepsy.

Curr Opin Neurol Neurosurg 6, 223-232

LOSCHER, W. (2002):

Animal models of drug-resistant epilepsy.

Novartis Found Symp 243, 149-159; discussion 159-166, 180-145

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):

Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.

J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LUDANYI, A., L. EROSS, S. CZIRJAK, J. VAJDA, P. HALASZ, M. WATANABE, M. PALKOVITS, Z. MAGLOCZKY, T. F. FREUND u. I. KATONA (2008):

Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus.

J Neurosci 28, 2976-2990

LUTZ, B. (2004):

On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures.

Biochem Pharmacol 68, 1691-1698

MACCARRONE, M. (2008):

Endocannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases.

Curr Pharm Des 14, 2252-2253

MAEJIMA, T., T. OHNO-SHOSAKU u. M. KANO (2001):  
Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals.  
Neurosci Res 40, 205-210

MARSICANO, G., S. GOODENOUGH, K. MONORY, H. HERMANN, M. EDER, A. CANNICH, S. C. AZAD, M. G. CASCIO, S. O. GUTIERREZ, M. VAN DER STELT, M. L. LOPEZ-RODRIGUEZ, E. CASANOVA, G. SCHUTZ, W. ZIEGLGANSBERGER, V. DI MARZO, C. BEHL u. B. LUTZ (2003):  
CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity.  
Science 302, 84-88

MARTIN, B. R. (1986):  
Cellular effects of cannabinoids.  
Pharmacol Rev 38, 45-74

MATSUDA, L. A., S. J. LOLAIT, M. J. BROWNSTEIN, A. C. YOUNG u. T. I. BONNER (1990):  
Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.  
Nature 346, 561-564

MCNAMARA, J. O. (1984):  
Kindling: an animal model of complex partial epilepsy.  
Ann Neurol 16 Suppl, S72-76

MECHOULAM, R., S. BEN-SHABAT, L. HANUS, M. LIGUMSKY, N. E. KAMINSKI, A. R. SCHATZ, A. GOPHER, S. ALMOG, B. R. MARTIN, D. R. COMPTON u. ET AL. (1995):

Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.

Biochem Pharmacol 50, 83-90

MECHOULAM, R., P. BRAUN u. Y. GAONI (1967):

A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols.

J Am Chem Soc 89, 4552-4554

MECHOULAM, R. u. Y. GAONI (1967):

The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish.

Tetrahedron Lett 12, 1109-1111

MELDRUM, B. S. (1990):

Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy.

Lancet 336, 231-234

MONORY, K., H. BLAUDZUN, F. MASSA, N. KAISER, T. LEMBERGER, G. SCHUTZ, C. T. WOTJAK, B. LUTZ u. G. MARSICANO (2007):

Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice.

PLoS Biol 5, e269

MONORY, K., F. MASSA, M. EGERTOVA, M. EDER, H. BLAUDZUN, R. WESTENBROEK, W. KELSCH, W. JACOB, R. MARSCH, M. EKKER, J. LONG, J. L. RUBENSTEIN, S. GOEBBELS, K. A. NAVE, M. DURING, M. KLUGMANN, B. WOLFEL, H. U. DODT, W. ZIEGLGANSBERGER, C. T. WOTJAK, K. MACKIE, M. R. ELPHICK, G. MARSICANO u. B. LUTZ (2006):

The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus.

Neuron 51, 455-466

MUNRO, S., K. L. THOMAS u. M. ABU-SHAAR (1993):

Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.

Nature 365, 61-65

NADERI, N., F. AZIZ AHARI, B. SHAFAGHI, A. H. NAJARKOLAEI u. F. MOTAMEDI (2008):

Evaluation of interactions between cannabinoid compounds and diazepam in electroshock-induced seizure model in mice.

J Neural Transm 115, 1501-1511

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

PACHECO, M., S. R. CHILDERS, R. ARNOLD, F. CASIANO u. S. J. WARD (1991):

Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors.

J Pharmacol Exp Ther 257, 170-183

PACHER, P., S. BATKAI u. G. KUNOS (2006):

The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy.

Pharmacol Rev 58, 389-462

PALOMAKI, V. A., M. LEHTONEN, J. R. SAVINAINEN u. J. T. LAITINEN (2007):

Visualization of 2-arachidonoylglycerol accumulation and cannabinoid CB1 receptor activity in rat brain cryosections by functional autoradiography.

J Neurochem 101, 972-981

PARENT, J. M., R. C. ELLIOTT, S. J. PLEASURE, N. M. BARBARO u. D. H. LOWENSTEIN (2006):

Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy.

Ann Neurol 59, 81-91

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

PATTERSON, E. E., P. J. ARMSTRONG, D. P. O'BRIEN, M. C. ROBERTS, G. S. JOHNSON u. J. R. MICKELSON (2005):

Clinical description and mode of inheritance of idiopathic epilepsy in English springer spaniels.

J Am Vet Med Assoc 226, 54-58

PERTWEE, R. G. (1999a):

Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use.

Forsch Komplementarmed 6 Suppl 3, 12-15

PERTWEE, R. G. (1999b):

Pharmacology of cannabinoid receptor ligands.

Curr Med Chem 6, 635-664

PERTWEE, R. G. (2005):

Pharmacological actions of cannabinoids.

Handb Exp Pharmacol 1-51

PERTWEE, R. G. (2006):

The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview.

Int J Obes (Lond) 30 Suppl 1, S13-18

PINEL, J. P. (1981):

Kindling-induced experimental epilepsy in rats: cortical stimulation.

Exp Neurol 72, 559-569

PIOMELLI, D., G. TARZIA, A. DURANTI, A. TONTINI, M. MOR, T. R. COMPTON, O. DASSE, E. P. MONAGHAN, J. A. PARROTT u. D. PUTMAN (2006):

Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597).

CNS Drug Rev 12, 21-38

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2009):

Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.

Epilepsy Behav 14 Suppl 1, 16-25

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. (1996):

Seizures in dogs.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 26, 779-809

PODELL, M. u. W. R. FENNER (1993):

Bromide therapy in refractory canine idiopathic epilepsy.

J Vet Intern Med 7, 318-327

PONCELET, M., J. MARUANI, R. CALASSI u. P. SOUBRIE (2003):

Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptor deleted mice.

Neurosci Lett 343, 216-218



POTSCHKA H, VOLK HA, PEKCEC A. (2009)

Aktueller Stand und Trends in der Epilepsitherapie bei Hund und Katze.

Tierärztl Prax. 2009;37(K):211-7.

RATZLIFF, A. H., V. SANTHAKUMAR, A. HOWARD u. I. SOLTESZ  
(2002):

Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?

Trends Neurosci 25, 140-144

RAZDAN, R. K. (1986):

Structure-activity relationships in cannabinoids.

Pharmacol Rev 38, 75-149

REYNOLDS, B. A. u. S. WEISS (1992):

Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.

Science 255, 1707-1710

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990):

Kindling: basic mechanisms and clinical validity.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76, 459-472

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. (2009):

Drug treatment of epilepsy: options and limitations.

Epilepsy Behav 15, 56-65

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

SIMONATO, M., E. TONGIORGI u. M. KOKAIA (2006):

Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy.

Trends Pharmacol Sci 27, 631-638

SUGIURA, T., S. NAKANE, S. KISHIMOTO, K. WAKU, Y. YOSHIOKA, A. TOKUMURA u. D. J. HANAHAN (1999):

Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells.

Biochim Biophys Acta 1440, 194-204

TREPANIER, L. A., A. VAN SCHOICK, W. S. SCHWARK u. J. CARRILLO (1998):

Therapeutic serum drug concentrations in epileptic dogs treated with

potassium bromide alone or in combination with other anticonvulsants:  
122 cases (1992-1996).

J Am Vet Med Assoc 213, 1449-1453

TWITCHELL, W., S. BROWN u. K. MACKIE (1997):

Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons.

J Neurophysiol 78, 43-50

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

WALLACE, M. J., R. E. BLAIR, K. W. FALENSKI, B. R. MARTIN u. R. J.  
DELORENZO (2003):

The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy.

J Pharmacol Exp Ther 307, 129-137

WALLACE, M. J., B. R. MARTIN u. R. J. DELORENZO (2002):

Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity.

Eur J Pharmacol 452, 295-301

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

ZHAO, M., S. MOMMA, K. DELFANI, M. CARLEN, R. M. CASSIDY, C. B. JOHANSSON, H. BRISMAR, O. SHUPLIAKOV, J. FRISEN u. A. M. JANSON (2003):

Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra.

Proc Natl Acad Sci U S A 100, 7925-7930

## X. ANHANG

### 1. Geräte

Geräte	Typ-Bezeichnung	Bezugsquelle
Stereotaktische Apparate		TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Dentalbohrer		Fa. Karl Fischer, Pforzheim
Stimulator-einheiten	Typ 215E/I	Fa. Hugo Sachs, March-Hugstetten
Personal Computer	Intel Pentium-IV Prozessor mit 1000 MHz, 256 MB Arbeitsspeicher, 40 GB SCSI-Festplatte und Betriebssystem Windows XP und typ-verwandte Geräte	Diverse Bezugsquellen
Stimulations- und EEG-Kabel	Kabelentwirler einschließlich: Anschlusskabel / Westernbuchse Dreipoliges, abgeschirmtes, ummanteltes Kabel BNC-Stecker	Conrad Elektronik, München
EEG-Software	Chart 5	AD-Instruments, Spechbach
EEG-Ableitung	Powerlab 8/30, Animal Bio Amplifier	AD-Instruments, Spechbach

Kryostat	2800 Frigocut N	Leica, Nussloch
Stereologische Mikroskop	DMLB	Leica, Nussloch
Konfokales Mikroskop	Axiovert 100 M Scanmodul LSM 510	Zeiss, Oberkochen

## 2. Lösungen und Substanzen

### Protokolle für die histologischen Methoden

#### 0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)

- in Aqua dest.
- 5,7%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 1,2%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

#### 0,01 M phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung

- 0,9% NaCl
- 0,01 M Phosphatpuffer
- mit HCl auf pH 7,6 einstellen

**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)**

- 0,9% NaCl
- 0,05 M Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
- mit HCl auf pH 7,6 einstellen

**TRIS-Nickel-Lösung**

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

***Carrier-Lösung***

- in TBS
- 1% Normalserum (Kaninchen, Schwein, Esel, Ziege)
- 1 % Rinderserumalbumin
- 0,3 % Triton X

**Blocking-Lösung**

- in *Carrier*-solution
- 11% Normalserum (Kaninchen, Schwein, Esel, Ziege)
- 2% BSA

**Gefriermedium**

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

**Chrom-Gelatine-Lösung**

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

**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

**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.
  - 75 – 95 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

## **XI. DANKSAGUNG**

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka danke ich für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung, die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und die Korrektur meiner Arbeit.

Jonna Soerensen, Christina Zellinger und Anton Pekcec danke ich für ihre kompetente wissenschaftliche Unterstützung.

Meiner „Lektorin“ Natalie möchte ich dafür danken, dass für mich „über Gott und die Welt sprechen“ nicht länger eine Phrase ist. Es gibt also doch eine Welt da draußen, außerhalb der Pharmakologie.

Vera möchte ich für ihre erfrischende Art danken, mit der sie etwas mehr Jugend in unsere alte Doktorandengruppe brachte. Aber wo ist nur dieser Lautstärkereger?!

Ein Dank gilt natürlich dem gesamten ehemaligen und neuen Doktorandenteam: Sarah, Juli, Hero, Mehrnoosh, Lotta und Josi.

Heidi Zankl gebührt ein besonderer Dank. Mit Hilfe der unermüdlichen Unterstützung meiner immunhistologischen Mentorin hat sich schließlich immer noch alles gefärbt.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern im Institut möchte ich mich für die immer freundliche Hilfe bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, mit deren Rückhalt und Fürsorge der Weg immer ein wenig kürzer und weitaus weniger steinig erschien.