

**Aus dem Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Prof. Dr. H. Potschka

**Experimentelle Untersuchungen
zur Bedeutung der
Arachidonsäurekaskade für die
Pharmakoresistenz von
Epilepsien**

Inaugural-Dissertation

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

**im Fachgebiet
Pharmakologie**

**von
Sarah Verena Fischborn
aus München**

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Priv.-Doz. Dr. Breuer
Priv.-Doz. Dr. Maierl
Univ.-Prof. Dr. Mansfeld

Tag der Promotion: 02. Dezember 2010

„ La gravitation de l'esprit nous fait tomber vers le haut.“

(„Die Schwerkraft des Geistes läßt uns nach oben fallen.“)

Simone Weil (1909-1943), französische Philosophin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	EPILEPSIEN	3
2.1.1	Definition und Klassifizierung	3
2.1.2	Klinische Bedeutung	7
2.2	DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE	10
2.2.1	Morphologie und Anatomie	10
2.2.2	Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke	13
2.3	EPILEPSIE UND PHARMAKORESISTENZ	17
2.3.1	Einführung	17
2.3.2	Ursachen und Entstehung von Pharmakoresistenz	18
2.3.3	Signaltransduktion der anfallsinduzierten Expression von P-Glykoprotein	21
2.4	MODELLE ZUR UNTERSUCHUNG VON PATHOPHYSIOLOGIE UND PHARMAKOTHERAPIE VON EPILEPSIEN	33
2.4.1	Einführung	33
2.4.2	<i>In-vivo</i> -Modelle	34
2.4.3	<i>In-vitro</i> - und <i>ex-vivo</i> -Modelle	37
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	41
4	MATERIAL UND METHODEN	44
4.1	MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPENPILEPSIE	44
4.1.1	Versuchstiere	44
4.1.2	Elektrodenimplantation	45
4.1.3	Kindling	46
4.1.4	Substanzversuche	49
4.2	UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMECHANISMEN DER ANFALLSINDUZierten EXPRESSION VON P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN	52
4.2.1	Methodenetablierung	52
4.2.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	55
5	ERGEBNISSE	60
5.1	MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPENPILEPSIE	60

5.1.1	Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition der Cyclooxygenase-2	60
5.1.2	Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition des EP1-Rezeptors	63
5.1.3	Beeinflussung der Anfallsparameter durch einen EP1-Rezeptor-Agonisten	63
5.2	UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMECHANISMEN DER ANFALLSINDUZIERTEN EXPRESSION DES MULTIDRUG-TRANSPORTERS P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN	65
5.2.1	Methodenetablierung	66
5.2.2	Bestimmung der P-Glykoprotein-spezifischen luminalen Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie	67
6	DISKUSSION	70
6.1	MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPENEPILEPSIE	69
6.1.1	Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition der Cyclooxygenase-2	70
6.1.2	Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition des EP1-Rezeptors	71
6.1.3	Beeinflussung der Anfallsparameter durch einen EP1-Rezeptor-Agonisten	73
6.1.4	Schlussfolgerung	73
6.2	UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMECHANISMEN DER ANFALLSINDUZIERTEN EXPRESSION DES MULTIDRUG-TRANSPORTERS P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN	75
6.2.1	Methodenetablierung	75
6.2.2	Bestimmung der P-Glykoprotein-spezifischen luminalen Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie	76
6.2.3	Schlussfolgerung	79
7	ZUSAMMENFASSUNG	80
8	SUMMARY	85
9	LITERATURVERZEICHNIS	87
10	ANHANG	108
10.1	SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	109
10.1.1	Protokolle für die Kapillarisolation	109
10.2	GERÄTE	111
10.3	PUBLIKATIONEN	112
10.4	DANKSAGUNG	
11113		

ABKÜRZUNGEN

μA	Mikroampere
μM	Mikromol
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
ADD	<i>Afterdischarge duration</i> = Nachentladungsdauer
ADT	<i>Afterdischarge threshold</i> = Nachentladungsschwelle
AE	Antiepileptikum, -a
Aq. inj.	Aqua ad injectabilia = Wasser für Injektionszwecke
AS	Arachidonsäurekaskade
ATP	Adenosin Triphosphat
BCEC	<i>Brain capillary endothelial cells</i> = Gehirnkapillarendothelzellen
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CA1-3	Felder 1-3 des Cornu ammonis
CaCl_2	Calciumchlorid
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEG	Elektroenzephalografie bzw. -gramm
FI	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
Glu-B	Glutamat-Bindungsstelle
Gly _A -B, Gly _B -B	Glycin-Bindungsstellen
h	Stunden
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
i. d. R.	in der Regel
i. p.	intraperitoneal
ILAE	International League against Epilepsy
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid

kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LSM	Laser-scanning-Mikroskop
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
MRP	<i>Multidrug-resistance-protein</i>
ms	Millisekunden
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBD-CSA	fluoreszierendes Cyclosporin A
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
nM	Nanomol
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Pgp	P-Glykoprotein
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RBE ₄	<i>Rat brain endothelial cells</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
s. c.	subcutan
SD	<i>Seizure duration</i> = Anfallsdauer
SE	Status epilepticus
SEM	<i>Standard error of mean</i> = Standardfehler
s. o.	siehe oben
SS	<i>Seizure severity</i> = Anfallsstärke
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle

TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> = transepithelialer elektrischer Widerstand
TLE	Temporallappenepilepsie
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
v. Chr.	vor Christus
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Obwohl das Wissen über das Krankheitsbild der Epilepsie in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen hat, sind die Zusammenhänge ihrer Entstehung und Erscheinung bis heute noch immer nicht vollständig geklärt. Zum Auftreten epileptischer Anfälle tragen zum einen eine Übererregbarkeit von Nervenzellen, zum anderen eine abnorme gleichzeitige elektrische Aktivität von größeren Nervenzellverbänden bei. So nimmt man an, dass ein Ungleichgewicht von Erregung und Hemmung in diesen neuronalen Netzen Krampfanfälle entstehen lässt.

Die Geschichte der Epilepsie ist eher eine Geschichte ihrer Betrachtung als der Erkrankung selbst. Krankheitsbilder der Epilepsie sind schon sehr lange bekannt und wurden bereits vor 4000 Jahren beschrieben. Epilepsie löste ambivalente Vorstellungen aus, die Menschen reagierten auf die Betroffenen mit Faszination und Ehrfurcht, viel häufiger aber mit Hilflosigkeit, Angst und Ablehnung. Meist wurde eine göttliche Fügung oder vielmehr die Macht böser Geister und Dämonen hinter den epileptischen Anfällen vermutet, was zur Stigmatisierung der betroffenen Menschen führte. Dabei zeigte Hippokrates (460 – 370 v. Chr.) schon vor 2000 Jahren die Richtung an: ...“ mit der sogenannten heiligen Krankheit verhält es sich folgendermaßen: Ich halte sie um nichts für göttlicher oder heiliger als die anderen Krankheiten, sondern sie hat die gleichen natürlichen Ursachen wie die anderen Krankheiten. Weil sie nichts davon wissen und sich darüber wundern, und weil sie so ganz anders ist als andere Krankheiten, glauben die Menschen sie sei etwas Besonderes und geradezu Göttliches. Daran halten die Menschen fest, die ratlos bleiben und die den wahren Charakter der Krankheit nicht erkennen.“

Heute liegt das Bestreben vielmehr in der Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Unterdrückung der epileptischen Anfälle, was nichts anderes als eine lebenslange Einnahme von Medikamenten bedeutet, da eine Heilung der Epilepsie bisher nicht möglich ist. Trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahrzehnten durch die mittlerweile zahlreich zur Verfügung stehenden Antiepileptika in der Epilepsitherapie erreicht werden konnten, sprechen über ein Drittel der Betroffenen nicht auf eine medikamentelle Therapie an. Sie haben trotz eines ausreichenden Wirkstoffspiegels des antikonvulsiv wirksamen Medikamentes weiterhin Anfälle.

Der Grund dafür findet sich in Transportsystemen der Blut-Hirn-Schranke. Diese bildet eine biologische Barriere zwischen Blut und Gehirn und schützt Letzteres

neben einer Vielzahl anderer Aufgaben vor dem Eindringen toxischer Stoffe. Wiederholte Anfälle, aber vermutlich auch die Antiepileptika selbst, können zu einer Überfunktion der Transportsysteme an der Blut-Hirn-Schranke führen und damit die Gehirngängigkeit und Wirksamkeit von antikonvulsiv wirksamen Medikamenten limitieren. Die Arachidonsäurekaskade ist im Allgemeinen ein Hauptbestandteil von Entzündungsreaktionen, läuft aber auch anfallsinduziert in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ab. Welche Komponenten der Kaskade eine Rolle in der Entstehung einer Pharmakoresistenz spielen, soll in dieser Arbeit in einem Kindling-Modell an Mäusen und an isolierten porcinen und humanen Gehirnkapillaren untersucht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 EPILEPSIEN

2.1.1 Definition und Klassifizierung

Allgemeines:

Ein epileptischer Anfall ist durch exzessive Neuronenentladungen bedingt, die das gesamte Gehirn oder neuronale Zellverbände betreffen können und zeitlich auf wenige Sekunden bis mehrere Minuten begrenzt sind (HUFNAGEL 2000). Generell ist jedes menschliche oder tierische Gehirn dazu fähig, einen Anfall als Reaktion auf äußere Einflüsse und Noxen, wie etwa einen Elektroschock oder metabolische Dysfunktionen, zu generieren. Etwa 2% der Menschen erlebt im Laufe des Lebens einen solchen provozierten Anfall. Bei einem von 100 Menschen tritt ein einmaliger Anfall jedoch ohne jegliche Provokation auf. Erst das rezidivierende, im Allgemeinen unprovozierte Auftreten von konvulsiven Ereignissen charakterisiert eine Epilepsie. Nach der internationalen Liga gegen Epilepsie (International League against Epilepsy, ILAE) wird Epilepsie auch als das wiederholte Auftreten epileptischer Anfälle, ohne dass ein diese Anfälle auslösendes Ereignis bekannt ist, definiert (ILAE, 1993). Es handelt sich um eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustandes gekennzeichnet ist (FISHER et al. 2005).

Epilepsien sind beim Menschen nach dem Schlaganfall die zweithäufigste neurologische Erkrankung sowie die häufigste chronische neurologische Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Tieren (v. a. bei Hund und Katze) und Menschen (LÖSCHER, 1994; HAUSER, 1999). In Deutschland sind etwa 800.000 Menschen an Epilepsie erkrankt, weltweit sind es 50 Millionen. Dies entspricht einer Prävalenz von 1-2% (SRINIVAS ; BROWNE u. HOLMES 2001). Bei Hunden beläuft sich die Prävalenz auf 0,5 bis 5% (SCHWARTZ-PORSCHE 1994), Katzen sind etwas seltener betroffen.

Epilepsien können sich in jedem Lebensalter manifestieren. Die Wahrscheinlichkeit, an einer Epilepsie zu erkranken, ist in der frühen Kindheit (v. a. im ersten Lebensjahr) und bei Menschen ab dem 60. Lebensjahr jedoch am größten (SCHMIDT u. ELGER 1999).

Klassifizierung:

Eine genauere Klassifizierung der Epilepsie ist für eine erfolgreiche Therapie von großer Bedeutung (BROWNE u. HOLMES 2001). Diese Klassifizierung kann anhand der Merkmale Anfallsmuster, Ätiologie, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische Befunde (EEG-Befunde) erfolgen.

Was die Anfallsmuster betrifft, können die Konvulsionen in fokale und generalisierte Anfälle unterteilt werden (KWAN u. BRODIE 2006). In manchen Fällen lassen sich die Anfälle hinsichtlich ihres Anfallsmusters jedoch nicht klassifizieren. Fokale Anfälle entstehen und manifestieren sich in einer umschriebenen Region einer Hirnhemisphäre, während generalisierte Anfälle schon zu Beginn eine epileptische Aktivität in beiden Großhirnhemisphären aufweisen (MCNAMARA 1994). Fokale Anfälle können weiter in einfach-fokale (ohne Bewusstseinsstörung) und komplex-fokale (mit Bewusstseinsstörung) Anfälle, sowie in sekundär generalisierte fokale Anfälle eingeteilt werden (BROWNE u. HOLMES 2001). Bei einfach-fokalen Anfällen zeigen sich beispielsweise einseitige Kribbelparästhesien, visuelle Halluzinationen oder orale Automatismen, die meist nur wenige Sekunden andauern. Patienten zeigen während eines komplex-fokalen Anfalls Bewusstseinsveränderungen, wie eine beeinträchtigte Aufmerksamkeit oder eingeschränkte Kontakt- und Reaktionsfähigkeit (SCHMIDT u. ELGER, 2000) und sind nach dem Anfall meist verwirrt. Die Symptomatik fokaler Anfälle ist stets abhängig von der Lokalisation der neuronalen Entladungen (Abb. 1).

Anfälle können sich hinsichtlich der zu beobachtenden motorischen Funktionsstörungen als tonisch, klonisch, tonisch-klonisch, atonisch oder myoklonisch äußern (ILAE, 2006).

Je nach Ätiologie der Erkrankung liegt eine symptomatische, idiopathische oder kryptogene Epilepsie vor (KWAN u. BRODIE 2006). Bei symptomatischen Epilepsien entsteht die Erkrankung als Folge einer nachweisbaren Hirnschädigung, die mittels neurologischer Untersuchungen oder bildgebender Verfahren nachweisbar ist. Hingegen sind idiopathische Epilepsien in den meisten Fällen

genetisch bedingt. Als kryptogen wird die Epilepsie dann bezeichnet, wenn keine Ursache für die Erkrankung erkennbar ist (KWAN u. BRODIE 2006). Die Mehrzahl der Epilepsien beim Menschen wird jedoch durch symptomatische Ursachen, wie z.B. ein Schädelhirntrauma, eine Enzephalitis, eine Stoffwechselstörung oder einen Schlaganfall hervorgerufen. Dieser so genannte initiale Insult führt dann, im Rahmen der Entstehung der Epilepsie (Epileptogenese), zu Veränderungen in neuronalen Schaltkreisen (MCNAMARA 1994). Dabei kommt es zur Umwandlung des normalen neuronalen Netzwerks in ein übererregbares Netzwerk.

Bei Hunden mit epileptischen Anfällen ist die idiopathische Epilepsie hingegen die häufigste Diagnose (FISCHER 1995). Diese Hunde sind meist reinrassig und die epileptischen Anfälle beginnen häufig im Alter zwischen einem und fünf Jahren. Dabei fällt die interiktale neurologische Untersuchung stets unauffällig aus und die Zeit zwischen zwei Anfällen ist oft übermäßig lang (über vier Wochen) (M. PODELL et al. 1995).

In der Tiermedizin findet die in der Humanmedizin gebräuchliche Klassifizierung der epileptischen Anfälle und Syndrome in zahlreiche Subtypen kaum eine Anwendung. Hier unterscheidet man Anfälle vor allem nach Anfallsmuster und Ätiologie (POTSCHKA et al. 2009). Dennoch teilt man epileptische Anfälle hinsichtlich des Anfallstyps in der Tiermedizin in drei Kategorien ein: die isolierten, selbstlimitierenden epileptischen Anfälle, die Cluster- oder Serienanfälle und den Zustand des Status epilepticus (M. PODELL 2004). Ähnlich wie in der Humanmedizin unterscheidet man epileptische Anfälle bezüglich des Anfallsmusters in primär generalisierte und fokale Anfälle. Letztere lassen sich noch weiter unterteilen in einfach und komplex fokale Anfälle und können sich ausweiten und zu fokalen Anfällen mit sekundärer Generalisation werden. Generalisierte Anfälle bei Hunden und Katzen sind in der Regel myoklonische oder tonisch-klonische Anfälle (POTSCHKA et al., 2009).

Temporallappenepilepsie:

Etwa 70-80% der symptomatischen fokalen Epilepsien bei Humanpatienten sind Temporallappenepilepsien. Die Temporallappenepilepsie (TLE) hat ihren Ursprung im Temporallappen. Sie geht fast ausschließlich mit komplex-fokalen Anfällen mit Bewusstseinsstörung einher. Zudem kann es aber auch zu einfach-fokalen Anfällen ohne Bewusstseinsstörung und sekundär generalisierten tonisch-klonischen Erscheinungen kommen. Die meisten Anfälle gehen von den mesialen Strukturen

innerhalb des Temporallappens aus, wobei hier die Amygdala, der Hippokampus und der parahippocampale Cortex in erster Linie betroffen sind (B. S. CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Der Hippokampus bildet im Querschnitt die Strukturen des Ammonshorns (Cornu ammonis, CA), welches durch die eingerollte Archikortexstruktur zustande kommt.

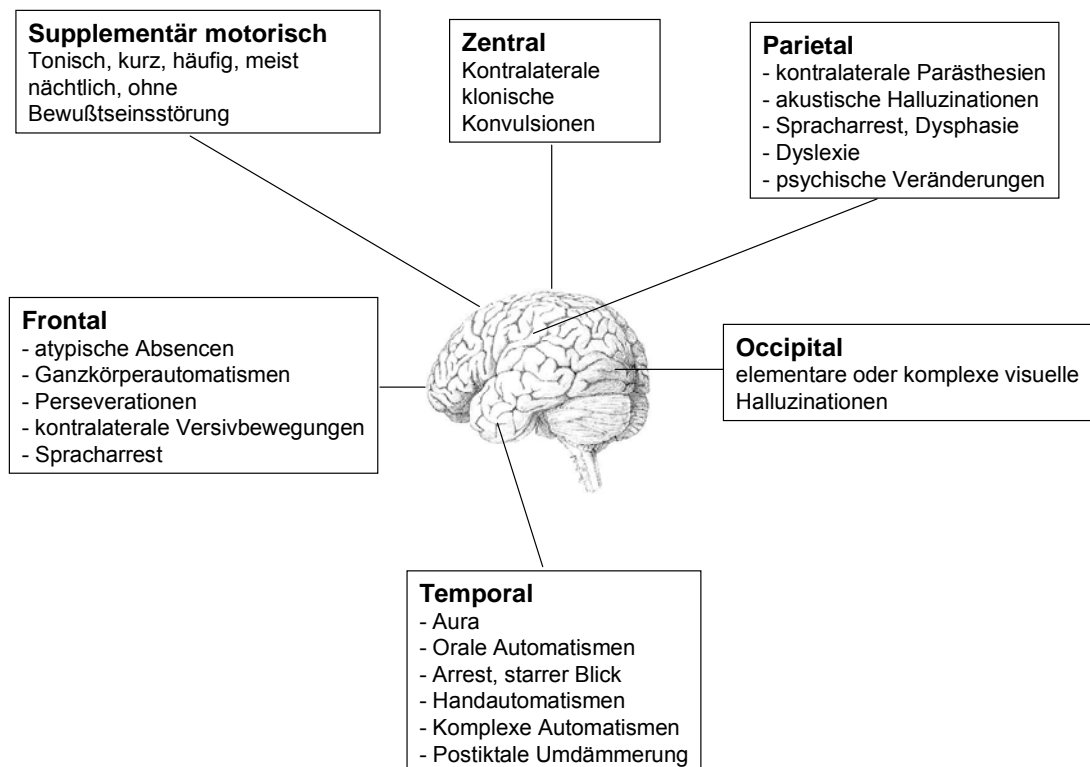


Abb. 1: Topographie fokaler Anfälle (aus „Epilepsien und ihre Therapie“, Bremen: UNI-MED, HUFNAGEL, 2000).

Vier Felder werden dabei unterschieden. Im Feld CA1 sind viele kleine Pyramidenzellen enthalten. Besonders große Pyramidenzellen zeichnen das Feld CA2 aus. Im Feld CA3 sind diese großen Pyramidenzellen etwas lockerer angeordnet. Stark aufgelockert ist die histologische Struktur im Feld CA4, wo das Ammonshorn endet (SAMANDARI u. MAI 2009).

Frontal-, Zentral-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsien kommen hingegen seltener vor. Wie bei den anderen symptomatischen Epilepsieformen wird auch die Temporallappenepilepsie häufig durch einen primären initialen Insult, wie eine Infektion, einen Tumor oder ein Schädelhirntrauma begünstigt (MCNAMARA 1994; B. S. CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Dauert der Zeitraum, in dem wiederholt

Anfälle auftreten, längere Zeit an, entwickelt sich die so genannte mesiale Temporallappenepilepsie (TLE). Bei der Krampfentstehung und –ausbreitung der TLE kommt es zu Läsionen im Hippocampus, in der Amygdala, im entorhinalen Cortex und in weiteren benachbarten Gehirnregionen (YILMAZER-HANKE et al. 2000). Die dabei beobachtete Neurodegeneration tritt am ausgeprägtesten im Hippocampus auf und zeigt sich besonders durch eine Atrophie im Feld CA1. Sie ist aber auch im piriformen Cortex und der Amygdala beschrieben worden (YILMAZER-HANKE et al. 2000). Als Reaktion auf die entstehenden Läsionen kommt es zu kompensatorischen Umbauprozessen, wie einer Hippocampussklerose mit einer sekundären Gliose und Moosfaser-Sprossung (DALBY u. MODY 2001). Diese plastischen Veränderungen sind die Grundlage für eine Beeinträchtigung inhibitorischer neuronaler Systeme und/oder einer überschießenden Aktivität exzitatorischer Systeme, welche das Auftreten weiterer Anfälle begünstigen (MCINTYRE u. GILBY 2008).

2.1.2 Klinische Bedeutung

Allgemeines:

Für die Besitzer epileptischer Hunde oder Katzen bedeutet die Diagnose einer Epilepsie die Notwendigkeit, ihrem Tier lebenslang regelmäßig Medikamente zu verabreichen (LOSCHER 2003). Die Tierbesitzer müssen ihren Alltag an das Therapieregime anpassen. Die Nebenwirkungen der Medikamente führen häufig dazu, dass die Tiere mehr oder weniger sediert sind und die Besitzer deshalb weniger Freude mit ihren Tieren haben (CHANG et al. 2006).

An chronischer Epilepsie erkrankt zu sein, bedeutet für die betroffenen Menschen in vielen Fällen einen enormen Leidensdruck. Nicht bei allen Epilepsiepatienten wirken die Arzneimittel in einer Weise, dass durch deren Verabreichung eine komplette Anfallsfreiheit zu erreichen ist (KWAN u. BRODIE 2006). So wird die Lebensqualität infolge der trotz Therapie auftretenden spontanen Anfälle erheblich eingeschränkt. Sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin beschränkt sich die Therapie von Epilepsien derzeit auf die lebenslange Verabreichung von Arzneimitteln, die jedoch mit teilweise schweren Nebenwirkungen verbunden sind und das Leben der

Patienten selbst bei erfolgreicher Therapie belasten und verkürzen (REGESTA u. TANGANELLI 1999; CHANG et al. 2006).

Psychosoziale Störungen:

Eine Reihe von klinischen Untersuchungen und Patientenbefragungen haben ergeben, dass die Prävalenz, psychische Störungen auszubilden, bei Epilepsiepatienten im Vergleich zur Kontrollbevölkerung stark erhöht ist (TRIMBLE 1991; KANNER et al. 1996; SWINKELS et al. 2001; BLUMER 2002; GILLIAM et al. 2003; KANNER 2003). Depressionen und Angststörungen werden im Zusammenhang mit Epilepsien besonders häufig berichtet. JACOBY et al. (1996) fanden in einer Querschnittsstudie mit unselektierten Epilepsiepatienten bei 9% eine depressive, bei 25% eine ängstliche Symptomatik. Bezog man nur Patienten mit einer Anfallsfrequenz von mindestens einem Anfall pro Monat in die Auswertung ein, erhöhte sich der Anteil der Depressionen auf 21% (versus 4% bei anfallsfreien Patienten) und der Angststörungen auf 44% (versus 13% bei Anfallsfreiheit). Angststörungen stehen andererseits im Verdacht, die Anfallsfrequenz zu erhöhen (VAZQUEZ u. DEVINSKY 2003). Die Autoren berichten zudem über einen Zusammenhang von epileptischen Anfällen und Angststörungen wie Panikattacken, obsessiv-zwanghaften Störungen, generalisierten Angststörungen und posttraumatischem Stress. Epilepsie-assoziierte Störungen des angstabhängigen Verhaltens konnten auch in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden (SZYNDLER et al. 2002; ERDOGAN et al. 2005; SZYNDLER et al. 2005). Sowohl Depressionen als auch Angststörungen im Zusammenhang mit Epilepsien erscheinen abhängig von der (fehlenden) medizinischen Anfallkontrolle (JACOBY et al. 1996).

Kognitive Defizite:

Lern- und Gedächtnisstörungen treten bei einigen Epilepsieformen gehäuft auf (SEIDMAN et al. 1998; ALDENKAMP et al. 1999) und konnten wiederholt in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden (SUTULA et al. 1995).

Zu unterscheiden sind zum einen irreversible Funktionsstörungen, die durch strukturelle Hirnveränderungen wie Tumoren, Sklerosen oder traumatische Läsionen entstehen und mit symptomatischen oder kryptogenen Epilepsien assoziiert sind. Zum anderen treten auch reversible Beeinträchtigungen durch funktionelle Störungen

auf, die sich aus der Aktivität des epileptogenen Fokus und der antikonvulsiven Therapie ergeben (HELMSTAEDTER u. ELGER 2000).

Bei der TLE steigt beispielsweise die Wahrscheinlichkeit, Lern- und Gedächtnisstörungen zu entwickeln. In Abhängigkeit von der Lateralisation des epileptogenen Fokus können sich bei TLE-Patienten materialspezifische amnestische Defizite zeigen, die insbesondere das Lernen und Abrufen von Informationen betreffen (HELMSTAEDTER et al. 1991; BREIER et al. 1996). Nach MAJAK und PITKANEN (2004) sind Faktoren, die den Grad der Verhaltensbeeinträchtigung im Tiermodell beeinflussen, einerseits der genetische Hintergrund und das Alter bei Auftreten der Anfälle, andererseits die Lokalisation und Ausdehnung des epileptischen Fokus sowie Schwere, Dauer und Häufigkeit der Anfälle.

2.2 DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE

2.2.1 Morphologie und Anatomie

Allgemeines:

Bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen, steht man grundsätzlich vor dem Problem, dass (Arznei-) Stoffe über das Blut nur sehr eingeschränkt in das ZNS vordringen können, da dieses durch – im Wesentlichen zwei – biologische Barriersysteme geschützt ist (VAN BREE et al. 1992). Zum einen ist dies die Blut-Liquor-Schranke zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit und zum anderen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zwischen Blut und Gehirngewebe.

Auf der einen Seite muss der Schutz des Gehirns vor unerwünschten Substanzen, auf der anderen aber auch der hohe Substratbedarf befriedigt werden (bei 2% des Körpergewichtes verbraucht das menschliche Gehirn 20% der dem Körper zur Verfügung stehenden Gesamtenergie, was im Durchschnitt 75 mg Glukose und 50 ml Sauerstoff pro Minute entspricht (LOHMANN 2003)).

Grundsätzlich sind die Voraussetzungen, ob ein Stoff in das Gehirn gelangen kann, sowohl von den Eigenschaften der Substanz, wie deren Lipidlöslichkeit, deren Molekulargewicht, der Plasmaprotein- und Wasserstoffbindung, als auch von den vorhandenen Transportmechanismen an der BHS abhängig (PARDRIDGE 2003).

Die besondere Funktion als Schranke ist nur dadurch möglich, dass die aus den Gehirnendothelzellen (*brain capillary endothelial cells*, BCEC) geformten Kapillaren sich in mehrfacher Hinsicht deutlich von den peripheren Kapillaren unterscheiden. Hierzu zählen neben metabolischen Besonderheiten insbesondere die morphologischen Eigenschaften. Das Endothel peripherer Kapillaren besitzt Fenestrierungen von ca. 50 µm Durchmesser, die einen nahezu freien Austausch von Wasser und gelösten Substanzen zwischen dem Blut und der extrazellulären Flüssigkeit des Gewebes ermöglichen (SCHIEBLER u. KORF 2007). Die Endothelzellen an der BHS haben keinerlei Fenestrierungen oder Zellularspalten (JOO 1986). Diese Endothelzellen sind vielmehr durch sehr dichte Zell-Zell-Kontakte, sogenannte *tight junctions*, miteinander verbunden. Die *tight junctions* sind im Gegensatz zu den recht durchlässigen *gap junctions* oder gar Fenestrierungen an peripheren Kapillaren ein wichtiges Charakteristikum der BHS (WELSCH 2006). Sie

sind Teil eines hochdynamischen Systems, das – beeinflusst durch Bestandteile des Cytoskeletts – die parazelluläre Permeabilität der BCEC für größere Moleküle stark einschränkt und dadurch einen wichtigen Beitrag zur Schrankenfunktion der BHS leistet (CLAUDE u. GOODENOUGH 1973; MADARA 1988).

Die transzelluläre Passage von Molekülen zwischen Blut und Gehirn ist ebenfalls limitiert, da im Vergleich zu den peripheren Zellen die Anzahl der Pinozytose-Vesikel in den BCEC sehr gering ist (CERVOS NAVARRO 1963). Die Kapillaren des zentralen Nervensystems sind letztendlich um den Faktor 50 bis 100 besser abgedichtet als diejenigen in der Peripherie (ABBOTT 2002). In den BCEC sind metabolisierende Enzyme wie z. B. die Catechol-O-Methyltransferase, Monoaminoxidasen oder auch Cytochrom-P450-Enzyme vermehrt aktiv (MERESSE et al. 1989; PERRIN et al. 1990), so dass viele Substanzen noch vor oder während des intrazellulären Transportes metabolisiert werden.

Perizyten und Astrozyten :

Es gibt ebenso Hinweise darauf, dass außer den BCEC noch weitere, benachbarte Zell-Typen an der Funktion der BHS beteiligt sind. Zur Diskussion stehen insbesondere Astrozyten und Perizyten (S. KROLL et al. 2009).

In Abbildung 2 ist schematisch der Querschnitt einer Gehirnkapillare mit umliegenden Astrozyten-Endfüßchen, Perizyt und Basalmembran dargestellt.

Die Perizyten sind in die Basalmembran integriert, bedecken bis zu einem Drittel die Oberfläche der BCEC (FRANK et al. 1987) und besitzen vielfältige Funktionen. Dazu gehört unter anderem die Regulation des Blutflusses durch Kontraktion, die Stabilisierung der Gefäße und die Steuerung der Angiogenese (SIMS 2000). Mittlerweile ist eine Beteiligung der Perizyten an der Differenzierung der Endothelzellen sowie an Transportvorgängen über die BHS bewiesen (ANTONELLI-ORLIDGE et al. 1989; KRAUSE et al. 1993).

Die Astrozyten sind Gliazellen des zentralen Nervensystems, also des interstitiellen Gewebes zwischen den Nervenzellen und den Kapillaren. Über fußartige Ausläufer, den so genannten Endfüßchen, treten sie mit den Kapillaren in Kontakt und bedecken ca. 80% der Kapillaroberfläche. Sie sind, genau wie die Perizyten, noch durch die Basalmembran von den BCEC getrennt (ABBOTT et al. 2006). *In-vitro*-Studien deuten darauf hin, dass die Astrozyten selber zwar keine Barrierefunktion ausüben, aber z. B. über eine Beeinflussung der Dichte der *tight junctions* und der γ -

Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität bei der Entwicklung und der Regulierung der BHS-Funktion eine Rolle spielen (YAMAGATA et al. 1997; HAMM et al. 2004). Die in der Peripherie der Endothelzellen gelegenen Perizyten, Astrozyten und Neuronen sind wichtig für die Realisierung einer dichten Barriere, wobei es sich hier um ein System der gegenseitigen Beeinflussung handelt, das noch immer nicht vollständig erforscht und verstanden ist (HASELOFF et al. 2005).

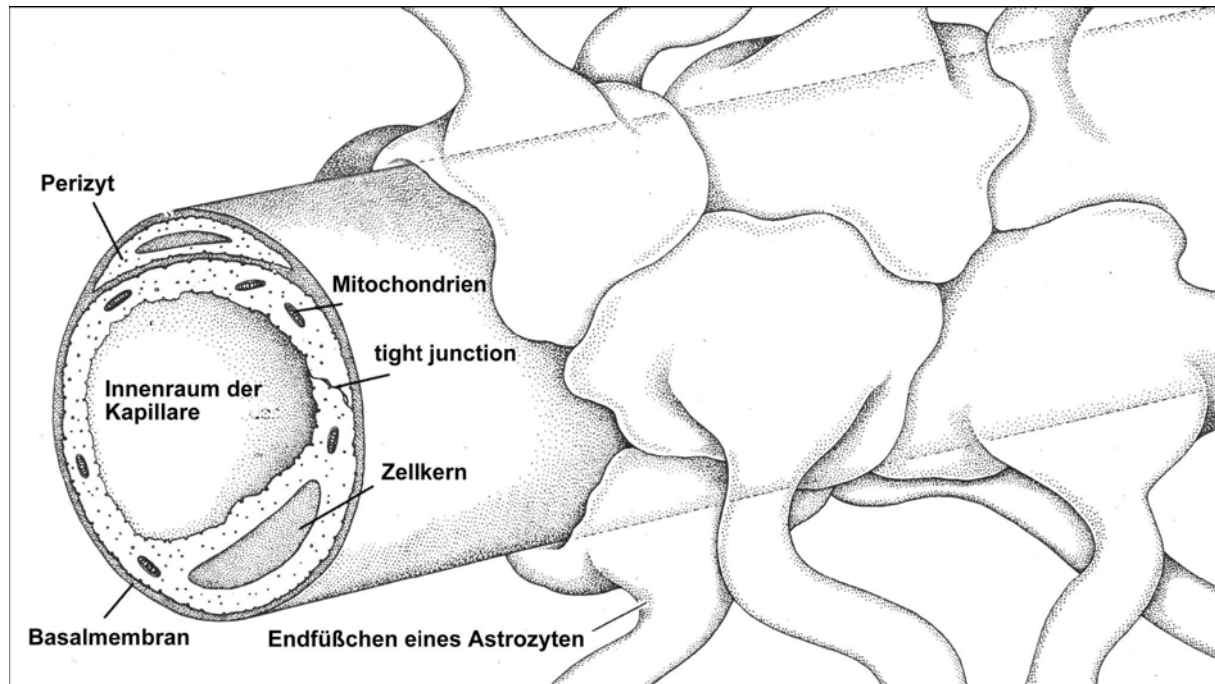


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Gehirnkapillare mit Astrozytenendfüßchen und Perizyt, entnommen aus GOLDSTEIN u. BETZ (1986b).

Exportproteine:

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass neben den morphologischen und enzymatischen Besonderheiten auch sekretorische Exportproteine wie z.B. P-Glykoprotein (Pgp) maßgeblich an der besonderen Schrankenfunktion der BHS beteiligt sind (TATSUTA et al. 1992; SCHINKEL 1999). Die BHS gewährleistet also einerseits die Zufuhr von und Versorgung mit Nährstoffen, die für die geregelte Funktion des Gehirns nötig sind, und sorgt andererseits dafür, dass das Gehirn vor dem Eintritt potentiell toxischer oder unnützer Moleküle geschützt wird. Genauere Erläuterungen zu den Effluxproteinen folgen in den folgenden Abschnitten.

2.2.2 Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Allgemeines:

An der BHS sind verschiedene Transportsysteme etabliert: Die passive Diffusion, der Transport durch Carrier-Proteine und der aktive Transport.

Passive Diffusion:

Die passive Diffusion ist die wohl einfachste Art des Transportes. Sie folgt dem Konzentrationsunterschied zwischen den Kompartimenten Blut und Gehirn, wobei hier sowohl der transzelluläre Weg, als auch der stärker beschränkte parazelluläre Weg (LOHMANN, 2003) zur Verfügung stehen. Außer den vom Gehirn benötigten

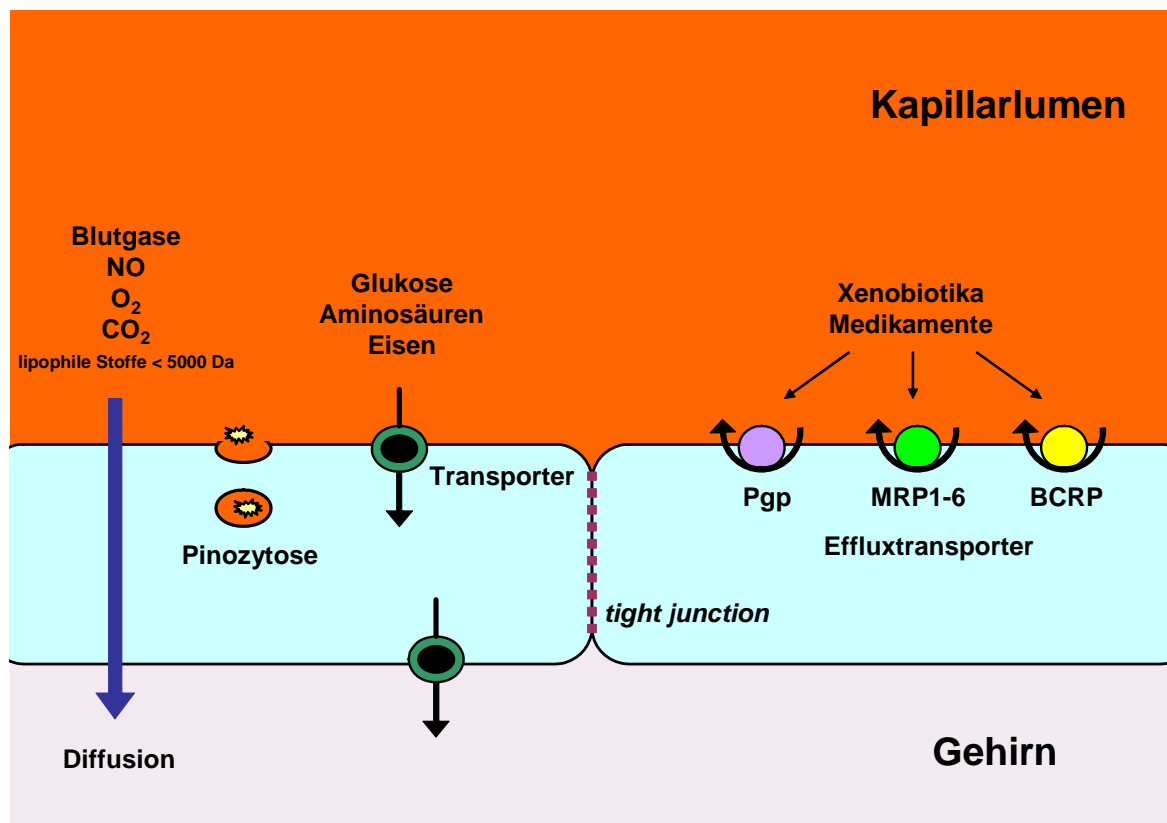


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke. Erläuterungen im Text.

wasserlöslichen Nährstoffen und Peptiden, passieren die meisten anderen hydrophilen Substanzen (z.B. Arzneimittel) die BHS – wenn überhaupt – durch passive Diffusion und nicht durch spezifische carrier- oder rezeptorvermittelte

Systeme (CHEN et al. 2004). Dieser Transportweg wird von den Atemgasen Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie Wasser und einigen lipophilen Molekülen wie Benzol genommen (MÄRTEN 2004). Die passive Diffusion eines Stoffes wird durch die Molekülgröße, aber auch durch dessen Fettlöslichkeit beschränkt. Lipophile Stoffe können leichter Membranen passieren (OLDENDORF 1974; LEVIN 1980). Die Grenze für die passive Diffusion eines Stoffes liegt nach SAUNDERS et al. (1999) bei einem Molekülradius von 1,2 nm und einem Molekulargewicht von maximal 5 kDa.

Carriervermittelter Transport:

Wasserlösliche Nährstoffe sowie Peptide werden in der Regel über rezeptor- oder absorptionsvermittelte Endo- bzw. Transzytose sowie spezifische Carriersysteme ins Gehirn aufgenommen, da die *tight junctions* einen transzellulären Transport nahezu ausschließen (MADARA 1988). Der hohe und kontinuierliche Glukosebedarf des Gehirns wird durch Glukose-Transportproteine gewährleistet (PARDRIDGE 1993). Analog gelangen auch Aminosäuren, Eisen und Insulin über einen rezeptorvermittelten Transport in das Gehirn. Transportproteine für neutrale und basische Aminosäuren sichern die Zufuhr dieser (endogenen) Substanzen ins Gehirn (TSUJI 2005; ALLEN u. GELDENHUYS 2006). Man spricht auch von der sogenannten erleichterten Diffusion. Hierbei handelt es sich nicht um einen Vorgang, der nach den Gesetzen der Diffusion abläuft, sondern um einen sättigbaren Prozess, der sich nach der Michaelis-Menten-Kinetik richtet (SCHRÖDER u. DIENER 2000).

Aktiver Transport:

Neben den passiven Transportmechanismen gibt es auch aktive Transportvorgänge. Diese sind energieabhängig und benötigen u. a. die Hilfe der Na/K-ATPase, um Substanzen zu transportieren.

In den letzten Jahren hat man zunehmend erkannt, dass auch Exportproteine bzw. sekretorische Transportproteine eine wichtige Rolle bei Transportprozessen an der BHS spielen (OHTSUKI et al. 2003; LOSCHER u. POTSCHKA 2005a; SYVANEN et al. 2006). Für eine Vielzahl von Substanzen, die klein und lipophil genug wären, die BHS durch Diffusion zu überwinden, zeigt diese eine ungewöhnlich geringe Permeabilität. Man fand heraus, dass diese Substanzen zwar zum Teil aus dem Blut in die BCEC gelangen, dort aber sofort von Exportproteinen erkannt und wieder aktiv

aus der Zelle zurück ins Blut transportiert werden (BACHMEIER et al. 2006). Erstes bekannt gewordenes Transportprotein dieser Art ist P-Glykoprotein (Pgp), das vor allem durch Ausbildung einer Resistenz in Krebszellen auf sich aufmerksam machte, indem es den Arzneistoff, in diesem Fall ein Chemotherapeutikum, umgehend wieder aus der Tumorzelle hinausschleuste. Hieraus entstand auch letztlich das Synonym „*multidrug-resistance-protein*“ für P-Glykoprotein (UEDA et al. 1986; LING 1987). Inzwischen wird aber auch über ein Mitwirken der erst Anfang bzw. Mitte der neunziger Jahre bekannt gewordenen Familie der „*multidrug-resistance-associated-proteins*“ (MRPs) an Transportprozessen der Blut-Hirn Schranke diskutiert (TATSUTA et al. 1992; SCHINKEL 1999; SMITH et al. 2001). Sowohl P-Glycoprotein als auch die MRPs gehören zur Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter* = ABC-Transporter). Zu den ABC-Transportern zählt man im humanen Genom 48 Mitglieder (DEAN u. ALLIKMETS 2001). Allen ABC-Proteinen ist gemein, dass sie ATP binden und diese Energie dazu nutzen, Moleküle durch die Zellmembran zu schleusen (MÄRTEN, 2004).

Bei den *multidrug-resistenz*-Proteinen werden folgende Gruppen unterschieden:

- ABCC1-6: „*multidrug-resistance-proteins*“ (früher MRP1-7) sind Rücktransporter für glutathion-, -glucoronat- und sulfatkonjugierte Stoffe (CAMPBELL et al. 2004).

Nomenklatur HUGO (Human Genome Organisation)		Synonyme				
Mensch	andere Spezies	Mensch	Homologe anderer Spezies			
			allgemein	Maus	Ratte	Schwein
ABCB1	Abcb1	Pgp	Pgp	mPgp	rPgp	pPgp
ABCC1	Abcc1	MRP1	Mrp1	mMrp1	rMrp1	pMrp1
ABCC2	Abcc2	MRP2 cMOAT	Mrp2	mMrp2	rMrp2	pMrp2
ABCC3-6	Abcc3-6	MRP3-6	Mrp3-6	mMrp3-6	rMrp3-6	pMrp3-6
ABCG2	Abcg2	BCRP MXR ABCP BMDP	Bcrp BMDP	mBcrp mAbca2	rBcrp rAbca2	BMDP pAbca2

Tab. 1: Nomenklatur der ABC-Transportproteine.

- ABCB1: „*P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance-proteins*“ sind Proteine, welche im Gehirnkapillarendothel und im Epithel der Plexus choroidei in hoher Konzentration zu finden sind und einige, vor allem auch lipophile Substanzen aus

Endothelzellen wieder in das Blut zurücktransportieren können (GHERSI-EGEA u. STRAZIELLE 2001).

- ABCG2: BCRP („*breast-cancer-resistance-protein*“), welches diverse Zellen vor dem Eindringen von Xenobiotika schützt. Es kommt an den Endothelzellen der BHS aber auch beispielsweise an denen der Plazenta und der Blut-Hoden-Schranke vor (VLAMING et al. 2009).

2.3 EPILEPSIE UND PHARMAKORESISTENZ

2.3.1 Einführung

Die Therapie der Epilepsie ist nach wie vor auf eine medikamentelle Unterdrückung der Anfälle beschränkt. Dies erfolgt im Allgemeinen durch eine chronische Behandlung mit antikonvulsiv wirksamen Medikamenten (Antiepileptika, AE). Eine Epilepsitherapie im Sinne einer Heilung ist bisher noch nicht möglich, was eine lebenslange Pharmakotherapie notwendig macht (LOSCHER u. POTSCHKA 2002). In der Humanmedizin stehen derzeit über 20 verschiedene AE mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung. Je nach Klassifikation der zu Grunde liegenden Epilepsie werden unterschiedliche Wirkstoffe zur Behandlung ausgewählt.

Im Gegensatz zur Situation in der Humanmedizin, gibt es bisher kein für die Tiermedizin zugelassenes AE, sodass humanmedizinische Medikamente umgewidmet werden müssen. Durch die beim Hund sehr viel raschere Metabolisierung verschiedener Wirkstoffe reduziert sich die Auswahl von AE mit praktikablen Anwendungsintervallen (POTSCHKA et al., 2009). Die beiden gebräuchlichsten AE in der Tiermedizin sind Phenobarbital und Kaliumbromid (BAGLEY 2005). Meist wird Kaliumbromid zusätzlich zu Phenobarbital gegeben. Fast alle anderen in der Humanmedizin eingesetzten AE können bei Hunden und Katzen aus verschiedenen Gründen nur eingeschränkt oder nicht angewendet werden. So sind Carbamazepin, Oxcarbazepin, Valproinsäure, Vigabatrin, Nimodipin, Lamotrigin und Vigabatrin in der Tiermedizin durch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften (vor allem ihre Halbwertszeit), ihre Toxizität, die Nebenwirkungen und/oder die teils sehr hohen Kosten stark eingeschränkt (WEISS et al. 1994; WONG u. LHATOO 2000; RUEHLMANN et al. 2001). Andere Substanzen, wie Zonisamid, Gabapentin, Felbamat, Levetiracetam oder Pregabalin kommen zwar in Einzelfällen beim Hund zum Einsatz, führen aber teilweise nicht zur vollständigen Anfallsfreiheit oder sind sehr teuer (RUEHLMANN et al. 2001; PLATT et al. 2006; VON KLOPMANN et al. 2007; VOLK et al. 2008; DEWEY et al. 2009).

Ein Therapieerfolg bei Epilepsie ist im Idealfall das Erreichen einer vollkommenen Anfallsfreiheit, jedoch mindestens eine 50%ige Reduktion der Anfallsfrequenz ohne Beeinträchtigung der normalen Gehirnfunktionen. In der Humanmedizin kann dieser Therapieerfolg bei nahezu 60% der Epilepsiepatienten erreicht werden (REGESTA u.

TANGANELLI 1999). Bisher gibt es keine einheitliche Definition der Pharmakoresistenz, doch gelten Epilepsiepatienten dann als klinisch pharmakoresistent, wenn nach Behandlung mit zwei bis drei AE der ersten Wahl kein Therapieerfolg erzielt werden kann. Trotz des optimalen Einsatzes moderner AE, kann dieser Therapieerfolg bei mehr als 30% aller Epilepsiepatienten nicht erreicht werden (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2002; LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Daher stellt die Pharmakoresistenz ein schwerwiegendes Problem in der Behandlung der Epilepsie dar (STEFAN et al. 2006; POTSCHKA 2010a). Patienten mit Temporallappenepilepsie leiden mit einer Prävalenz von 70% am häufigsten unter einer pharmakoresistenten Epilepsie (ARONICA et al. 2003). Aber auch Patienten, die bereits vor dem ersten Lebensjahr an einer Epilepsie erkrankt sind, bei denen wiederholt Fieberkrämpfe aufgetreten sind, oder die bereits vor Behandlungsbeginn eine hohe Anfallsfrequenz aufwiesen entwickeln besonders häufig eine Pharmakoresistenz (REGESTA u. TANGANELLI 1999).

Bei der Pharmakoresistenz handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein multifaktorielles Geschehen, dem genetische, krankheits- und pharmakotherapiebedingte Faktoren zugrunde liegen (LOSCHER u. POTSCHKA 2002; STEINLEIN 2004).

In der Tiermedizin sprechen 20 bis 40% der Hunde nicht auf eine Monotherapie mit Phenobarbital an (LÖSCHER, 2003). Bei 20 bis 30% der Hunde kann immerhin durch eine Kombinationstherapie mit Kaliumbromid eine Anfallsfreiheit erlangt werden (TREPANIER et al. 1998). Unkontrollierbare Anfälle schränken vor allem beim Menschen die Lebensqualität erheblich ein. Der Verlust der Fahrerlaubnis und des Arbeitsplatzes sowie Einschränkungen hinsichtlich fast aller Sportarten verstärkt dieses Bild (BROWNE u. HOLMES 2001). In der Veterinärmedizin führt die pharmakoresistente Epilepsie häufig zur Euthanasie der Tiere (LOSCHER 2003).

2.3.2 Ursachen und Entstehung von Pharmakoresistenz

Allgemeines:

Die Mechanismen, die zur Entstehung einer Pharmakoresistenz führen, sind bis heute noch nicht bis ins Letzte geklärt und verstanden. Derzeit existieren drei grundlegende Hypothesen, die das Therapieversagen begründen sollen.

Die Hypothese der intrinsischen Krankheitschwere geht davon aus, dass neurobiologische Faktoren, die zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führen, ebenfalls eine Pharmakoresistenz bedingen (ROGAWSKI u. JOHNSON 2008).

Die Targetstruktur-Hypothese besagt, dass spezifische Veränderungen an den Targetstrukturen bestimmter Arzneimittel zu einer verminderten Wirksamkeit dieser Substanzen an ihren Zielstrukturen führen (REMY u. BECK 2006).

Im Gegensatz dazu stellt die Transporter-Hypothese eine Überexpression von Effluxtransportern an der BHS als Ursache der Pharmakoresistenz in den Vordergrund. Diese sogenannten Multidrug-Transporter sind Effluxpumpen und schleusen aktiv lipophile Substanzen, die in den Gehirndothelzellen anfluten, zurück in die Blutbahn (siehe 2.2.2). So können sich diese Substanzen nicht im Gehirnparenchym anreichern (SISODIYA 2003; LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). Die Beobachtung, dass die Expressionslevel verschiedener Effluxtransporter in reseziertem Gehirngewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie stark erhöht waren, brachte diese Hypothese in Gang (TISHLER et al. 1995; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2004; AK et al. 2007).

Multidrug-Transporter:

Eine Vielzahl von Untersuchungen in verschiedenen Nagernmodellen hat gezeigt, dass eine Anfallsaktivität Effluxtransporter der BHS, einschließlich Pgp (= ABCB1, siehe 2.2.2 Tab. 1), Vertreter der ABCC-Transporter und BCRP (*breast-cancer-resistance-protein* = ABCG2), hochregulieren kann (RIZZI et al. 2002; VOLK u. LOSCHER 2005; LIU et al. 2007). Transportuntersuchungen *in-vivo* und *in-vitro* haben gezeigt, dass verschiedene AE Substrate von Pgp sind und einige auch von ABCC-Transportern transportiert werden (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b).

Pgp wird beim Menschen vom *multidrug-resistance-1* (*MDR1*)-Gen kodiert, bei Nagern existieren zwei Pgp-Isoformen, kodiert von *mdr1a* und *mdr1b*. Ausser im Gehirn wird Pgp auch in Darm, Niere oder Leber exprimiert, wo es schädliche Stoffe (Xenobiotika) aus den Zellen ausschleusen soll. An der BHS kommt Pgp an der apikalen Membran der Endothelzellen vor und ist für den Transport von Substanzen ins angrenzende Kapillarlumen zuständig. Neben Toxinen wird eine Reihe von strukturell nicht verwandten, lipophilen und amphiphilen Arzneimitteln von Pgp transportiert. Dazu gehören unter anderem Zytostatika, Chemotherapeutika, HIV-

Protease-Inhibitoren, Antiemetika, Antihistaminika und Antiepileptika (POTSCHKA 2010b).

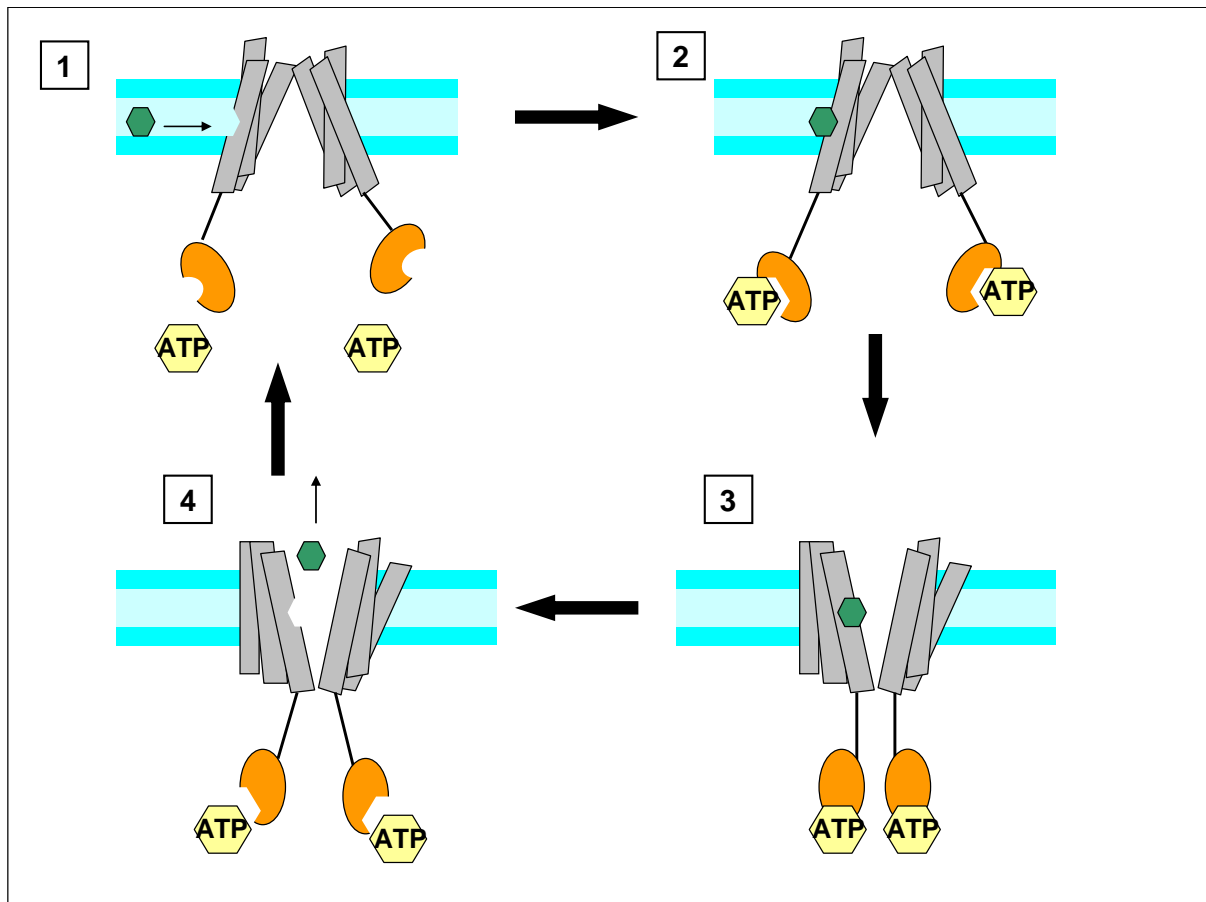


Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise des P-Glykoprotein. Modifiziert nach HIGGINS und LINTON (2004).

Das 170 kDa große Membranprotein Pgp ist ein Produkt des beim Menschen auf Chromosom 7 gelegenen MDR1-Gens. Es ist phosphoryliert, glykosyliert und besteht aus 1280 Aminosäuren, die zwei homologe Hälften mit je sechs transmembranären Domänen (TMD) und einer ATP-Bindungsstelle bilden (Abb. 4). Die elektronenmikroskopische Strukturanalyse zeigt Pgp als Zylinder mit einem Durchmesser von 10 nm und einer Höhe von 8 nm. Pgp ist teilweise in der Zytoplasmamembran verankert. Als Substratbindungsstellen wurden die TMD 5, 6, 11 und 12 identifiziert.

Die Funktionsweise des Pgp ist immer noch nicht einheitlich geklärt. Nach HIGGINS und LINTON (2004) besitzen die offenen, dimeren ATP-Bindungsstellen des ABC-Transporters basal eine Konfiguration mit einer niedrigen Affinität zu ATP,

wohingegen die Affinität der Bindungsseite (an den TMD) zu den Substraten sehr hoch ist und zur Plasmamembran zeigt. Im ersten Schritt wird der Transportzyklus durch die Bindung eines Substrates an der Bindungsseite der TMD initiiert. Das aus dem inneren Teil der Plasmamembran kommende Substrat diffundiert an die Bindungsstelle. Die Affinität der ATP-Bindungsstellen zu ATP wird durch die Bindung des Substrates an den Transporter erhöht, wodurch die Aktivierungsenergie für die geschlossene dimere Form herabgesetzt wird. Zwei Moleküle ATP binden an den ATP-Bindungsstellen und erzeugen das geschlossene Dimer (Schritt 2). Das geschlossene Dimer induziert eine Konformationsänderung der TMD. Dadurch rotieren die Substrat-Bindungsstellen der TMD ins Innere des Transporters und das Substrat wird zum Extrazellulärraum freigelegt. Die Affinität der Bindungsstelle wird erniedrigt und das Substrat kann abdiffundieren. In einem dritten Schritt wird ATP hydrolysiert und es kommt zu einem Übergangszustand (Schritt 4). Phosphat -und ADP-Freigabe führen zu einer Wiederherstellung der basalen Konfiguration durch Rotation und Reorientierung der TMD in den Ausgangszustand. Damit ist der Transporter wieder für einen weiteren Transportzyklus bereit.

2.3.3 Signaltransduktion der anfallsinduzierten Expression von P-Glykoprotein

Bei einem epileptischen Anfall kommt es zur massiven Freisetzung und Akkumulation von Glutamat, einem exzitatorischen Neurotransmitter, im synaptischen Spalt (HOLMES 2002). Glutamat bewirkt über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren an Neuronen, aber auch an Gehirndothelzellen, einen schnellen Ca^{2+} - und Na^{+} - Einstrom in die Zelle und einen gleichzeitigen K^{+} -Ausstrom (SATTLER u. TYMIANSKI 2000). Dass NMDA-Rezeptoren nicht nur an Neuronen, sondern auch an Gehirndothelzellen exprimiert werden, wurde bereits in mehreren Studien demonstriert (KOENIG et al. 1992; ZHU u. LIU 2004). Die oben genannte Ca^{2+} -Überladung führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen (MAWATARI et al. 1996; PAOLETTI u. NEYTON 2007), welche die cytosolische Phospholipase A_2 (PLA₂) aktivieren, die vermehrt Arachidonsäure (AS) aus Phospholipidmembranen freisetzt (BAZAN et al. 2005; COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005).

Neueste Erkenntnisse beweisen, dass die Cyclooxygenasen (COX) nicht nur im Endoplasmatischen Retikulum, sondern auch perinuklear lokalisiert sind (UENO et al. 2001). So wird AS von der zytosolischen PLA₂ direkt aus der Kernmembran freigesetzt und dort in Prostaglandin E₂ (PGE₂) umgewandelt (Y.S. KIM et al. 2002). Neben anderen Rezeptoren des PGE₂ findet sich auch eine Isoform des EP1-Rezeptors an der Kernmembran (NOREL 2007).

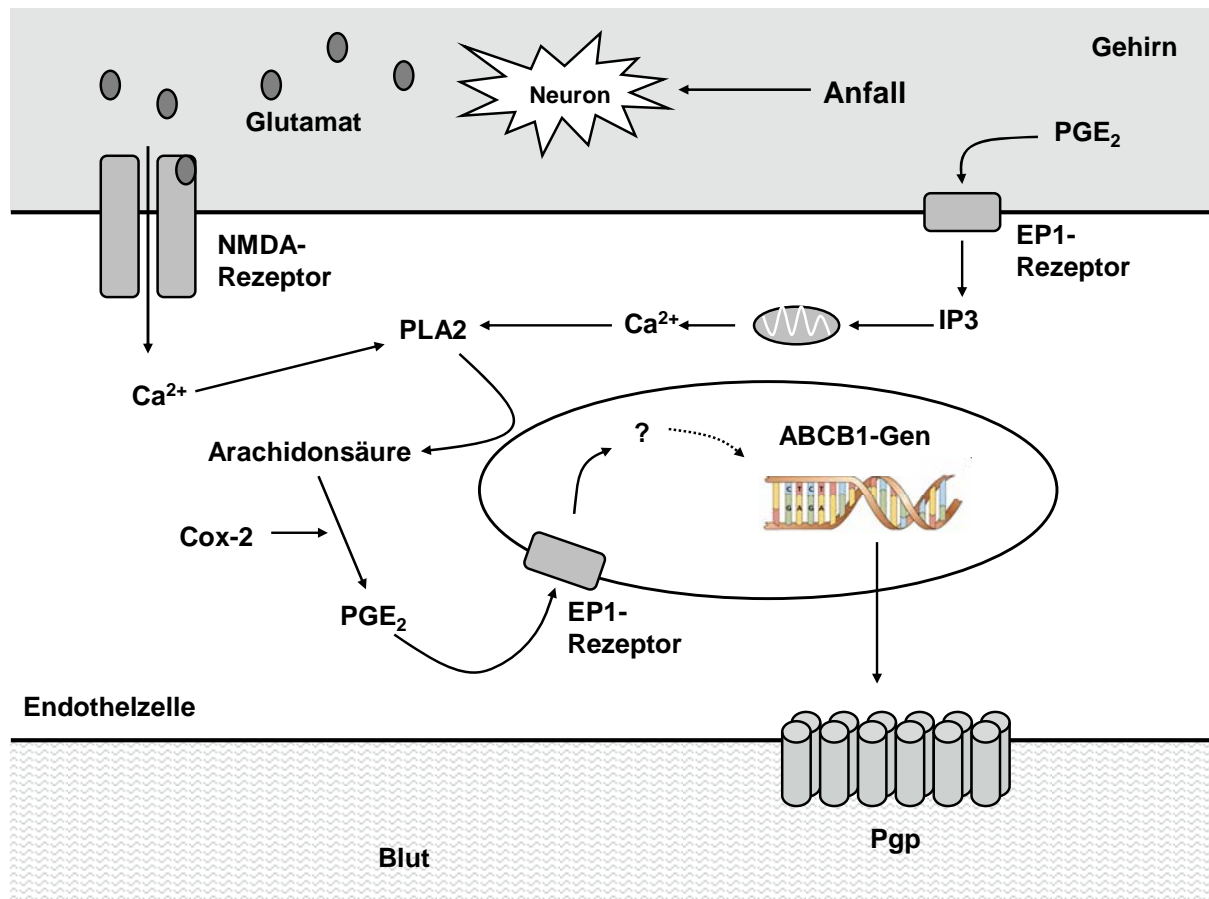


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionskaskade in Gehirndendothelzellen bei einem epileptischen Anfall. Modifiziert nach POTSCHKA, 2009.

Früher war der EP1-Rezeptor nur als G-Protein-gekoppelter Rezeptor an der Zytoplasmamembran bekannt, an den das relativ hydrophile PGE₂, das die Membran nicht durchdringen kann, bindet. Durch die Bindung von PGE₂ an den zytoplasmamembranständigen EP1-Rezeptor führt Gq-Protein-gekoppelt über IP₃ zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Dies kann ebenfalls zu einer Verstärkung der Bildung von Sauerstoffradikalen führen und eine weitere Aktivierung der PLA₂ bewirken. Vermutlich wird über eine PGE₂-Bindung an den kernständigen

EP1-Rezeptor das *MDR1*-Gen aktiviert. Welche Faktoren dabei eine Rolle spielen, liegt jedoch noch weitgehend im Dunkeln.

Die Rezeptoren EP2 – 4 hingegen scheinen eine neuroprotektive Wirkung zu vermitteln (BILAK et al. 2004; MCCULLOUGH et al. 2004; AHMAD et al. 2005).

2.3.4 Strategien zur Überwindung der Pharmakoresistenz

Allgemeines:

Die Bedeutung der Efflux-Transporter der BHS für den Therapieerfolg einer medikamentellen Behandlung von Epilepsien und anderen ZNS-Erkrankungen gilt derzeit durch eine Vielzahl von Forschungsergebnissen als bewiesen (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b; THUERAUF u. FROMM 2006). Somit verhindert Pgp mit seinem breiten Substrat-Spektrum als wichtigster Efflux-Transporter an der BHS die Anreicherung dieser Substrate im Gehirnparenchym (SCHINKEL 1999; FROMM 2004). Deshalb liegt es nahe, sich bei der Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung der Pharmakoresistenz auf die Modulation dieser Effluxpumpe bzw. deren Regulationskaskade zu konzentrieren.

Substanzen wie Verapamil oder Cyclosporin A, die bisher für andere Indikationen verwendet und zunächst nur anhand von Untersuchungen an Zellkulturen als Pgp-Inhibitoren beschrieben wurden, konnten nun als kompetitive Pgp-Inhibitoren identifiziert werden (FOX u. BATES 2007). Aufgrund der geringen Affinität zu Pgp werden für einen therapeutischen Einsatz jedoch hohe Dosen dieser Inhibitoren der ersten Generation benötigt, was mit einer exzessiven Toxizität für die entsprechenden Patienten einhergeht.

Eine zweite Generation von Inhibitoren stellen Analoga dieser initialen Pgp-Hemmstoffe dar. Valspodar (= PSC-833) ist als nicht-immunsuppressives Derivat des Cyclosporin D beispielhaft für die Entwicklung solcher Substanzen (FOX u. BATES 2007) und verfügt über eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu dessen Ursprungssubstanz. Allerdings hemmt Valspodar das Cytochrom P₄₅₀-Enzymsystem und nimmt so Einfluss auf die Metabolisierung und Elimination anderer Medikamente, die bei gleichzeitiger Gabe mit Valspodar den Organismus durch verzögerten Abbau und Ausscheidung schädigen können.

Eine dritte Generation von Pgp-Modulatoren (z.B. Tariquidar, Laniquidar und Elacridar) beinhaltet selektivere und potentere Inhibitoren, die als nicht-kompetitive Antagonisten eine Konformationsänderung der Proteinstruktur des Pgp und so eine Hemmung dessen Transportfunktion bewirken (THOMAS u. COLEY 2003).

Die direkte Modulation des Pgp birgt jedoch viele Risiken. Da Pgp in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen exprimiert wird, kann eine Anreicherung des Medikaments, dessen Anfluten im Gehirn durch die gleichzeitige Verabreichung eines solchen Pgp-Inhibitors erzielt wird, sicherlich zur Penetration des Stoffes in andere Gehirnregionen sowie in periphere Gewebe führen. Da die Effluxtransporter an der BHS eine entscheidende Schutzfunktion gegenüber dem Eindringen toxischer Substanzen sowie der vorzeitigen Apoptose von Zellen besitzen, stellt deren direkte Modulation ein erhöhtes Risiko für Vergiftungen und Zellschädigung dar (PALLIS et al. 2002; GENNUSO et al. 2004).

Eine weitere Strategie, um Medikamenten den Zugang zum Gehirn zu ermöglichen, ist eine Umgehung der BHS und deren Transporter mittels hypertoner Lösungen. Zwar wurde diese Methode bereits erfolgreich an Krebspatienten angewendet (KROLL et al. 1998), jedoch wurde auch hier die Schrankenfunktion der BHS soweit herabgesetzt, dass toxische Substanzen erleichtert ins Gehirn eindringen konnten. Darüber hinaus kann eine aus dem osmotischen Stress entstehende Extravasation von Albumin die Epileptogenese fördern (TOMKINS et al. 2007; VAN VLIET et al. 2007). All diese Nachteile beschränken eine solche Therapie auf eine kurzzeitige Anwendung in der Krebstherapie.

Auch eine intrazerebrale (DE BOER u. GAILLARD 2007) oder nasale Applikation (GRAFF u. POLLACK 2005) von Medikamenten ist entweder mit hohen Risiken aufgrund des operativen Eingriffes oder der fehlenden Evidenz bezüglich einer besseren Medikamentenanreicherung im Gehirn keine zufriedenstellende Strategie zur Behandlung pharmakoresistenter Patienten (MERKUS u. VAN DEN BERG 2007).

Die Cyclooxygenase-2:

Der Neurotransmitter Glutamat spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der transkriptionalen Aktivierung des Pgp (BAUER et al. 2008; POTSCHKA 2010b). Die in Folge einer NMDA-Rezeptor-Bindung medierte Erhöhung des intrazellulären Calciums setzt eine Vielzahl enzymatischer Kaskaden in Gang (MISHRA u.

DELIVORIA-PAPADOPOULOS 1999). Insbesondere die bereits unter 2.3.3 beschriebene Aktivierung der Arachidonsäurekaskade mit der Bildung von Prostaglandinen trägt entscheidend zur transkriptionalen Aktivierung von Pgp bei, wie es in Arbeiten aus diesem Institut an isolierten Gehirnkapillaren gezeigt werden konnte (BAUER et al. 2008).

BAUER et al. (2008) konnten in dieser Studie die Pgp-Induktion mittels Glutamat sowohl durch die Verwendung des COX-Inhibitors Indomethacin als auch des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib an den isolierten Kapillaren verhindert. Eine Co-Inkubation mit einem COX-1-Hemmer blieb hingegen ohne jeglichen Effekt. Die entscheidende Rolle der COX-2 wurde auch durch Experimente an Gehirnkapillaren von *COX-2-knock-out*-Mäusen bestätigt, in denen nach einer Glutamatinkubation keine Auswirkungen auf die Pgp-Expression auftraten. Interessanter Weise wurde die basale Pgp-Expression und -Aktivität weder durch eine COX-2-Inhibition noch einen *COX-2-knock-out* beeinflusst.

Die Identifikation einer Signaltransduktionskaskade über Glutamat, den NMDA-Rezeptor und die COX-2 geben Anlass zur Vermutung, dass eine Modulation dieser Kaskade die anfallsbedingte Induktion der Pgp-Expression im epileptischen Gehirn verhindern kann, wie sich an Gehirnkapillaren, die vor der Anwendung von Glutamat mit dem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 behandelt wurden, zeigte. MK-801 verhinderte eine Pgp-Überexpression auch in epileptischen Ratten in einem Status-Epileptikus-Modell (SE-Modell) (BANKSTAHL et al. 2008). Allerdings ist von einer klinischen Anwendungen von sowohl kompetitiven als auch nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten aufgrund der dramatischen Nebenwirkung, die diese Medikamente bei epileptischen Patienten hervorrufen, abzusehen (LOSCHER et al. 1998). Aus diesem Grund untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Effektivität von Strategien, welche in die Signaltransduktionskaskade um Glutamat und die COX-2 eingreifen.

Zunächst verhinderte der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib die Pgp-Hochregulation in einem Pilocarpin-SE-Modell in Ratten (BAUER et al. 2008; ZIBELL et al. 2009). Da das direkte Parasympathomimetikum Pilocarpin die Pgp-Überexpression auf extreme Weise anregt, sind die Ergebnisse dieser Studien besonders vielversprechend.

Pgp-induzierender Faktor bei ZNS-Erkrankungen	Mechanismen mit direkter Auswirkung	Mechanismen mit indirekter Auswirkung	Strategie zur Prävention
Medikamenteneinsatz (z. B. Chemotherapie)	Orphan Kern- Rezeptoren PXR/SXR		PXR/SXR Antagonisten (z. B. Ketokonazol)
	Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion		Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Weges (z. B. Quercetin)
Anfallsaktivität	Glutamat/NMDA Rezeptor/Cyclooxygenase-2/EP1-Rezeptor Signaltransduktion	Epileptische Anfälle	NMDA-Rezeptor Antagonisten, COX-2 Inhibitoren, EP1-Rezeptor-Antagonisten
Hirn-Ischämie		Reaktive Sauerstoff-Spezies	Antioxidantien
		Glutamat/NMDA-Rezeptor/Cyclooxygenase-2/EP1-Rezeptor Signaltransduktion	NMDA-Rezeptor-Antagonisten, COX-Inhibitoren, EP1-Rezeptor-Antagonisten
HIV-Infektion	Tat-Protein		

Tab. 2: Induktion von Pgp bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen und deren Prävention. Modifiziert nach POTSCHKA (2010).

Eine subchronische COX-2-Inhibition konnte die Pgp-Expression in einem Post-SE-Modell der TLE in Ratten trotz der wiederholt stattfindenden Anfälle auf Kontrollniveau zurückführen und den Zugang von AE ins Gehirn wiederherstellen (VAN VLIET et al. 2010). Die basale Pgp-Expression wurde durch die COX-2-Hemmung nicht beeinflusst (BAUER et al. 2008; ZIBELL et al. 2009).

So vielversprechend diese Daten für eine Überwindung der Pharmakoresistenz auch sind, sollten die Risiken, die durch eine klinische Anwendung selektiver COX-2-Inhibitoren entstehen, wie insbesondere für kardio- und cerebrovaskuläre Nebenwirkungen, nicht außer Acht gelassen werden. Aber nicht nur die bereits

bekannten Nebenwirkungen der selektiven COX-2-Inhibitoren werfen einige Zweifel an deren Anwendung bei Epilepsiepatienten auf. Auch wenn die Mehrzahl der existierenden Daten antikonvulsive oder fehlende Effekte auf die Anfallsentstehung und – ausbreitung aufzeigen konnten (MCCULLOUGH et al. 2004; KAWAGUCHI et al. 2005; KAWANO et al. 2006; TAKEMIYA et al. 2006; ABE et al. 2009), existieren bereits Daten aus Studien, die negative Effekte auf Anfallsentstehung und - schwere durch eine COX-2-Hemmung vermuten lassen (KULKARNI u. DHIR 2009).

Umso wichtiger ist es, neue Zielstrukturen für ein Eingreifen in die Arachidonsäurekaskade ausfindig zu machen.

Prostaglandin E₂ und der EP1-Rezeptor:

Das Hauptprodukt der COX-2, Prostaglandin E₂, agiert über vier verschiedene Rezeptoren (EP1, EP2, EP3 und EP4), wobei die Transduktionsprofile der einzelnen

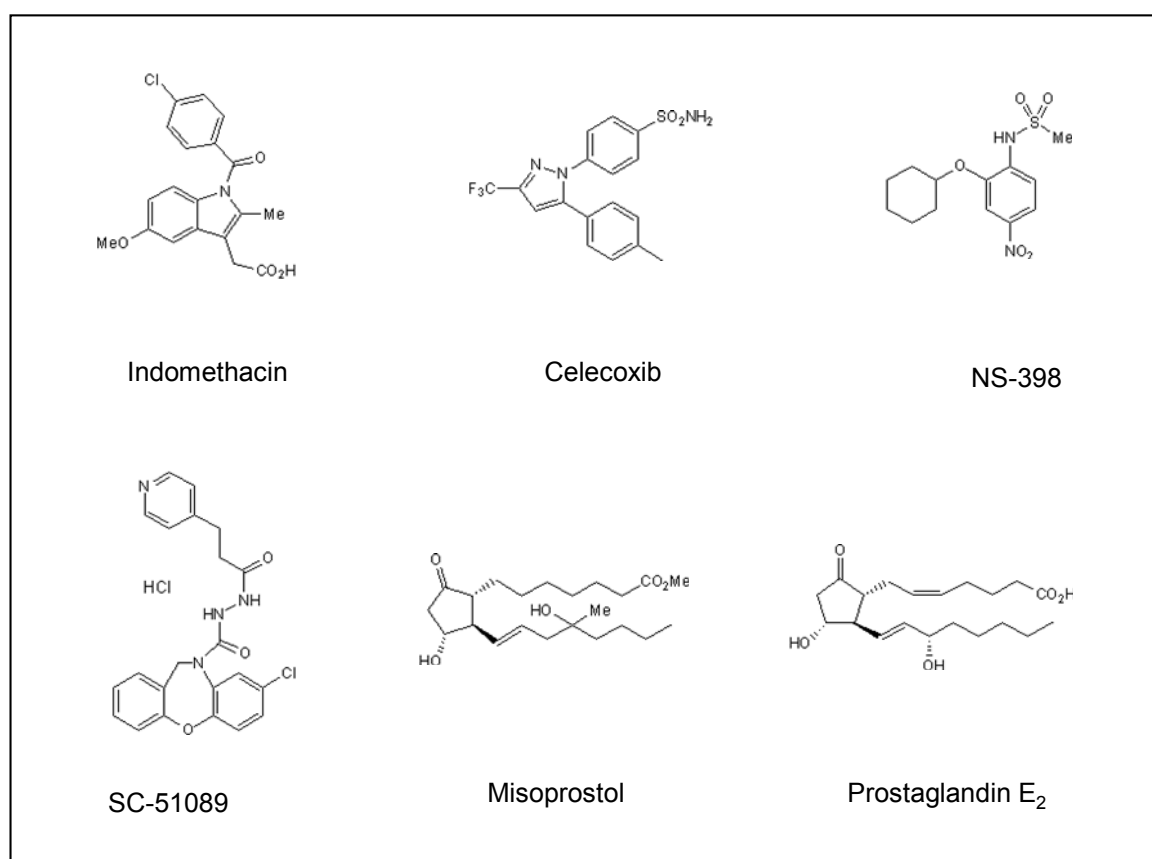


Abb. 6: Strukturformeln des COX-Hemmers Indomethacin, der selektiven COX-2-Hemmer Celecoxib und NS-398, des EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089, des PGE₂-Derivates Misoprostol und PGE₂.

Rezeptoren sehr ausgeprägt sind und zu sehr unterschiedlichen, teils gegensätzlichen Wirkungen führen (HATA u. BREYER 2004). Während eine Blockade der Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 eine Verstärkung neurodegenerativer Prozesse fördert (BILAK et al. 2004; MCCULLOUGH et al. 2004; AHMAD et al. 2005), zeigt eine Inhibition des EP1-Rezeptors eine neuroprotektive Wirkung (KAWANO et al. 2006).

In einem SE-Modell konnte eine anfallsinduzierte Pgp-Hochregulation durch den subchronischen Einsatz des selektiven EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 auf Kontrollniveau zurückgebracht werden (PEKCEC et al. 2009). In diesem Versuch konnte durch SC-51089 die klinische Wirksamkeit des AE Phenobarbital auf die Anfälle gesteigert werden, was die Beteiligung des EP1-Rezeptors an den Induktionsmechanismen des Pgp eindeutig bewies.

Glycin-Antagonisten:

Allgemeines:

Im Hinblick auf die entscheidende Bedeutung exzitatorischer Aminosäuren, wie beispielsweise Glutamat, auf die Entstehung und Ausbreitung von neuronalen Entladungen, liegen seit Langem große Hoffnungen in der Entwicklung von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten für einen klinischen Einsatz als neue AE (DINGLELINE et al. 1990; LOSCHER 1998).

Der NMDA-Rezeptor (NMDAR) setzt sich, wie auch die anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren, aus verschiedenen Protein-Untereinheiten zusammen. Bis heute konnten sieben Untereinheiten, NR1, NR2A-D und NR3A-B, des NMDA-Rezeptors bei Nagetieren charakterisiert werden (MATSUDA et al. 2002).

Der NMDAR-Komplex weist multiple Bindungsstellen auf und wird von einer Vielzahl von endogenen und exogenen Liganden beeinflusst. Neben den beiden kompetitiven Bindungsstellen für die endogenen Agonisten Glutamat und Glycin wurden noch eine Reihe allosterischer Bindungsstellen auf den verschiedenen Untereinheiten und innerhalb des Kanals identifiziert.

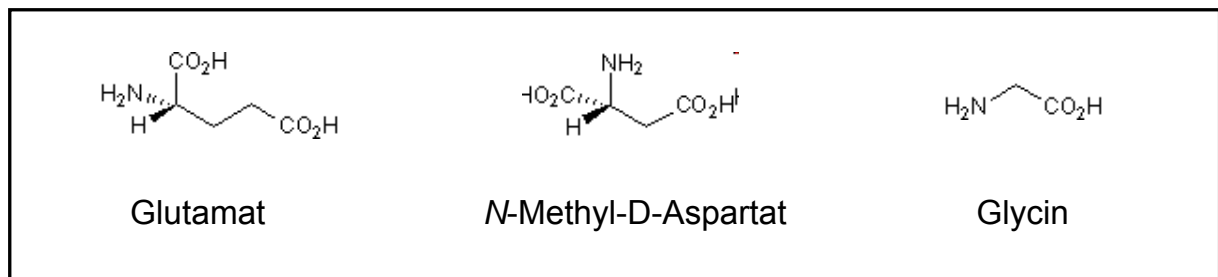


Abb. 7: Strukturformeln von Glutamat, Aspartat und Glycin.

Liganden der allosterischen Bindungsstellen modulieren meist die Funktion des Rezeptors. Innerhalb des Kanals befindet sich neben der Bindungsstelle für Magnesiumionen auch noch eine Bindungsstelle für *open-channel*-Blocker, die MK-801-Bindungsstelle. Außerhalb des Kanals sind weitere Bindungsstellen für Magnesiumionen, für Zinkionen, Protonen, Polyamine und Redox-Modulatoren bekannt (DINGLELINE et al. 1999; CULL-CANDY et al. 2001). Neurosteroid, Peptide (z. B. Dynorphin) und Ethanol beeinflussen ebenfalls den NMDA-Rezeptor (LYNCH u. GUTTMANN 2001). NMDAR-Antagonisten können in vier Kategorien eingeteilt werden. Kompetitive Antagonisten binden an die Glutamat-Bindungsstelle (Glu-B, s. u.) und hindern somit Glutamat an der Bindung an den NMDAR. Glycin-Antagonisten agieren auf dieselbe Art an der Glycin-Bindungsstelle (Gly_B-B, s. u.), während nicht-kompetitive Antagonisten eine Blockade des Rezeptors mittels Bindung an dessen allosterische Bindungsstelle hemmen. Weiterhin existieren Antagonisten, welche im Inneren des NMDAR binden und so den Ionenkanal selbst blockieren (XIA et al. 1995).

Liganden der Glutamat-Bindungsstelle:

Die Glutamat-Bindungsstelle (Glu-B) befindet sich auf den NR2-Untereinheiten, wobei die vier verschiedenen NR2-Untereinheiten (A-D) unterschiedliche Affinitäten für Glutamat aufweisen (LYNCH u. GUTTMANN 2001). Nicht nur Glutamat, sondern auch die endogene exzitatorische Aminosäure Aspartat und die synthetische Aminosäure *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA) wirken agonistisch an der Glu-B, beide allerdings mit geringerer Affinität als Glutamat. NMDA weist eine hohe Selektivität für den NMDA-Rezeptor gegenüber den anderen Glutamat-Rezeptoren auf und wurde so zum namensgebenden Liganden (BRAUNER-OSBORNE et al. 2000).

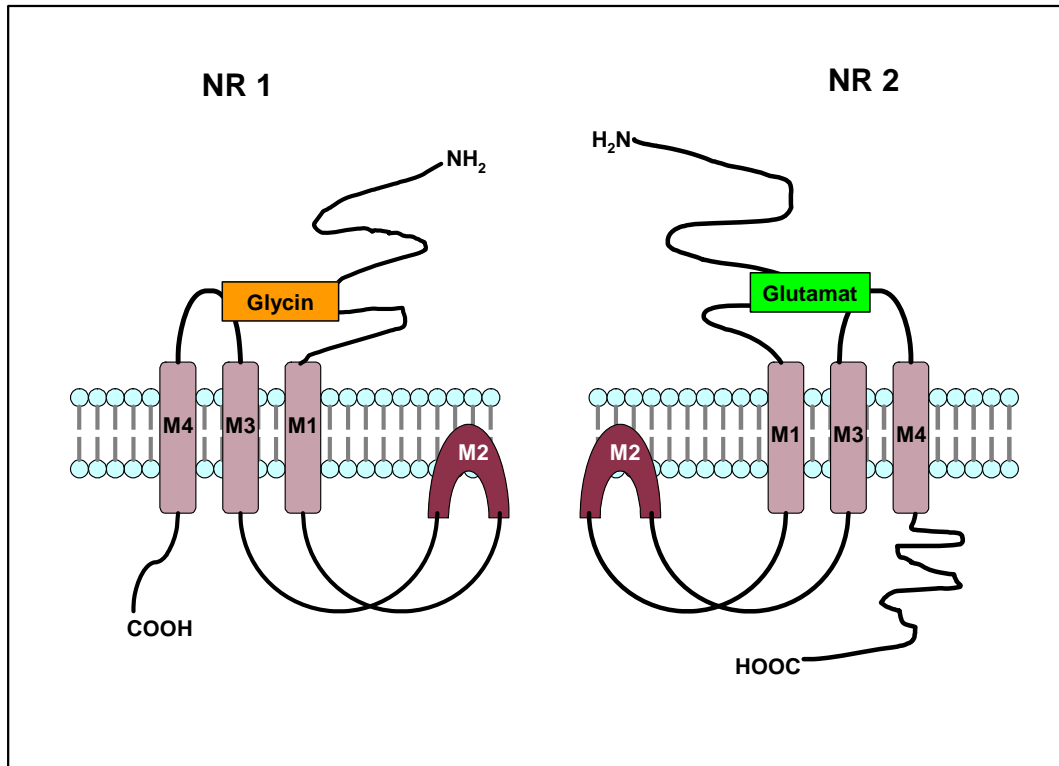


Abb. 8: Topologie des NMDA-Rezeptors, modifiziert nach NAKANISHI (1998).

Es wurde eine Reihe von Antagonisten der Glu-B synthetisiert, die kettenverlängerte Strukturanaloga des endogenen Liganden sind. Diese Substanzen sind wichtige pharmakologische Werkzeuge, haben aber nur einen geringen therapeutischen Nutzen. Teilweise wurden Studien in Phase III der klinischen Testung abgebrochen, aufgrund starker zentralnervöser Nebenwirkungen (z. B. Halluzinationen, Verwirrtheit) und aufgrund geringer therapeutischer Wirkung. Die starken zentralnervösen Nebenwirkungen werden bei nahezu allen Glutamat-Antagonisten beobachtet (BENCE et al. 2000; PALMER 2001).

Liganden der Glycin-Bindungsstelle:

Die Glycin-Bindungsstelle (Gly_B-B) des NMDA-Rezeptors unterscheidet sich pharmakologisch von der Strychnin-sensitiven Glycin-Bindungsstelle (Gly_A-B) des inhibitorischen Glycin-Rezeptors und ist Strychnin-insensitiv (DANYSZ u. PARSONS 1998). Die Gly_B-B befindet sich auf der NR1-Untereinheit (LYNCH u. GUTTMANN 2001). Neben Glycin wirkt auch D-Serin als endogener Agonist, vor allem in Hirnregionen, in denen nur geringe Glycin-Konzentrationen vorhanden sind (BARANANO et al. 2001). Die Affinität von Glycin zur Bindungsstelle wird von den

NR2-Einheiten beeinflusst, die mit NR1 den Rezeptorkomplex bilden (LYNCH u. GUTTMANN 2001). Neben einer großen Anzahl von Glycin-Antagonisten wurden auch einige Agonisten und partielle Agonisten entwickelt, da man bei verschiedenen psychischen Erkrankungen (Schizophrenie, Depression) eine Hypoaktivität des NMDA-Rezeptors vermutet (STARK et al. 2000). Glycin-Antagonisten, aber auch Agonisten, haben deutlich bessere Nebenwirkungsprofile als die entsprechenden Glutamat-Liganden (KATAYAMA et al. 2001). Kynurensäure, ein Metabolit der Aminosäure Tryptophan, wurde 1988 als endogener Antagonist an der Gly_B-B identifiziert. Die neuroprotektive Wirkung der Kynurensäure konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen (z. B. Kindling-Modell) nachgewiesen werden (MACIEJAK et al. 2009; VAMOS et al. 2009). Allerdings weist Kynurensäure eine geringe Selektivität und Affinität für den NMDAR auf, aber durch weitreichende Strukturmodifikationen wurde eine Reihe von strukturell verschiedenen, selektiven und hochaffinen Glycin-Antagonisten hergestellt, die zu affineren und selektiveren Kynurensäure-Derivaten führten (z. B. L-689,560 und Gavestinel). Die neuen Substanzen wiesen zwar gute *in-vitro*-Ergebnisse auf, aber nur geringe oder keine Wirksamkeiten *in-vivo*, was auf die geringe Penetration der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zurückzuführen ist (KATAYAMA et al. 2001).

Für die schlechte ZNS-Gängigkeit wurde die Carboxy-Gruppe der beiden Substanzklassen verantwortlich gemacht (FRAY et al. 2001). Dies führte zur Entwicklung der 4-Hydroxychinolin-2-one, bei denen die Carboxy-Gruppe durch eine Carbonyl-Funktion ersetzt wurde (L-701,324) (STONE 2000). Es existiert eine Vielzahl weiterer Antagonisten des NMDAR, die an dessen Gly_B-B angreifen, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

Laut aktuellem Forschungsstand versprechen NMDAR-Antagonisten der Gly_B-B einen großen therapeutischen Nutzen für verschiedene ZNS-Erkrankungen, wie zum Beispiel Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma, Morbus Alzheimer (MATTSON et al. 1992; ARIAS et al. 1995) und Morbus Parkinson (LOSCHMANN et al. 1991), Depressionen (SKOLNICK 2002) und Epilepsie (KOHL u. DANNHARDT 2001; JANSEN u. DANNHARDT 2003). Auch was das Nebenwirkungsprofil angeht, sind die Glycin-Antagonisten gegenüber den Substanzen, die an der Glu-B des NMDAR angreifen, weit überlegen. Die Wirkung verschiedener Glycin-Antagonisten auf deren antikonvulsive und neuroprotektive Wirkung wurde bereits in verschiedenen Tierversuchen getestet. So zeigte der Gly_B-Antagonist 5,7-DiCK in einem SE-Modell

eine bessere antikonvulsive und neuroprotektive Wirkung als Diazepam oder Phenytoin (MAZARATI u. WASTERLAIN 1999). Auch SM-31900, eine Substanz mit hoher Selektivität und Affinität für die Gly_B-B des NMDAR, konnte die Anfallsentstehung und -ausbreitung in Ratten nach intravenöser Gabe von NMDA reduzieren (OHTANI et al. 2002).

2.4 MODELLE ZUR UNTERSUCHUNG VON PATHOPHYSIOLOGIE UND PHARMAKOTHERAPIE VON EPILEPSIEN

2.4.1 Einführung

Mit Validität (von lat. *validus*: *kräftig, wirksam*; engl. „validity“, Gültigkeit) wird das argumentative Gewicht einer wissenschaftlichen Aussage, Untersuchung oder Theorie bezeichnet.

Wird Wissenschaft als System zur Erzeugung und Verfeinerung von Annahmen über Ursache-Wirkungs-Zusammenhänge verstanden, bezeichnet Validität die Gültigkeit bzw. Belastbarkeit dieser Annahmen (LIENERT u. RAATZ 1998). Im Rahmen empirischer Untersuchungen bezieht sich Validität aber auch auf die Güte der Operationalisierung der in den Kausalmodellen beschriebenen einzelnen Faktoren, den Konstrukten.

Validität ist also einerseits die Belastbarkeit der Operationalisierung („Inwieweit misst das Testinstrument das, was es messen soll?“), andererseits die Belastbarkeit der auf den Messungen beruhenden Aussagen oder Schlussfolgerungen („Inwieweit trifft es zu, dass X Y beeinflusst?“).

Bezogen auf die Anforderungen an ein optimales Modell einer Erkrankung bedeutet das, dass dieses zum einen die verhaltensmäßigen Charakteristiken der Störung in allen Bereichen widerspiegeln sollte, dem Modell also dieselbe Pathophysiologie zugrunde liegt, wie der Erkrankung selbst (Augenscheinvalidität) (LIENERT u. RAATZ, 1998).

Zum anderen sollten dem Modell dieselben Ursachen für die entsprechende Erkrankung zugrunde liegen, z. B. ein Schädel-Hirn-Trauma (Konstruktvalidität). Prädiktive Validität hat ein Test dann, wenn Prognosen, die er vorhersagt, dann auch tatsächlich in hinreichendem Maße eintreffen (z. B. hinsichtlich Therapieerfolg, Rezidivgefahr, Vorliegen einer bestimmten Erkrankung bei positivem Screeningergebnis etc.) (KUBOVA u. MOSHE 1994).

2.4.2 *In-vivo*-Modelle

Allgemeines:

An ein Tiermodell einer Erkrankung werden drei grundlegende Ansprüche gestellt. Zum einen sollten die Symptome im Modell denen der Erkrankung ähneln (Augenscheinvalidität), zum anderen sollte dem Modell und der Erkrankung der identische Pathomechanismus zu Grunde liegen (Konstruktvalidität). Des Weiteren sollte das Modell prädiktiv für die klinische Wirksamkeit von Arzneimitteln sein (prädiktive Validität). Epilepsiemodelle können in akute (Anfallsmodelle) und chronische Modelle (Epilepsiemodelle im engeren Sinne) eingeteilt werden (Abb. 9). Dabei können Anfälle chemisch oder elektrisch induziert werden.

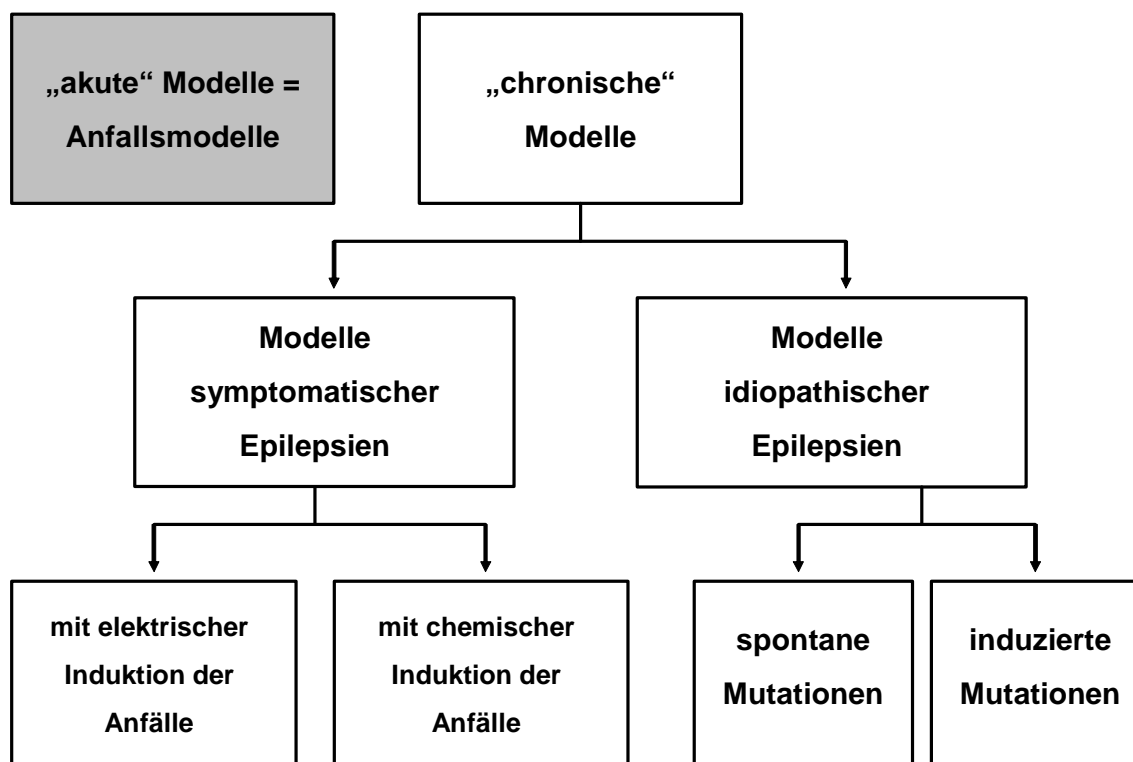


Abb. 9: Schematische Darstellung der in der Epilepsieforschung verwendeten Tiermodelle.

Bei den Anfallsmodellen treten ohne elektrische oder chemische Induktion keine Anfälle auf. Die zwei wichtigsten Tiermodelle in diesem Bereich sind der „Maximale-Elektroschock-Test“ (FISHER 1989), bei dem akut ein primär generalisierter tonisch-klonischer Anfall durch elektrische Korneal-Stimulation ausgelöst wird, und

der „Pentylentetrazoltest“ (DALBY u. NIELSEN 1997), der durch Verabreichung einer bestimmten Menge von Pentylentetrazol akute Myoklonien und klonische Krämpfe auslöst. Die zu testenden Substanzen werden auf ihre antikonvulsive Wirkung geprüft. Die genannten Modelle sind nicht geeignet, die pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese zu untersuchen. Sie können lediglich zur Erforschung von akuten Anfällen dienen (LOSCHER 1997).

Epilepsiemodelle im engeren Sinne stellen hingegen die klinische Situation nach, bei der Patienten z. B. durch ein Schädel-Hirn-Trauma oder in Folge eines SE eine TLE entwickeln. Tierexperimentelle Modelle, bei denen ein SE ausgelöst wird, können als SE-Modell und als Post-SE-Modell verwendet werden und bieten somit die Möglichkeit, den SE und die Epileptogenese, also den Krankheitsprozess bis zur Manifestation der Epilepsie, sowie den Krankheitskomplex der Epilepsie an sich zu untersuchen. Ein weiteres chronisches Epilepsie-Modell ist das Kindling-Modell, bei dem durch wiederholte elektrische Stimulation epileptische Anfälle ausgelöst werden, die zu chronischen Gehirnveränderungen führen. Spontane epileptische Anfälle können auch im Kindling-Modell nach ausreichend häufiger Stimulation bei gekindelten Tieren (im Mittel ca. 200 Stimulationen) auftreten (PINEL u. ROVNER 1978b).

Trotz einer großen Anzahl von Antiepileptika ist eine erfolgreiche Therapie der TLE oft schwer oder überhaupt nicht zu erreichen. Dieser „Therapienotstand“ kann darauf begründet sein, dass neue Substanzen häufig anhand von Tiermodellen getestet werden, die für andere Anfallsformen prädiktiv sind (LOSCHER et al. 1986). Die Mechanismen der Pharmakoresistenz und der Epileptogenese für komplex-fokale Anfälle lassen sich mittels genetischer Modelle (z.B. epileptische Hunde [LOSCHER 1997]), chemischer Tiermodelle, wie z.B. Kainsäure (BEN-ARI et al. 1981) und Pilocarpin (HONCHAR et al. 1983) und mit dem Kindling-Modell (GODDARD et al. 1969; MCNAMARA et al. 1980) untersuchen.

Amygdala-Kindling-Modell

Das Kindling-Modell gehört zu den chronischen Epilepsiemodellen, in denen Anfälle elektrisch induziert werden. Die Tiere entwickeln ohne diese Induktion keine spontanen Anfälle.

Die Arbeitsgruppe des Psychologen Graham Goddard entwickelte im Jahr 1969 das Kindling-Modell an Ratten (GODDARD 1969). Das „Kindling“ (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 (BLA) gesetzt (PINEL u. ROVNER 1978a). Die wiederholten subkonvulsiven, elektrischen Stimulationen führen zu epileptischen Anfällen, die bei weiteren Stimulationen an Schwere und Dauer zunehmen (GODDARD et al. 1969).

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).

Neuere Überlegungen gehen davon aus, dass durch den Kindling-Prozess ein Teil der Latenzzeit widergespiegelt wird, 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 et al. 1969), die schließlich, bei ausreichender Anzahl von Stimulationen, auch zur Ausbildung spontaner Anfälle führt (PINEL 1981).

Das Kindling-Modell als Modell der chronischen TLE weist eine herausragende prädiktive Validität für den Nachweis prokonvulsiver oder antikonvulsiver Arzneimitteleffekte auf (POTSCHKA et al. 2000; LOSCHER 2002; MCINTYRE u. GILBY 2009). Dabei wird so vorgegangen, dass vollgekindelten Tieren die Testsubstanz verabreicht wird und anschließend die Stromstärke ermittelt wird, die bei dem Tier einen Anfall auslöst. Dabei wird die Stromstärke schrittweise erhöht. Schließlich können die für das Auslösen eines Anfalls notwendigen Stromstärken unter An- und Abwesenheit der Testsubstanz verglichen werden.

Durch eine Schwellenbestimmung können Arzneimitteleffekte während der chronischen Phase der Epilepsie untersucht werden. Möchte man jedoch die Wirkung einer Testsubstanz auf den Prozess der Epileptogenese evaluieren, so kann diese Substanz beispielsweise während des „Aufkindelns“ verabreicht werden. Weiterhin kann während der Arzneimittelgabe über einen bestimmten Zeitraum

wiederholt (z.B. fünfmal am Tag im Abstand von einer Stunde über zehn Tage) mit einer definierten Stromstärke stimuliert werden (sogenanntes „*Massive Kindling*“).

2.4.3 *In-vitro*- und *ex-vivo*-Modelle

Allgemeines:

Die hier beschriebenen *in vitro*-Modelle beziehen sich auf die Untersuchung der Pharmakoresistenz bei chronischer Epilepsie. Sie sind allesamt Modelle der BHS, die Untersuchungen des Transportes von Substanzen aus dem Blut ins Gehirnparenchym zulassen. Dazu zählen unter anderem verschiedene Zellkultur-Modelle und die isolierten Gehirnkapillaren. Die Zellkultur-Modelle können wiederum in Primärkulturen und Zell-Linien unterteilt werden.

Zellkulturen:

Primärkultur aus isolierten Gehirnkapillar-Endothelzellen:

Prinzipiell können für das Primärkultur-Modell Gehirnkapillar-Endothelzellen (*brain capillary endothelial cells* = BCEC) aus den Gehirnen von beispielsweise Rindern, Schweinen, Ratten, Mäusen oder Menschen verwendet werden (SIKOTOS 1974; WU et al. 2003). Die Isolation kann dabei enzymatisch, mechanisch oder als Kombination beider Methoden erfolgen. Je nachdem worauf die Zellen zu einem Monolayer kultiviert werden, ergibt sich im Anschluss die Möglichkeit zu unterschiedlichen Experimenten. Aufnahmeexperimente von Substanzen in die Endothelzellen können durchgeführt werden, wenn die BCEC in Kulturschalen gezüchtet werden. Werden die Endothelzellen hingegen auf feinporösen Membranfiltern, sogenannten *Transwell*-Filtern, kultiviert, können Transportexperimente durchgeführt werden.

Auch wenn das Gehirn von großen Tieren (Rind, Schwein) als Ausgangsmaterial verwendet wird und man pro Gehirn eine recht hohe Zahl an isolierten Zellen erhält, erfordert eine Primärkultur jedoch immer eine häufige und umfangreiche Isolierung des Zellmaterials, da die primären BCEC sehr kurzlebig sind und die Anzahl an Zellpassagen begrenzt ist. Dies ist nicht nur zeitaufwendig sondern auch teuer.

Ein weiterer, entscheidender Nachteil des Primärkultur-Modells ist, dass kultivierte und zu Monolayern gezüchtete primäre BCEC ein anderes Verhalten aufzeigen als BCEC *in-vivo*, auch wenn eine Kultur mit Primärzellen der *in-vivo*-Situation generell näher kommt, als Kulturen immortalisierter Zelllinien. Wichtige Markerenzyme der BHS wie die γ -Glutamyl-Transpeptidase und die Alkalische Phosphatase sowie der Endothelzellmarker „von Willebrand Faktor“ werden in Kultur herunterreguliert (WILLIAMS et al. 1980; MEYER et al. 1990).

Wesentlich ist vor allem auch, dass bei der Kultivierung der Endothelzellen die *tight junctions* nicht mehr in dem Maße ausgebildet werden und dicht sind, wie es für die BHS *in-vivo* charakteristisch ist (TAKAKURA et al. 1991). Dies konnte durch Messungen des tranepithelialen elektrischen Widerstandes (*tranepithelial electrical resistance*, TEER) bestätigt werden (ERBEN et al. 1995).

Zell-Linien:

Als Alternative zu den häufigen und teuren, für Primärkulturen notwendigen, Isolierungen, versuchte man, *in-vitro*-Modelle auf der Grundlage von Zell-Linien zu etablieren.

Zell-Linien werden entweder durch Immortalisierung normaler Zellen oder aus Tumorzellen gewonnen. Gegenüber den primären BCEC besitzen sie den entscheidenden Vorteil, dass man sie zum einen leichter passagieren kann, wodurch sich die Zahl der zeitaufwendigen Isolierungen der Primärzellen verringern lässt. Zum anderen verändern sich ihre Eigenschaften während der Kultur nicht in dem Maße, wie die der kultivierten BCEC. So lassen sich Versuche leichter standardisieren. Im Vergleich zu primären BCEC sind immortalisierte Zellen weniger empfindlich.

Eine inzwischen sehr gut charakterisierte Zell-Linie sind die RBE4-Zellen. Sie entstanden aus Ratten-Gehirn-Endothelzellen. Diese exprimieren sowohl γ -Glutamyl-Transpeptidase als auch Alkalische Phosphatase sowie Pgp, jedoch scheint diese Zell-Linie zu durchlässig zu sein, um als generelles *in-vitro*-Modell der BHS eingesetzt werden zu können (BEGLEY et al. 1996).

Trotz der Vorteile, die sich durch eine Verwendung von Zelllinien bieten, zeigen die immortalisierten Zellen entscheidende Unterschiede bezüglich der Expressierung von BHS-Charakteristika und weisen in der Regel eine höhere Permeabilität als die BHS *in-vivo* und Primärkulturen auf (WEGENER et al. 1996).

Isolierte Kapillaren:

Neben den Zellkultur-Modellen stehen isolierte Kapillaren als *ex-vivo*-Modell der BHS zur Verfügung. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass nicht erst der intakte Gewebeverband bei der Isolierung der einzelnen Endothelzellen zerstört wird, und anschließend die Zellen wieder in Kultur zu einem konfluenten Monolayer herangezüchtet werden müssen. Der Gewebeverband der Kapillaren bleibt bei diesem Modell intakt, ist also morphologisch der *in-vivo*-Situation sehr ähnlich (G. W. GOLDSTEIN et al. 1986a; TAKAKURA et al. 1991). Ebenso entfällt der Nachteil, dass wichtige Charakteristika der BHS – wie die Dichtigkeit der *tight junctions* – während der Kultivierung nachteilig verändert werden. Denn auch wenn man versucht, die Dichtigkeit der *tight junctions* durch Co-Kultur mit anderen Zellen oder durch Verwendung von Astrozyten-konditioniertem Medium positiv zu beeinflussen, wird die *in-vivo*-Situation immer nur annähernd wiedergespiegelt (G. W. GOLDSTEIN et al. 1977).

Da in dieser Arbeit insbesondere der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Regulation der Pgp-Expression an der BHS untersucht werden soll, ist das funktionelle Vorhandensein von Pgp im BHS-Modell für die Versuche essentiell. In der Literatur finden sich Anzeichen, dass die funktionelle Expression von Pgp in kultivierten BCEC nicht nur von den jeweiligen Kulturbedingungen abhängt, sondern auch insgesamt schwächer ist als in frisch isolierten Kapillaren (JETTE et al. 1993). So wiesen GAILLARD et al. (2001) mittels Western Blot nach, dass Pgp in frisch isolierten Kapillaren sehr stark exprimiert wird, in kultivierten BCEC hingegen schwächer.

LECHARDEUR und SCHERMAN (1995) fanden weiterhin, dass Pgp in Kultur mit einem geringeren Molekulargewicht exprimiert wird. Sie vermuteten, dass Pgp unter Kulturbedingungen veränderte posttranslationale Modifikationen aufweist. Durch die Verwendung von frisch isolierten Kapillaren als *ex-vivo*-Modell wird eine mögliche Veränderung von Pgp unter Kulturbedingungen oder gar ein eventuelles Herunterregulieren vermieden, so dass auch in diesem Punkt die isolierten Kapillaren der *in-vivo*-Situation ähnlicher sind als Zellkultur-Modelle. Für die Untersuchung von Transzytose-Prozessen sowie für Aufnahmestudien eignen sich isolierte Gehirnkapillaren weniger, da die zu untersuchende Substanz von der Gehirnseite aus, also

der abluminalen/basolateralen und nicht wie unter *in-vivo*-Bedingungen von der luminalen Seite aus anflutet.

Sekretorische Prozesse, insbesondere die Untersuchung der Exportproteine an der BHS, können hingegen sehr gut untersucht werden, da sich die zu untersuchende Substanz durch Sekretion im Lumen der Kapillare anreichern kann.

Bezüglich der Methode der Kapillarisolierung aus Gehirngewebe werden in der Literatur enzymatische (KONDO et al. 1994; GAILLARD et al. 2001) und mechanische (PARDRIDGE et al. 1987; NOBMANN et al. 2001) Ansätze beschrieben. Dabei wurden als Ausgangsmaterial bisher insbesondere die Gehirne von Schlachttieren (Schwein, Rind) (SESSA et al. 1976; NOBMANN et al. 2001; BAUER et al. 2004) oder Nagern (Maus, Ratte) verwendet (WEIDENFELLER et al. 2005; ZIBELL et al. 2009).

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Basierend auf einer Vielzahl von Forschungsdaten lässt sich vermuten, dass Schlüsselfaktoren, die in die Signaltransduktionskaskade des Pgp eingreifen, neue Zielstrukturen in der Wiederherstellung der Pharmakosensitivität bei therapieresistenter Epilepsie sein könnten. Zu diesen Zielstrukturen gehören Faktoren der Arachidonsäurekaskade, wie der PGE₂-Rezeptor EP1 oder das antiinflammatorische Enzym COX-2. Darüber hinaus ist bereits bewiesen, dass eine Modulation des EP1-Rezeptors und der COX-2 einen Schutz vor exzitatorisch bedingter neuronaler Zellschädigung bietet. Die notwendigen weiterführenden Entwicklungen entsprechender therapeutischer Ansätze verlangen genauere Untersuchungen zu Verträglichkeit und Medikamentensicherheit dieser Substanzen. Zusätzlich zu peripheren Nebenwirkungen, die aufgrund des Eingreifens an den spezifischen Zielstrukturen auftreten können, muss möglichen Nebeneffekten, die sich auf Anfallsschwelle und Anfallsentstehung auswirken könnten, Beachtung geschenkt werden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine subchronische Behandlung mit dem EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 während eines *Massive-Kindling*-Versuches die Anfallsentstehung bei einer überschwelliger Stimulation, wie sie in diesem Modell durchgeführt wurde, nicht veränderte. Dennoch wurde durch diese Daten nicht eindeutig bewiesen, ob sich eine Behandlung mit SC-51089 möglicherweise auf die Anfallsschwellen oder die Anfallsentstehung unter einer Schwellenstimulation, die die chronische Phase der Epilepsie widerspiegelt, auswirkt. Deshalb sollte mit dieser Studie die Bedeutung eines Antagonismus am EP1-Rezeptor in Mäusen in einem Amygdala-Kindling-Modell weiter untersucht werden. Das Modell wurde aufgrund seiner hervorragenden prädiktiven Validität für Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen wie die TLE ausgewählt, da es den Nachweis anti- und prokonvulsiver Effekte erlaubt. Zwar existiert eine Vielzahl an Studien zur Wirkung von COX-2-Inhibitoren auf die Anfallsentstehung und -ausbreitung, jedoch stehen diesbezüglich kaum Forschungsdaten für einen EP1-Rezeptor-Antagonismus zur Verfügung. COX-2-Inhibitoren wurden bereits vielfältig in unterschiedlichen Variationen und Selektivitätsmerkmalen in diversen Nagernmodellen

eingesetzt. Die meisten dieser Studien konzentrierten sich auf die Effekte der COX-2-Inhibition in Modellen mit akuten Anfällen bzw. SE-Modellen, in denen die Anfälle in naiven Tieren ausgelöst wurden. Obwohl die Mehrzahl der Untersuchungen positive Effekte einer COX-2-Hemmung, wie z. B. eine Abschwächung der Anfallsentwicklung, hervorbrachten, oder zumindest eine ausbleibende Wirkung dieser Inhibition erkennen ließen, wurde wiederum in wenigen Studien eine Verstärkung der Anfälle und Absenkung der Anfallsschwelle durch eine COX-2-Hemmung beschrieben. Jene Studien führten zu Bedenken, eine Weiterentwicklung der COX-2-Inhibitoren in klinischen Studien für den Einsatz in der Therapie von Pharmakoresistenz voranzubringen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Wirkung einer COX-2-Hemmung auf die Anfälle in einem chronischen Modell, wie dem Amygdala-Kindling-Modell, gründlich zu prüfen.

Ob der EP1-Rezeptor-Antagonist SC-51089 oder die COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398 die Anfallsparameter beeinflussen können, soll an voll-gekindelten Mäusen untersucht werden. Um die Rolle des EP1-Rezeptors bei der Anfallsgenerierung noch weiter zu evaluieren, sollen zusätzlich die Effekte des PGE₂-Analogons Misoprostol als EP1-Rezeptor-Agonist untersucht werden.

Neben der tierexperimentellen Prüfung neuer Substanzen, die einen positiven Effekt auf die Verhinderung einer Pharmakoresistenzbildung oder auf die Wiederherstellung einer Pharmakosensitivität haben könnten, ist es wichtig über ein *in-vitro*-Modell, das die anatomischen, morphologischen und vor allem funktionellen Eigenschaften der BHS besitzt, zu verfügen. Die Ansprüche, die an ein solches Modell gestellt werden, sind insbesondere die Widerspiegelung der Situation *in-vivo*, eine einfache und reproduzierbare Handhabung, sowie die Möglichkeit, interspezies-spezifische Unterschiede in Vergleich bringen zu können.

Ein solches Modell der BHS soll in dieser Arbeit anhand von isolierten Gehirnkapillaren von Schwein, Ratte, Maus und Mensch etabliert werden.

Folgende Erkenntnisse über die Qualität des neuen *ex-vivo*-Modells sollen in dieser Arbeit getroffen werden:

- Ist es generell möglich, aus Gehirngewebe vitale und funktionsfähige Kapillaren zu isolieren und welche Technik liefert das beste Ergebnis?
- Können die isolierten Kapillaren in eine Form gebracht werden, in der Untersuchungen der BHS leicht und präzise durchgeführt werden können?

An dem Modell soll eine Modulation der Arachidonsäurekaskade und deren Bedeutung für die Entstehung und Überwindung einer transporterbedingten Pharmakoresistenz durchgeführt werden. Diese Untersuchungen könnten in Zukunft den tierexperimentellen Studien vorangeschaltet werden, was im Sinne des 3-R-Konzeptes („Reduction“, „Replacement“ und „Refinement“ von Tierversuchen) besonders die Quantität der Tierversuche reduzieren, sowie einen Beitrag zur grundlegenden Erforschung der Funktion und Aktivität der Transporter der BHS leisten könnte.

An isolierten Schweinekapillaren sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Kann eine Induktion der Pgp-Expression und – Aktivität durch das experimentelle Nachstellen eines Anfalls erreicht werden?
- Lässt sich diese Induktion durch die Modulation verschiedener Zielstrukturen der Signaltransduktionskaskade des Pgp beeinflussen?

Sollte es gelingen, aus epilepsiechirurgischen Resektaten Gehirnkapillaren zu isolieren und an diesen Untersuchungen zur individuellen Situation der Effluxtransporter an der BHS der Humanpatienten durchzuführen, eröffnet dies, auch in Kombination mit einer genetischen Diagnostik und den klinischen Befunden dieser Patienten die Möglichkeit zum Gewinn neuer Erkenntnisse zum Verständnis der Entstehung und Überwindung von Pharmakoresistenz bei chronischen Epilepsien.

Diese Arbeit soll an den humanen Gehirnkapillaren folgende Fragestellungen behandeln:

- Lässt sich eine anfallsbedingte Induktion der Pgp-Expression und - Aktivität erzielen?
- Kann diese Induktion durch das Eingreifen in die Arachidonsäurekaskade moduliert werden?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPEN-EPILEPSIE

Es wurden die akuten Effekte von SC-51089, Misoprostol, NS-398 und Celecoxib auf die epileptischen Anfälle bei vollgekindelten Mäusen im Amygdala-Kindling-Modell untersucht. Dabei wurden Anfallsschwelle, -dauer und -stärke sowie die Dauer der postiktalen Phase erfasst.

Die Prüfung der einzelnen Substanzen erfolgte an einer Tiergruppe mit wiederholter Bestimmung der Anfallsschwellen. Dabei ging jedem Substanztest ein Vehikeltest voraus. Zwischen den Vehikeltests und den Substanzversuchen lagen jeweils mindestens zwei Tage.

4.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen der Effekte von SC-51089, Misoprostol, NS-398 und Celecoxib im Amygdala-Kindling-Modell wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-58-07) durchgeführt. Für die Versuche wurden männliche HsdWin:NMRI Mäuse (Harlan Laboratories GmbH, Eystrup) verwendet. Die Tiere wogen bei der Anlieferung 22-25 g. Sie wurden in Makrolonkäfigen Typ III während der gesamten Versuchsdauer einzeln gehalten. Als Einstreu der Käfige diente Weichholzgranulat. Die Mäuse erhielten Standardfutter und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Einmal in der Woche wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass dies stets ein bis zwei Tage vor den Versuchen stattfand, um eine Beunruhigung der Mäuse direkt vor dem Experiment zu vermeiden. Jeder Maus stand ein Haus aus rotem Makrolon als Versteckmöglichkeit zur Verfügung. Die Tiere wurden bei einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (Licht von 7:00 bis 19:00 mitteleuropäische Zeit = MEZ), bei einer Umgebungstemperatur von 20-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Nach der Ankunft

hatten die Tiere bis Versuchsbeginn mindestens sieben Tage Ruhe, um sich an die neuen Bedingungen zu habituieren. Der Beginn der Versuche erfolgte immer zwischen 12:00 und 13:00 MEZ, um zirkadiane Einflüsse möglichst gering zu halten (SMIT u. LANGMAN 1974).

4.1.2 Elektrodenimplantation

Die Implantation der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) erfolgte mittels stereotaktischer Operationstechnik. In einem ersten Schritt wurden die Tiere mit dem Narkotikum Chloralhydrat (400 mg/kg intraperitoneal [i.p.] in 10 ml/kg 0,9%iger NaCl-Lösung) narkotisiert. Zusätzlich wurde eine Lokalanästhesie der Schädelhaut mit 5 ml/kg Bupivacain 2% durchgeführt. Zur exakten Positionierung der Implantate wurden die Mäuse dann in einen stereotaktischen Apparat eingespannt. Für eine punktgenaue Implantation wurde der stereotaktische Atlas von FRANKLIN und PAXINOS (2003) herangezogen. Dieser gibt die Lage der Hirnstrukturen in Bezug auf Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) wieder. Die Oberkieferhalterung wurde auf 0,0 mm ventral 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. 10).

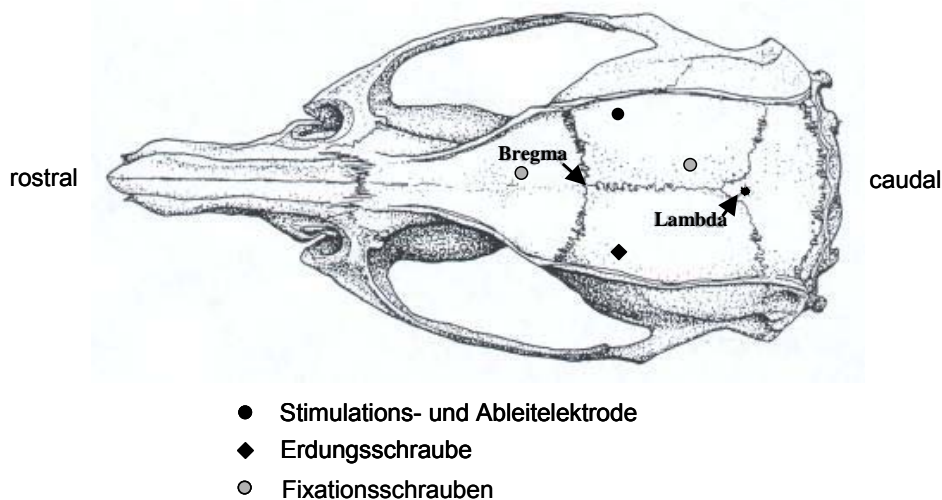


Abb. 10: Aufsicht auf den Mäuseschädel mit Darstellung der Lokalisation der Stimulations- bzw. Ableitelektrode und der Fixationsschrauben. Nach FRANKLIN und PAXINOS (2003).

Die Implantation der Stimulationselektrode in die basolaterale Amygdala erfolgte, basierend auf im Vorfeld durchgeführten Lokalisationsversuchen, im Bereich der rechten Hemisphäre anteriorposterior + 1,0; lateral + 3,2; dorsoventral + 5,3. In Ergänzung zu den beiden Fixationsschrauben wurde gegenüberliegend der implantierten Tiefenelektrode mittels einer Schraube eine indifferente Erdungselektrode am Schädelknochen der Maus befestigt (Abb. 10). 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 verwendet. Auf die Operation folgte eine zweiwöchige Regenerationsphase.

4.1.3 Kindling

Nach Ablauf der Regenerationsphase wurde mit dem Kindling begonnen. Dabei wurde die zu kindelnde Maus mit einem dreipoligen, abgeschirmten, ummantelten Kabel über ihren Steckeraufsatz mit einer Stimulatoreinheit verbunden. Durch eine dazwischengeschaltete „Switchbox“ konnte zeitgleich und kontinuierlich ein Enzephalogramm (EEG) abgeleitet werden. Die Aufzeichnung des EEGs erfolgte über einen Computer mithilfe der Software Chart for Windows. Bei dem Stimulationsstrom handelte es sich um einen monophasischen Rechteckimpuls mit der Dauer von einer Millisekunde und einer Frequenz von 50 Hz für die Gesamtdauer von einer Sekunde.



Abb. 11: Einheit für die Kindling-Stimulation.

Für jedes Tier wurde die initiale Nachentladungsschwelle individuell bestimmt. Der Parameter „Nachentladungsschwelle“ beschreibt die Reizstromstärke in μA , die notwendig ist, um mit dem Stimulationsstrom im EEG ein Nachentladungsmuster von mindestens vier Sekunden und einer mindestens doppelt so hohen Amplitude zur Grundlinie im Basal-EEG auszulösen. Dieses Nachentladungsmuster kann mit motorischer Krampfaktivität oder auch ohne ein motorisch auffälliges Verhalten einhergehen (SATO et al. 1990).

Die Gesamtdauer der Stimulation bei den jeweiligen Stromstärken betrug eine Sekunde. Dabei wurde bei acht μA begonnen. Falls kein Anfall beobachtet wurde, wurde das Tier eine Minute später mit einer höheren Stromstärke stimuliert, wobei sich die Stromstärke jeweils um 20% erhöhte. Die maximale Stimulationsstärke betrug 1440 μA .

Die Einteilung der Krampfschwere der gekindelten Anfälle erfolgte auf einer Skala nach RACINE (1972). Dabei können acht Stadien unterschieden werden (Tab. 3). Krämpfe des Stadiums I-III sind fokale, diese des Stadiums (IV)-V generalisierte Anfälle.

Krampfschwere	Anfallscharakterisitika
Stadium 0	Nachentladungen ohne sichtbare motorische Krampfaktivität. (Als Nachentladungen werden die als Folge der elektrischen Stimulation auftretenden Spikes im EEG bezeichnet.)
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (stereotypes Schnüffeln, Schließen des ipsilateralen Auges)
Stadium II	Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen)
Stadium III	unilateraler Vorderextremitätenklonus
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes $< 45^\circ$
Stadium IV	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes $> 45^\circ$
Stadium (V)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus ohne Aufrichten aber seitlichem Wegdrehen des Rumpfes oder Flexion des Halses
Stadium V	Aufrichten des Rumpfes, bilateraler Vorderextremitätenklonus, Verlust der Stellreflexe (Hintenüberfallen)

Tab. 3: Skala der Krampfstadien modifiziert nach RACINE et al. (1972).

Die Stromstärke, bei der das erste Mal Nachentladungen auftraten, wurde als initiale Nachentladungsschwelle (*Afterdischarge threshold*, ADT) registriert. An den

folgenden Tagen wurden die Tiere immer für eine Sekunde mit der Stromstärke stimuliert, die 20% über der initialen ADT lag (50, 60, 75, 90, 110, 130, 160, 200, 240, 280, 330, 400, 480, 590, 710, 840, 1000 und 1440 μA). Während dieses sog. Kindling-Prozesses wurden folgende Parameter erfasst:

Die Krampfschwere (*seizure severity*, SS), die Krampfdauer (*seizure duration*, SD) und die Nachentladungsdauer (*afterdischarge duration*, ADD).

Die Krampfdauer wurde weiter unterteilt (SD1 und SD2) und beschreibt die Zeit vom Beginn der Stimulation bis zum Ende der sichtbaren Verhaltensänderungen. Die SD1 bestimmt die Dauer der gesamten motorischen Krampfaktivität (fokal und generalisiert). Die SD2 umfasst die gesamte Zeit vom Beginn der Stimulation, die motorische Krampfaktivität inklusive der postiktalen Phase bis zur Normalisierung des Verhaltens der Maus.

Die Nachentladungsdauer, 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 maximal drei Sekunden werden vernachlässigt. Die ADD1 beschreibt in der Regel die Gesamtdauer der auftretenden Spikes. In seltenen Fällen kommt es zu einer Veränderung des Spikemusters im EEG, dann wird die Zeit bis zur Veränderung des Spikemusters als ADD1 und die Gesamtdauer der Nachentladungen als ADD2 bezeichnet.

Diese fünf Parameter wurden in einem Stimulationsbuch protokolliert. Zu jeder Stimulation wurde für jedes Tier ein digitales EEG aufgezeichnet und abgespeichert. Im Verlauf des Kindling-Protokolls nahmen die epileptischen Anfälle der Mäuse von Stimulation zu Stimulation sowohl an Schwere als auch an Dauer zu.

Die Stimulationen wurden beendet, sobald jedes Tier zehn generalisierte Anfälle (Stadium (IV), IV, (V) und V) gehabt hatte, es galt dann als vollgekindelt. Wenn ein Tier keine generalisierten Anfälle entwickelte, wurde es aus dem Versuch herausgenommen, da die Elektrode wahrscheinlich nicht in der BLA saß.

Im Anschluss an den Kindlingprozess schloss sich eine erneute Schwellenbestimmung (postADT) an. Die postADT wurde für jedes Tier jeden zweiten Tag bestimmt, bis die Schwellen nur noch geringgradig voneinander abwichen. Tiere, deren postADTs auch nach mehreren Schwellenbestimmungen (maximal zehn bei jedem Tier) um mehr als drei Schwellen schwankten, wurden aus

dem Versuch ausgeschlossen. Abbildung 12 zeigt den zeitlichen Ablauf des Kindling-Versuchs.

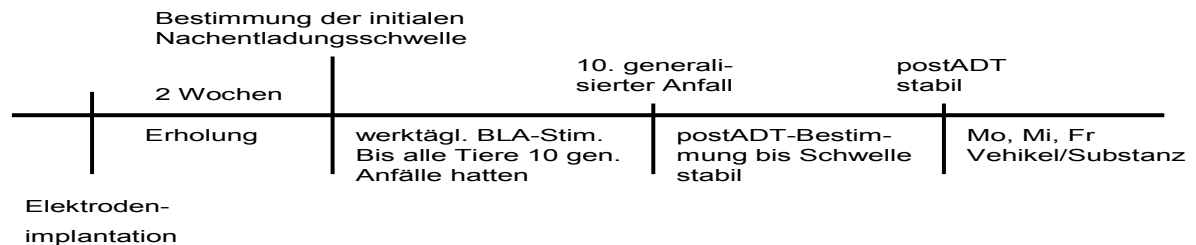


Abb. 12: zeitlicher Ablauf des Kindlingversuchs

4.1.4 Substanzversuche

Nachdem die postADT bei allen am Versuch teilnehmenden Tieren stabil war, wurde mit den Substanzversuchen begonnen. Dabei wurde die jeweilige Substanz injiziert und nach der entsprechenden Vorbehandlungszeit (siehe Tab. 4) mit einer Schwellenbestimmung begonnen. Der Ablauf dieser Schwellenbestimmung entspricht dem der Bestimmung der initialen ADT.

SC-51089 wurde eine Stunde vor Versuchsbeginn in Aqua ad injectabilia (Aq. inj.) gelöst und den Tieren 30 und 60 Minuten vor der Bestimmung der Anfallsschwelle mit einer Dosierung von drei, zehn und 30 mg/kg Körpergewicht (KGW) intraperitoneal (i. p.) appliziert. Zusätzlich wurden 30 mg/kg KGW mit einer Vorbehandlungszeit von 240 Minuten getestet.

NS-398 wurde zwei Stunden vor Versuchsbeginn in 6% Cremophor EL auf dem Magnetrührer bei 35°C gelöst, mit Aq. inj. aufgefüllt und eine Stunde weitergerührt. NS-398 wurde 30 Minuten vor der Bestimmung der Anfallsschwelle mit einer Dosierung von zehn, 30 und 90 mg pro kg KGW i. p. appliziert.

Sieben, zehn und 30 mg Celecoxib pro kg KGW wurden eine Stunde vor Versuchsbeginn in 10% 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, anschließend

mit NaCl aufgefüllt und 30 Minuten vor der Bestimmung der Anfallsschwelle intraperitoneal appliziert.

Misoprostol wurde in Hydroxymethylcellulose/Aqua ad injectabilia gelöst und 45 Minuten vor Bestimmung der Anfallsschwelle mit einer Dosierung von 0,3, 1 und 3 mg/kg KGW subcutan (s.c.) injiziert.

Das Applikationsvolumen betrug für alle Substanzen 10 ml/kg KGW.

Substanz	Vorbereitungszeit in min	Dosierung in mg/kg KGW
SC-51089	30	3, 10, 30
SC-51089	60	3, 10, 30
SC-51089	240	30
NS-398	30	10, 30, 90
Celecoxib	30	7, 20, 30
Misoprostol	45	0,3, 1, 3

Tab. 4: Applikationsschema

Die Versuche fanden an denselben Tieren hintereinander statt. Es wurde immer zwei Tage vor dem jeweiligen Substanzversuch ein Vehikelversuch durchgeführt, in dem den Tieren anstatt der Substanz das entsprechende Lösungsmittel verabreicht wurde. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Versuchen betrug immer zwei bis drei Tage.

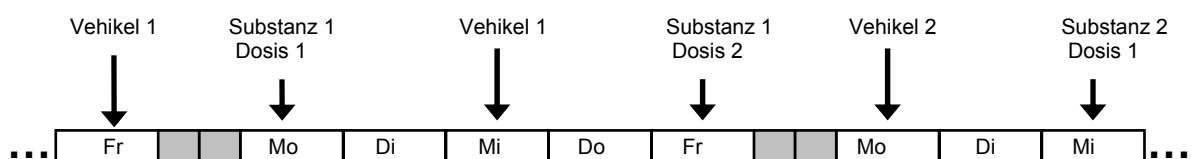


Abb. 13: Zeitablauf der Substanzversuche

Statistische Auswertung:

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angaben der Daten erfolgten im Allgemeinen als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler) oder als Median. Die statistische

Signifikanz der Anfallsdaten im Kindling-Modell wurde mithilfe des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Grundsätzlich wurden alle statistischen Tests zweiseitig durchgeführt. Lediglich wenn aufgrund der bekannten Literatur und den Arbeitshypothesen eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

4.2 UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMECHANISMEN DER ANFALLSINDUZIERTEN EXPRESSION VON P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN

4.2.1 Methodenetablierung

Für einen Ansatz wurden sechs bis acht Gehirnhälften männlicher und weiblicher Mastschweine im Alter von fünf bis sechs Monaten, bezogen vom Schlachthof München, verwendet. Die Gehirnentnahme fand maximal eine Stunde nach dem Töten der Tiere statt.

Die Gehirne wurden auf Eis in Puffer A (siehe Anhang 10.1.1) vom Schlachthof ins Institut transportiert. Mit der Präparation wurde innerhalb von 45 Minuten nach der Entnahme der Gehirne begonnen.

Alle folgenden Arbeiten erfolgten auf Eis.

Es wurden drei unterschiedliche Versuchsansätze zur Etablierung der Methode verfolgt (siehe Tab. 5). Damit man bei den Versuchen, die nach der Isolierung der Kapillaren stattfanden, ein aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis erzielen konnte, mussten die Kapillaren frei von Anlagerungen sein, eine gewisse Länge (>100µm) und Dicke (Durchmesser 5-8 µm, Endotheldicke 1-1,5 µm) sowie ein intaktes Endothel aufweisen. Ebenso musste der Grad der Verschmutzung mit neuronalen und glialen Zellen sowie mit meningealen Gefäßen so gering wie möglich sein. Eine Aufreinigung der Kapillaren kann sowohl mechanisch in Anlehnung an NOBMANN et al. (2001) durch Dichtezentrifugation als auch enzymatisch durch einen Verdau durch proteolytisch wirkende Enzyme erfolgen (EISENBLATTER u. GALLA 2002).

Ausgangsmaterial	Aufreinigung	Methode
Graue Substanz	mechanisch	Dichtezentrifugation
Graue Substanz	mechanisch	Dichtezentrifugation Dispase-II-Verdau
Großhirn	mechanisch enzymatisch	Dichtezentrifugation

Tab. 5: Versuchsansätze zur Methodenetablierung

Für die Dichtezentrifugation wurden zwei Dextran-Lösungen mit Dextranen unterschiedlichen Molekulargewichts (Dextran 1: $M_r \sim 100.000$ Da und Dextran 2: $M_r \sim 6.000$ Da) verwendet. Dextran bildet einen kontinuierlichen Gradienten, in dem Kompartimente ihrer Dichte nach aufgetrennt werden können. Der Anteil des Dextrans, bei dem eine optimale Auftrennung der Kompartimente stattfand, wurde für alle weiteren Isolierungen verwendet (getestete Konzentrationen: 15, 20, 30 und 40%).

Für den enzymatischen Verdau wurde eine Dispase II verwendet. Dieses Enzym greift die Kapillaren, die durch eine sie umgebende Kollagenschicht geschützt sind, nicht an, entfernt aber gliale und neuronale Zellen.

Mechanische Aufreinigung:

Für die Ansätze, in denen ausschließlich die graue Substanz der Großhirnhemisphären verwendet wurde, wurde die graue Substanz mithilfe von Skalpellklingen und Pinzetten von der weißen Substanz abpräpariert und mit der Skalpellklinge in Stücke mit 1 mm Durchmesser zerkleinert. Die Masse der grauen Substanz wog zwischen 20 und 60 g.

Für den Ansatz, in dem das gesamte Großhirn verwendet wurde, trennte man zu Beginn der Präparation Kleinhirn, Hirnstamm sowie sekretorische Gehirnstrukturen von der Großhirnhemisphäre ab. Eine Zerkleinerung erfolgte hier nach Abziehen der Meningen von Hand mithilfe eines Kräuterschneiders.

Die zerhackte Gehirnmasse wurde anschließend nach Zugabe des gleichen Volumens Dextranlösung bei allen Ansätzen im Glashomogenisator durch sechs bis zehn drehende Auf- und Abbewegungen homogenisiert.

Die beiden Ansätze wurden anschließend bei 7000 g und 4°C für 12 min zentrifugiert. So erhielt man drei Schichten: ein rotes Pellet (Kapillarfraktion), darüber eine trübe Lösung und obenauf einen rosaroten Überstand (Gehirnbrei). Trübe Lösung und Überstand wurden verworfen und das Pellet anschließend mit Puffer B (siehe Anhang 10.1.1) resuspendiert.

Enzymatische Aufreinigung:

Hierfür verwendete man das gesamte Großhirn wie oben beschrieben. Das Gehirnhomogenat wurde nach dem Zerhacken mit unterschiedlichen Konzentrationen der Dispase-II-Lösung für 1h bei 37°C inkubiert, eine

Homogenisierung fand nicht statt. Auch hier erfolgte anschließend eine Zentrifugation mit Dextranlösung wie bei den Ansätzen mit mechanischer Aufreinigung.

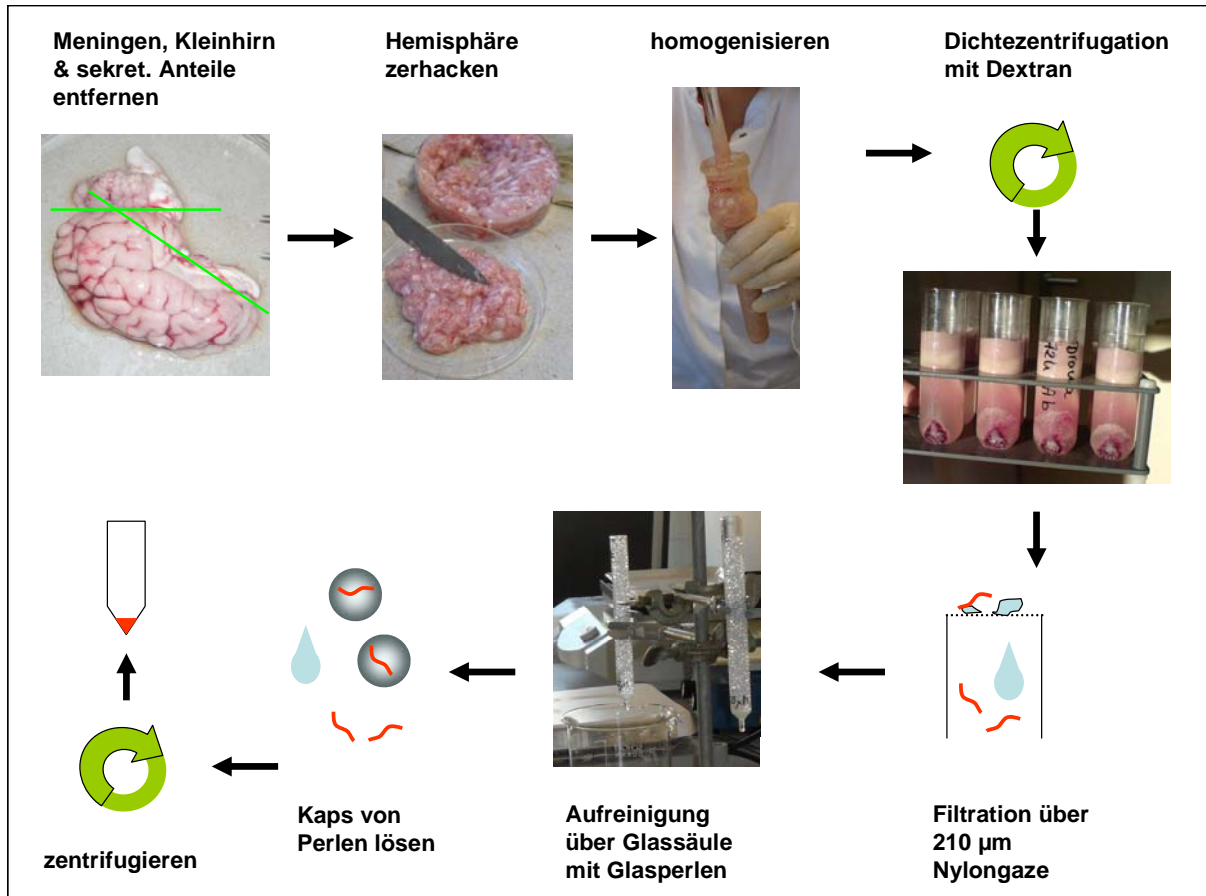


Abb. 14, Ablauf der Kapillarisation

Die weiteren Schritte liefen für alle Ansätze gleichermaßen ab.

Das aus der letzten Dichtezentrifugation resultierende Pellet wurde mit je 5 ml Puffer B resuspendiert. Es schloss sich eine Filtration durch eine 210 µm-Nylongaze an. Die weitere Aufreinigung des Filtrates erfolgte über eine Glasperlensäule, an deren Grund sich die 50 µm Nylongaze befand. Dabei ließ man das Filtrat mit den Kapillaren über die Säule laufen und spülte anschließend mit 400 ml Puffer B. Die Kapillaren hafteten jetzt aufgrund des bovines Serumalbumins (BSA) in Puffer B an den Glasperlen, wohingegen zelluläre Bestandteile über die Säule abflossen.

Nach der Filtration durch die Glassäule wurden die Kapillaren durch vorsichtiges Schwenken in einem Becherglas mit 60 ml Puffer A von den Glasperlen abgelöst, die Flüssigkeit abdekantiert und bei 850 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um

das BSA wieder zu entfernen. Das Pellet wurde mit Puffer A resuspendiert und die Kapillaren zunächst unter dem Lichtmikroskop begutachtet (Abb. 15).

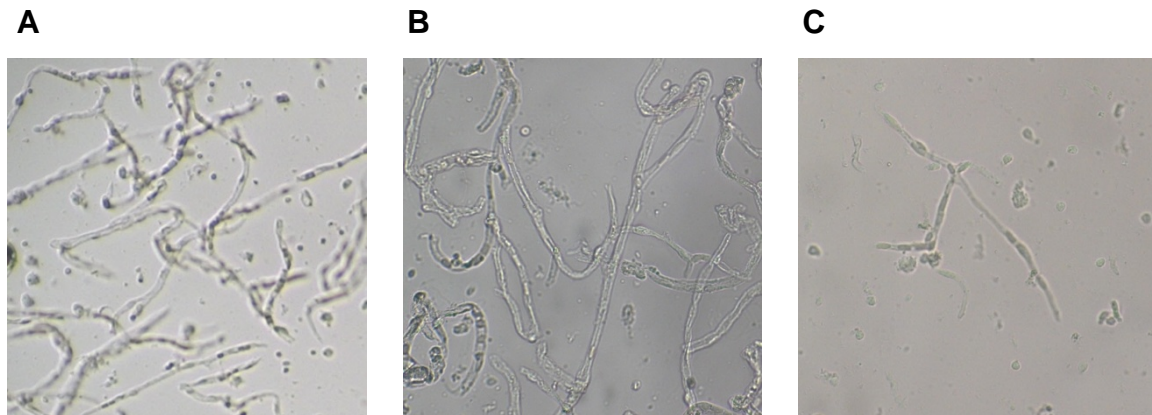


Abb. 15: Porcine (A), humane (B) und murine (C) Gehirnkapillaren nach der Isolation unter dem Lichtmikroskop.

Kapillareisolation bei Mensch und Ratte:

Die Isolation der humanen und murinen Gehirnkapillaren erfolgte analog zu dem mechanischen Ansatz beim Schwein. Als Ausgangsmaterial diente das resezierte Material aus neurochirurgischen Eingriffen (Mengen variierten zwischen 5 und 20 g) bzw. 10 Rattengehirne.

4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Misoprostol:

Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Pgp-Aktivität unter dem Einsatz des PGE₂-Analogons Misoprostol festzustellen, wurden die isolierten Schweinekapillaren zunächst mit drei Konzentrationen (10 nM, 100 nM und 1 µM) behandelt. Direkt im Anschluss an die Isolation wurde die Kapillarsuspension auf sechs Eppendorf-Tubes verteilt, sodass sich in jedem Röhrchen 1ml der Suspension befand.

Ein Ansatz blieb bis zur Aufgabe des NBD-Cyclosporin A (NBD-CSA) unbehandelt. Er stellte die native Kontrolle dar.

Der Ansatz, der als Negativ-Kontrolle dienen sollte, blieb ebenfalls unbehandelt, jedoch wurden die darin befindlichen Kapillaren 15 min vor Aufgabe des NBD-CSA

mit 5 μM PSC-833 (Valspodar) vorinkubiert. PSC-833 hemmt die Transportfunktion des Pgp, sodass sich das NBD-CSA nur Pgp-unabhängig im Kapillarlumen anreichern kann.

Die Positiv-Kontrolle wurde direkt im Anschluss an die Kapillarisolation für 30 min mit 100 μM Glutamat inkubiert (Start der Inkubation = Zeitpunkt „0“), das Glutamat wurde nach Ablauf der 30 min durch Zentrifugation (10 min bei 850 g) von den Kapillaren abgewaschen.

Die drei Ansätze, in denen die Wirkung von drei unterschiedlichen Konzentrationen des Misoprostol auf die Pgp-spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz untersucht werden sollte, wurden direkt nach der Kapillarisolation mit 10 nM, 100 nM und 1 μM Misoprostol behandelt. Der Zeitpunkt der Substanzgabe entsprach dem Zeitpunkt der Glutamataufgabe bei der Positiv-Kontrolle (Zeitpunkt „0“).

Vier Stunden nach Zeitpunkt „0“ gab man zu allen sechs Versuchsansätzen 1,4 μM NBD-CSA und überführte die Proben in je eine Kammer des konfokalen Mikroskopes. Dort ließ man die Kapillaren auf ein Glasplättchen absinken.

Zwei Stunden später wurde die Pgp-spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bestimmt. Dabei wurden von jedem Versuchsansatz mindestens zehn Aufnahmen gemacht, die später mit dem Zeiss LSM Image Examiner ausgewertet werden konnten. Es wurden zehn bis 15 Kapillaren analysiert, die ausschließlich dann in die Auswertung einbezogen wurden, wenn sie folgende Eigenschaften aufwiesen: die Kapillaren mussten frei von Anlagerungen sein, eine gewisse Länge ($>100\mu\text{m}$) und Dicke (Durchmesser 5-8 μm , Endotheldicke 1-1,5 μm) sowie ein intaktes Endothel aufweisen. Die Fluoreszenzintensität (FI) des Hintergrundes wurde von der FI im Lumen abgezogen. Nach Ermittlung dieser Werte subtrahierte man die FI der Negativ-Kontrolle (Ansatz mit PSC-833) von den FIs der anderen Ansätze, um die Pgp-spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz unter der Wirkung der entsprechenden Substanzen zu erhalten und Pgp-unabhängigen NBD-CSA-Transport über das Endothel aus der Auswertung auszuschließen.

Ein Schema des Versuchsablaufs zeigt Abbildung 16.

Da Misoprostol als PGE₂-Analogon nicht selektiv am EP₁-Rezeptor wirkt, wurde in einem separaten Versuch der selektive EP₁-Rezeptor-Antagonist SC-51089 zur Antagonisierung der Effekte von Misoprostol auf die Pgp-Aktivität eingesetzt.

Dazu kamen wieder sowohl ein nativer Ansatz als auch je eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle zum Einsatz (s. o.). Ebenfalls wurde ein Ansatz zum Zeitpunkt „0“ mit 1 μ M Misoprostol versetzt.

Ein fünfter Ansatz wurde 15 min vor Zeitpunkt „0“, also vor dem Aufgabezeitpunkt von Misoprostol und Glutamat, mit 10 μ M SC-51089 vorinkubiert und bei Zeitpunkt „0“ zusätzlich 1 μ M Misoprostol zugegeben (Abb. 16, 1 - 5).

Die Behandlung der Ansätze mit PSC-833 und NBD-CSA sowie die Überführung der Proben in die Mikroskop-Kammern erfolgte wie oben beschrieben nach vier Stunden. Die spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz wurde nach sechs Stunden ab „Zeitpunkt 0“ an zehn bis 15 Kapillaren je Kammer bestimmt. Die Auswertung erfolgte an den entstandenen Fotos wie oben beschrieben.

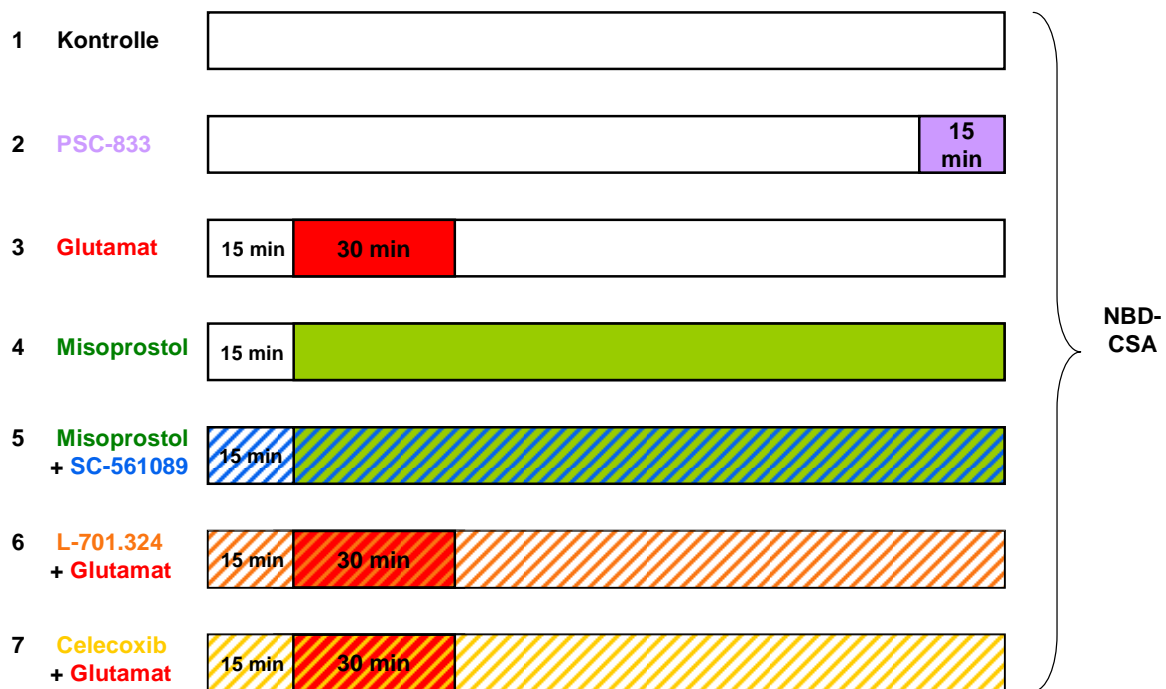


Abb. 16: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für alle durchgeführten Versuchsansätze. 1 – 3 wurde bei jedem Versuch durchgeführt.

L-701.324:

L-701.324 ist ein Antagonist an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors. Um einen möglichen Einfluss dieser Substanz auf die anfallsassoziierte Pgp-Aktivität zu

untersuchen, wurden die isolierten Schweinekapillaren vor der Induktion der Pgp-Expression durch Glutamat mit L-701-324 versetzt.

Direkt im Anschluss an die Isolation wurde die Kapillarsuspension auf vier Eppendorf-Tubes verteilt, sodass sich in jedem Röhrchen 1ml der Suspension befand.

Ein Ansatz blieb analog zu dem Versuch mit Misoprostol bis zur Aufgabe des NBD-CSA unbehandelt. Er stellte die native Kontrolle dar.

Der Ansatz, der als Negativ-Kontrolle dienen sollte, blieb ebenfalls unbehandelt, jedoch wurden die darin befindlichen Kapillaren 15 min vor Aufgabe des NBD-CSA mit 5 μ M PSC-833 (Valspodar) vorinkubiert. PSC-833 hemmt die Transportfunktion des Pgp, sodass sich das NBD-CSA nur Pgp-unabhängig im Kapillarlumen anreichern kann.

Die Positiv-Kontrolle wurde direkt im Anschluss an die Kapillarisolation für 30 min mit 100 μ M Glutamat inkubiert, das Glutamat wurde nach Ablauf der 30 min durch Zentrifugation (10 min bei 850 g) von den Kapillaren abgewaschen.

Der vierte Ansatz wurde 15 min vor Zeitpunkt „0“, also vor dem Aufgabzeitpunkt von Glutamat, mit 1 μ M L-701.324 vorinkubiert und bei Zeitpunkt „0“ zusätzlich 100 μ M Glutamat zugegeben (Abb. 16, 1 – 3 + 6).

Die Behandlung der Ansätze mit PSC-833 und NBD-CSA sowie die Überführung der Proben in die Mikroskop-Kammern erfolgte wie oben beschrieben nach vier Stunden. Die spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz wurde nach sechs Stunden ab „Zeitpunkt 0“ an zehn bis 15 Kapillaren je Kammer bestimmt. Die Auswertung erfolgte an den entstandenen Fotos wie oben beschrieben.

Celecoxib:

Neben den Schweinegehirnen standen für die Kapillarisolation Resektate aus epilepsiechirurgischen Eingriffen an Menschen zur Verfügung (Ethikantrag Projekt 222-09 PO 681/4-1 DFG). Die Menge des zur Verfügung stehenden Materials variierte zwischen 5 und 30 g. Die Isolation der Kapillaren erfolgte mechanisch und identisch zu der Methode beim Schwein, bei der das gesamte Großhirn verwendet wurde (s.o.).

Um einen Effekt des selektiven COX-II-Inhibitors Celecoxib auf die anfallsassoziierte Aktivität von Pgp zu untersuchen, wurden die humanen Kapillaren direkt nach der

Isolation auf vier Eppendorf-Tubes verteilt, sodass sich in jedem Röhrchen 1ml der Suspension befand.

Es kamen wieder sowohl ein nativer Ansatz als auch je eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle zum Einsatz (s. o.). Ein vierter Ansatz wurde 15 min vor Zeitpunkt „0, mit 100 μ M Celecoxib vorinkubiert und bei Zeitpunkt „0“ zusätzlich 100 μ M Glutamat zugegeben (Abb. 16, 1 – 3 + 7).

Die Behandlung der Ansätze mit PSC-833 und NBD-CSA sowie die Überführung der Proben in die Mikroskop-Kammern erfolgte wie oben beschrieben nach vier Stunden. Die spezifische luminale NBD-CSA-Fluoreszenz wurde nach sechs Stunden ab „Zeitpunkt 0“ an 10 bis 15 Kapillaren je Kammer bestimmt. Die Auswertung erfolgte an den entstandenen Fotos wie oben beschrieben.

Statistische Auswertung:

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angaben der Daten erfolgten im Allgemeinen als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler) oder als Median. Es wurden im Mittel drei Querschnitte jeder auswertbaren Kapillare für die statistische Auswertung verwendet. Je Testsubstanz und Versuchsansatz konnten sieben bis zwölf Kapillaren in die Auswertung einbezogen werden. So erhielt man jeweils 20 bis 30 Einzelwerte für jede Testsubstanz, die zunächst einer Varianzanalyse und anschließend, da die Varianz innerhalb der Gruppen, nicht signifikant voneinander abwich, einem Student's t-Test unterzogen wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Grundsätzlich wurden alle statistischen Tests zweiseitig durchgeführt. Lediglich wenn aufgrund der bekannten Literatur und den Arbeitshypothesen eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet. Da jeder Versuchsansatz mindestens einmal reproduziert wurde belief sich die endgültige Zahl der ausgewerteten Einzelwerte je Testsubstanz auf mindestens 40.

5 ERGEBNISSE

5.1 MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPEN-EPILEPSIE

5.1.1 Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition der Cyclooxygenase-2

Mögliche Einflüsse des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib auf die Parameter der elektrisch induzierten Anfälle in einem Amygdala-Kindling-Modell wurden in den Dosierungen 7, 20 und 30 mg/kg KGW und einer Vorbehandlungszeit von 30 min an voll-gekindelten Mäusen getestet. Anfallsschwelle (ADT), Anfallsstärke (SS), Anfallsdauer (SD1, ADD1 und ADD2) sowie die postiktale Phase (SD2) zeigten nach keiner der verwendeten Dosierungen des COX-2-Hemmers signifikante Veränderungen in Vergleich zu den Anfallsparametern, welche im Rahmen des entsprechenden Vehikel-Tests beobachtet werden konnten (Abb. 17). Pro- bzw. antikonvulsive Effekte konnten unter der Wirkung von Celecoxib demnach nicht festgestellt werden.

Die fehlende Wirkung der COX-2-Hemmung auf die Entstehung und Ausbreitung der gekindelten Anfälle wurde durch eine Untersuchung der Anfallsparameter unter dem hochselektiven COX-2-Inhibitor NS-398 weiter bekräftigt. In den Dosierungen 10, 30 und 90 mg/kg KGW beeinflusste NS-398 unter Schwellenstimulation weder Anfallsschwelle noch übrige Anfallsparameter (Abb 17).

Die Mäuse zeigten weder unter der Wirkung von Celecoxib noch der von NS-398 Veränderungen ihres natürlichen Verhaltens oder Allgemeinbefindens.

Um zu demonstrieren, dass die Tiere generell auf eine antikonvulsive Therapie ansprechen, wurden ihnen 30 min vor der Schwellenbestimmung 20 mg/kg des AE Phenobarbital verabreicht. Phenobarbital erhöhte die Anfallsschwellen signifikant um 650%, wobei die übrigen Anfallsparameter bei Schwellenstimulation unbeeinflusst blieben.

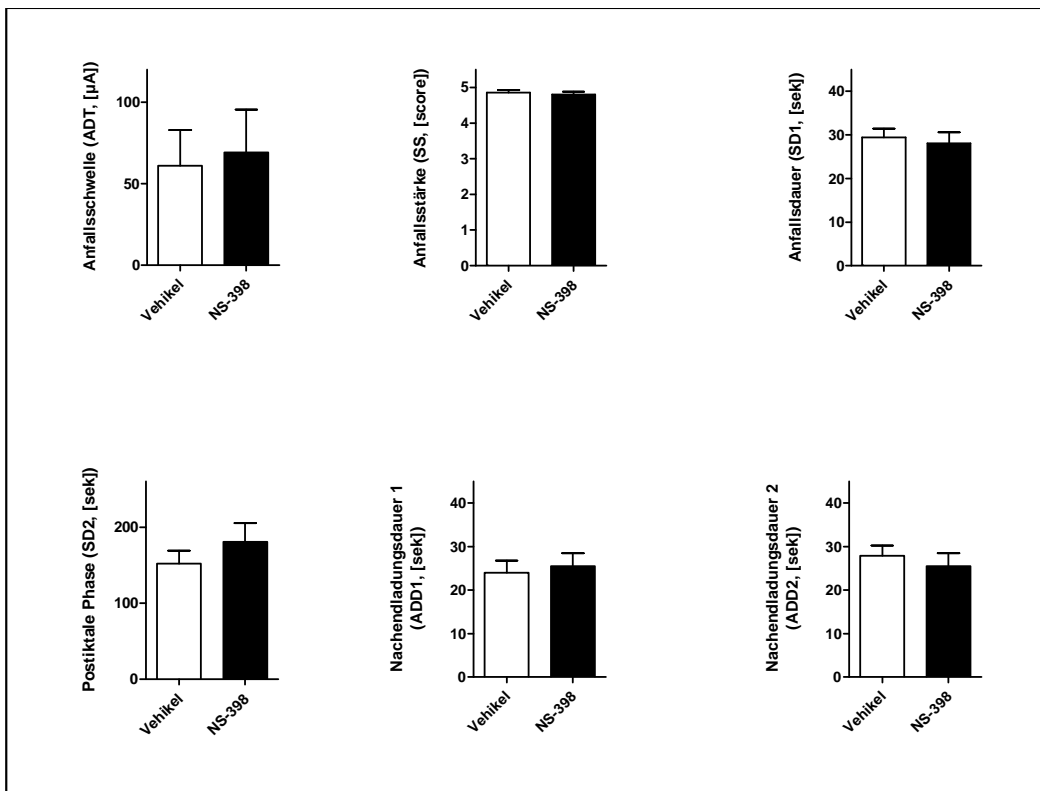
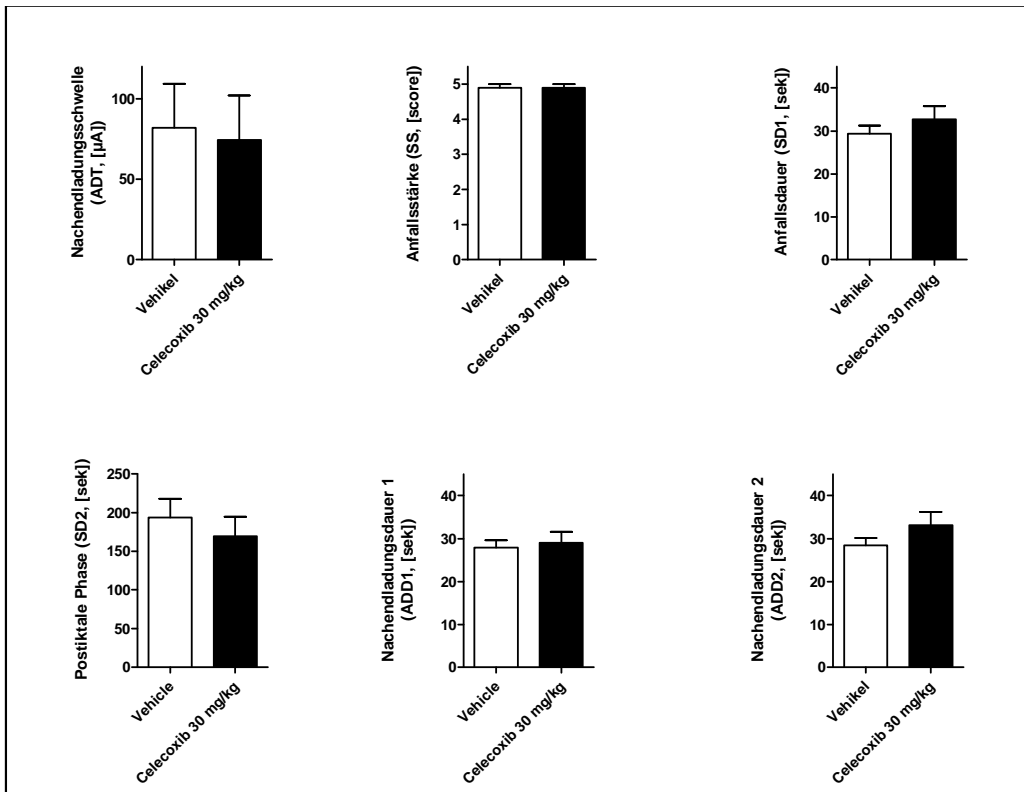


Abb. 17: Effekte von 30 mg/kg Celecoxib (oben) und 90 mg/kg NS-398 (unten) auf gekindelte Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell der TLE; Bestimmung der Anfallsparameter 30 min nach Applikation.

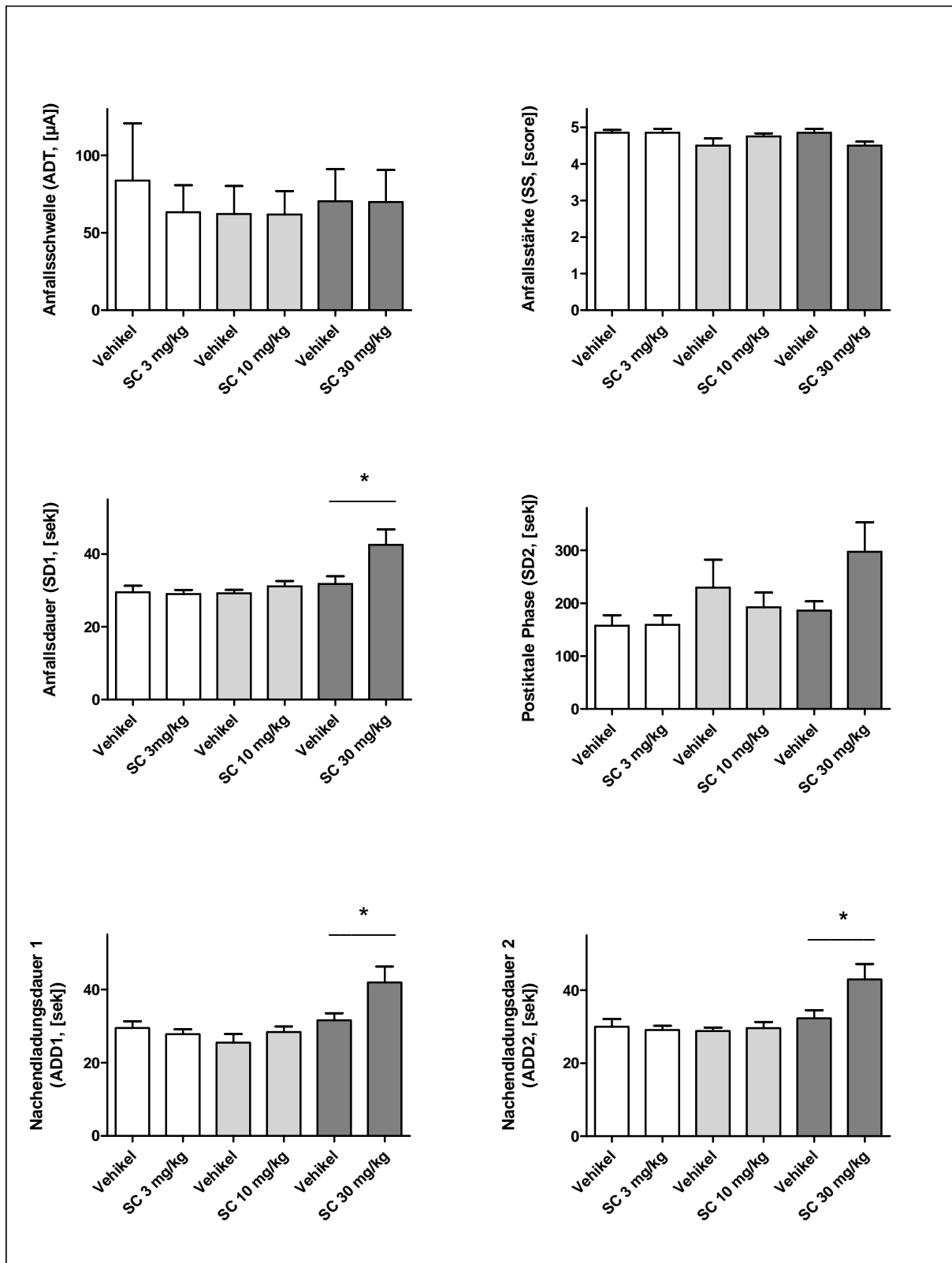


Abb. 18: Effekte von 3, 10 und 30 mg/kg SC-51089 (SC) auf gekindelte Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell der TLE; Bestimmung der Anfallsparameter 30 min nach Applikation. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

5.1.2 Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition des EP1-Rezeptors

Die Applikation des selektiven EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 nahm in Dosierungen von 3, 10 und 30 mg/kg KGW und Vorbehandlungszeiten von 30 und 60 min keinen Einfluss auf die ADT (Abb. 18 und 19). Auch bei einer Vorbehandlungszeit von 240 min beeinflussten 30 mg/kg KGW die ADT nicht.

Bei den Parametern der gekindelten Anfälle jedoch konnten Effekte beobachtet werden:

Die SS reduzierte sich durch 30 mg/kg KGW und 60 min Vorbehandlungszeit um 23% signifikant (Abb 19).

SD und ADD wurden signifikant erhöht (um 34 bzw. 33%), wenn 30 mg/kg KGW SC-51089 30 min vor der Schwellenbestimmung verabreicht wurde (Abb. 18). Eine entsprechende signifikante Verlängerung der ADD um 46% wurde bei 30 mg/kg KGW SC-51089 und einer Vorbehandlungszeit von 60 min beobachtet, wohingegen 3 mg/kg KGW bei dieser Vorbehandlungszeit zu einer signifikanten Verkürzung der ADD um 19% führten (Abb. 19).

Bei einer Vorbehandlungszeit von 240 min (30 mg/kg KGW) traten letztendlich keine Veränderungen der Anfallsparameter mehr auf.

In einem den Versuchen vorausgegangenen Verträglichkeitstest zeigten die Mäuse nach der Applikation der höchsten Dosis (30 mg/kg KGW) eine geringgradige Sedierung mit Hyporeagibilität in den auf die Verabreichung folgenden zwei Stunden.

5.1.3 Beeinflussung der Anfallsparameter durch einen EP1-Rezeptor-Agonisten

Um die Erkenntnisse, die unter einer Behandlung mit dem EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 gewonnen wurden, weiter zu vertiefen, wurden die Effekte des PGE₂-Derivates Misoprostol, welches am EP1-Rezeptor agonistisch wirkt, untersucht. Unter den Dosierungen 0,3, 1, und 3 mg/kg KGW und einer Vorbehandlungszeit von 45 min ließ Misoprostol die ADT unbeeinflusst. SS und ADD₂ zeigten ebenfalls keine Veränderung im Vergleich zu den Werten unter

Vehikelapplikation. Die SD1 wurde jedoch von 1 und 3 mg/kg KGW Misoprostol um 11% und 9% signifikant reduziert (Abb. 20).

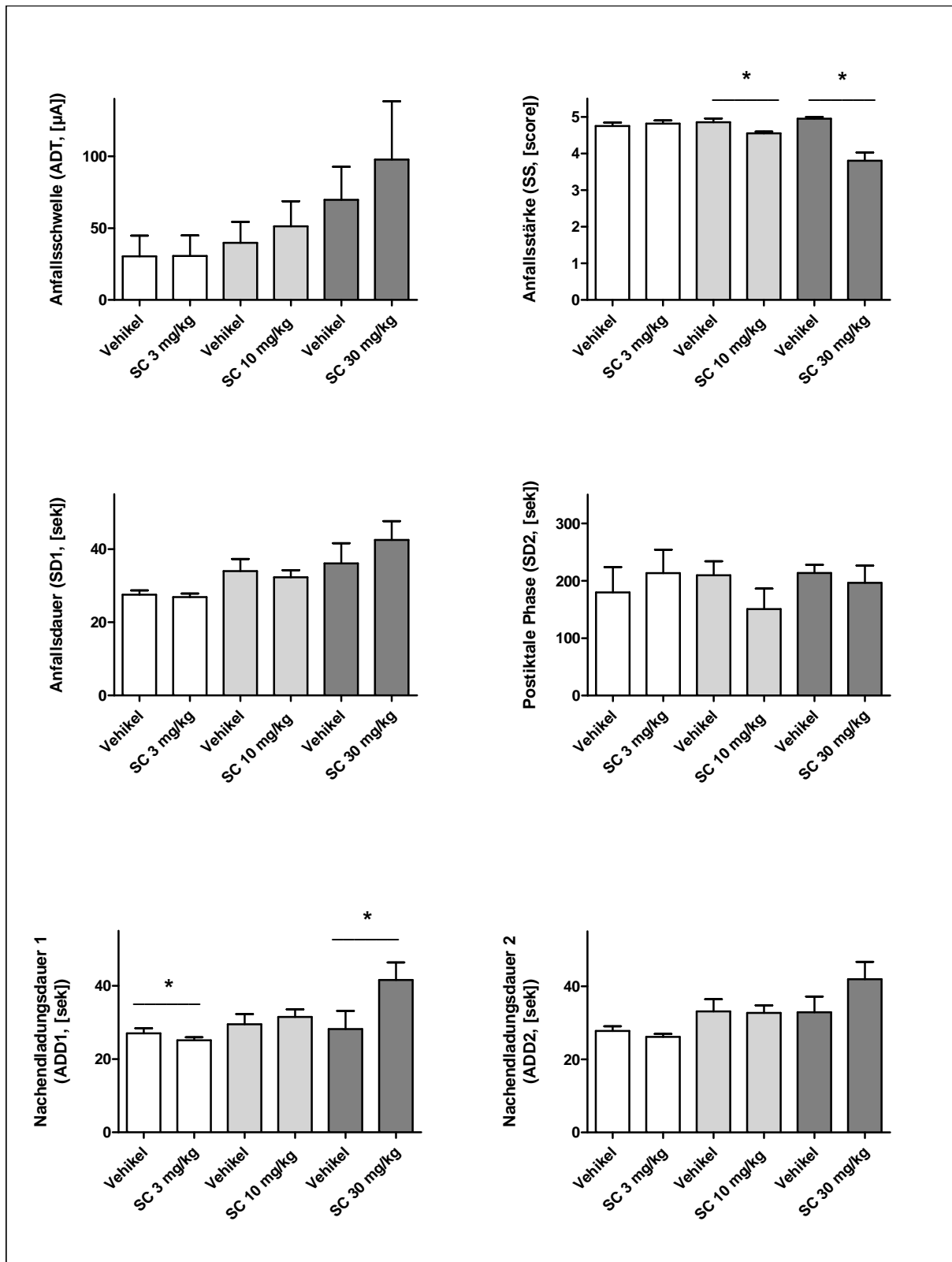


Abb 19: Effekte von 3, 10 und 30 mg/kg SC-51089 (SC) auf gekindelte Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell der TLE; Bestimmung der Anfallsparameter 60 min nach Applikation. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

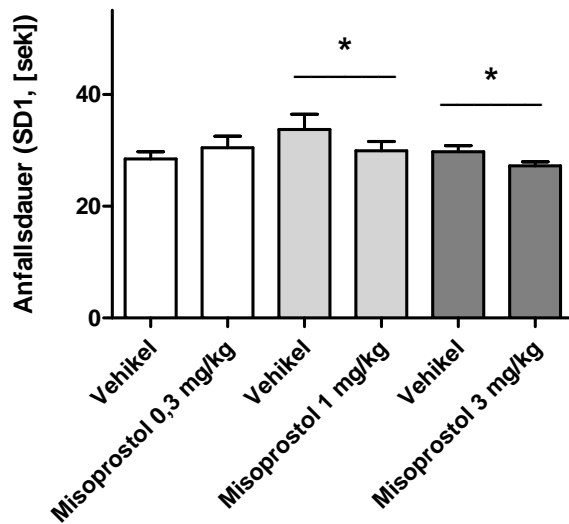


Abb. 20: Effekte von 0,3, 1 und 3 mg/kg Misoprostol auf gekindelte Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell der TLE; Bestimmung der Anfallsparameter 45 min nach Applikation. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet

Substanz	Vorbehandlungszeit in min	Dosis in mg/kg KGW	Signifikante Effekte auf die Anfälle
Celecoxib	30	7	/
		10	/
		30	/
NS-398	30	10	/
		30	/
		90	/
SC-51089	30	3	/
		10	Verlängerung der SD und ADD um 34%
		30	Verlängerung der SD und ADD um 33%
	60	3	/
		10	Reduktion der SS um 6%
		30	Reduktion der SS um 23%
240	30	/	
Misoprostol	45	0,3	/
		1	Verkürzung der SD1 um 11%
		3	Verkürzung der SD1 um 9%

Tab. 7: Zusammenfassung der Effekte der getesteten Substanzen auf die gekindelten Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell der TLE

5.2 UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMCHANISMEN DER ANFALLSINDUZIERTEN EXPRESSION DES MULTIDRUG-TRANSPORTERS P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN

5.2.1 Methodenetablierung

Getestete Kapillar-Isolierungstechniken:

Bei der enzymatischen Isolationstechnik wurde der Gewebeverband der Endothelzellen stark aufgebrochen, sodass die Kapillaren teils in kurzen ($< 10\mu\text{M}$) Bruchstücken vorlagen. Die Ausbeute an Kapillaren war im Vergleich zu der bei der mechanischen Aufreinigungsmethode gering. Durch die zugesetzte Dispase II konnte jedoch ein hoher Reinheitsgrad der Kapillaren erreicht werden.

Die mechanische Aufreinigung lieferte durchweg lange Kapillaren in großer Zahl. Wurde weitgehend graue Substanz verwendet, konnte ein hoher Reinheitsgrad erreicht werden, wohingegen sich in dem Ansatz, für den das gesamte Großhirn verwendet wurde, starke Beimengungen von neuronalen und glialen Zellen befanden. Die 30%ige Dextranlösung (Dextran mit einem Molekulargewicht von 100.000 Da) lieferte in der Dichte-zentrifugation eine klare Auftrennung zwischen Kapillarfraktion und lipidreichem Hirngewebe. War der Dextrananteil kleiner als 30% trennten sich die beiden Phasen nicht deutlich genug voneinander ab.

Morphologisches Erscheinungsbild der isolierten Kapillaren:

Das morphologische Erscheinungsbild der suspendierten Kapillarsegmente, die mithilfe der mechanischen Aufreinigungsmethode aus grauer Gehirns substanz gewonnen wurden, war durch folgende Merkmale charakterisiert:

- überwiegend lagen die Kapillarsegmente als Einzelstücke vor;
- sie hatten im Schnitt einen Durchmesser von 8 – 11 μm und waren gelegentlich bis zu mehreren hundert μm lang;
- die Kapillaren waren weitgehend unverzweigt, zum Teil konnte man auch Vergabelungen erkennen;

- der Gewebeverband der Endothelzellen erschien, auch noch 12 Stunden nach der Isolation, intakt;
- der Grad der Verunreinigung mit neuronalen oder glialen Zellen sowie Erythrozyten war sehr gering.

5.2.2 Bestimmung der P-Glykoprotein-spezifischen luminalen Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Allgemeines:

Sowohl bei den porcinen als auch bei den humanen Kapillaren konnte man zwei Stunden nach Zugabe des NBD-Cyclosporin A (NBD-CSA) unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ein Anreicherungsmaximum im Kapillarlumen erkennen. Dieser Zustand blieb über mindestens sechs Stunden konstant. Wurden die Kapillaren 15 min vor Aufnahme des NBD-CSA mit 5 μ M PSC-833 (spezifischer P-Glykoprotein-Inhibitor) vorinkubiert, nahm die Fluoreszenz im Lumen im Vergleich zum ungehemmten Ansatz um 56% ab.

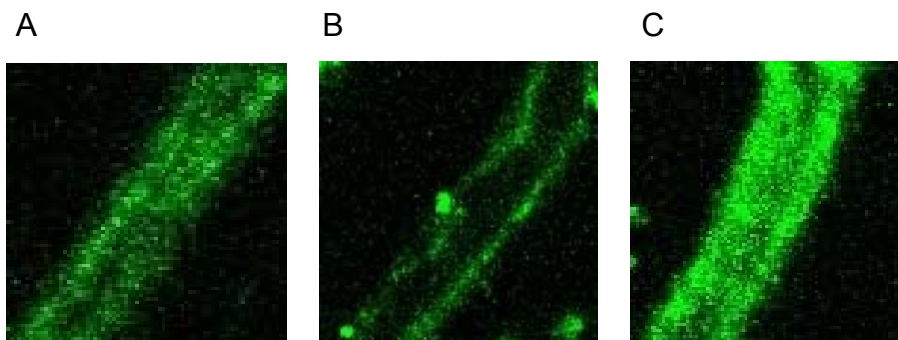


Abb. 21: Frisch isolierte porcine Kapillaren nach Inkubation mit NBD-CSA. **A:** Kontrolle, **B:** nach Vorinkubation mit 5 μ M des Pgp-Hemmstoffs PSC-833, **C:** nach Vorinkubation mit 100 μ M Glutamat für 30 min. Erläuterungen siehe Text.

Die Fluoreszenzintensität (FI) unter PSC-833 wurde von den Intensitäten aller anderen Versuchsansätze innerhalb eines Versuches abgezogen. So erhielt man jeweils die Pgp-spezifische luminalen Fluoreszenz von NBD-CSA und transzellulärer Transport oder ein Eindringen des NBD-CSA über die Kapillarenden konnte von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die luminalen FI stieg nach einer Inkubation mit

100µM Glutamat über 30 min nach sechs Stunden um 38% gegenüber der des nativen Ansatzes an (Abb. 21 und 22). Die Inkubation der Kapillaren mit Glutamat erfolgte ebenfalls bei jedem Versuch und diente als Positivkontrolle.

Misoprostol:

Das PGE₂-Analogon Misoprostol wurde in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 µM getestet und steigerte die luminale FI konzentrationsabhängig (Abb. 22). 10 µM des selektiven EP1-Rezeptorantagonisten SC-51089 antagonisierten die Wirkung der höchsten Konzentration des Misoprostols signifikant, die FI ging dabei in den Kapillaren, die vor der Aufgabe von Misoprostol mit SC-51089 vorinkubiert wurden (siehe 4.2.2, Abb. 16), annähernd auf Kontrollniveau zurück. Das morphologische Erscheinungsbild der Kapillaren, insbesondere der intakte Gewebeverband der Endothelzellen, blieb unter dem Einfluss der Substanzen Misoprostol oder SC-51089 im Vergleich zu dem der Kontrollkapillaren unverändert.

L-701-324:

Der Glycin-Antagonist L-701.324 wurde in einer Konzentration von 1 µM getestet und konnte die luminale FI unter dem Einfluss von Glutamat in signifikanter Weise auf Kontrollniveau halten (Abb. 23). Das morphologische Erscheinungsbild der Kapillaren, insbesondere der intakte Gewebeverband der Endothelzellen, blieb unter dem Einfluss von L-701.324 im Vergleich zu dem der Kontrollkapillaren unverändert.

Celecoxib:

Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib wurde in einer Konzentration von 100 nM getestet und konnte die luminale FI unter dem Einfluss von Glutamat in signifikanter Weise auf Kontrollniveau halten (Abb. 23). Das morphologische Erscheinungsbild der Kapillaren, insbesondere der intakte Gewebeverband der Endothelzellen, blieb unter dem Einfluss von Celecoxib im Vergleich zu dem der Kontrollkapillaren unverändert.

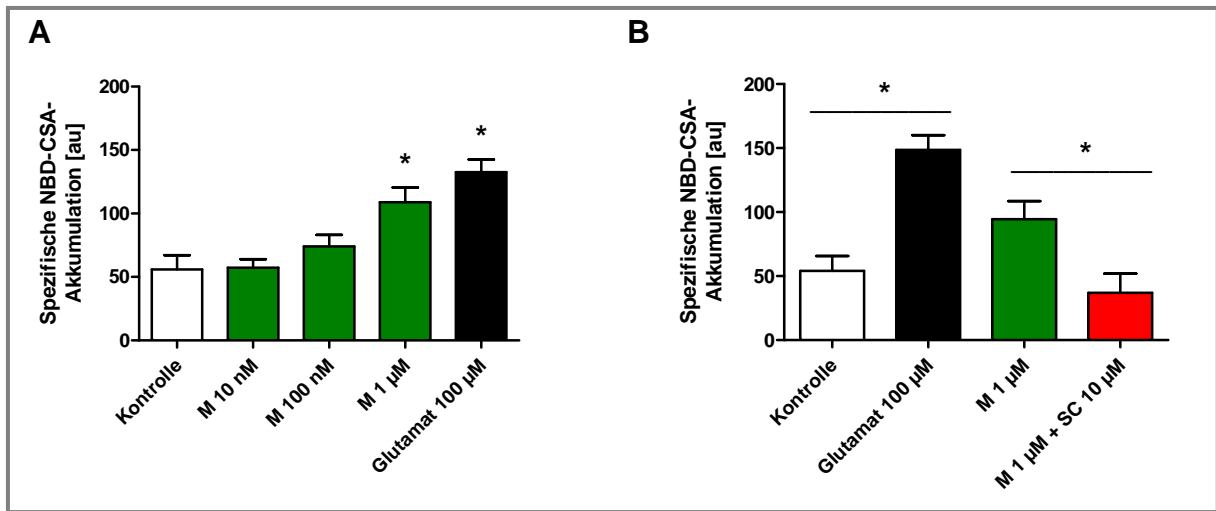


Abb. 22: Die Wirkungen von Misoprostol (M) und SC-51089 (SC) auf die Pgp-spezifische luminaire NBD-CSA-Fluoreszenz in frisch isolierten Schweinekapillaren. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

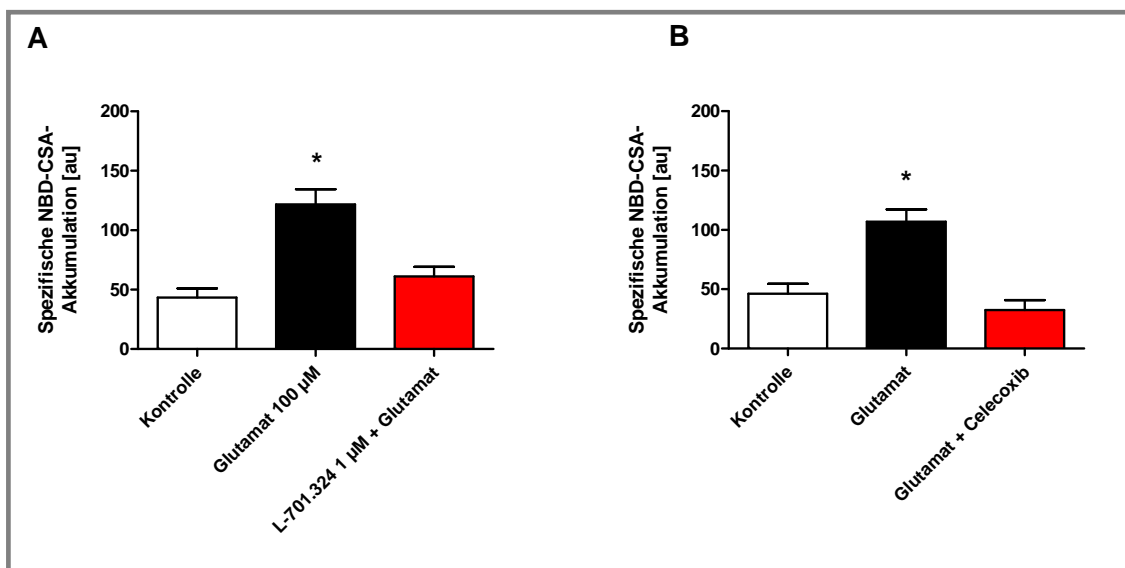


Abb. 23: Die Wirkung von L-701.324 (A) bzw. Celecoxib (B) auf die Pgp-spezifische luminaire NBD-CSA-Fluoreszenz in frisch isolierten Schweine- bzw. Menschenkapillaren. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern gekennzeichnet.

6 DISKUSSION

6.1 MODULATION DER ARACHIDONSÄUREKASKADE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPEN-EPILEPSIE

6.1.1 Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition der Cyclooxygenase-2

Cyclooxygenasen wurden wiederholt als Zielstrukturen für neue Therapiestrategien der Behandlung von Epilepsien vorgeschlagen (TAKEMIYA et al. 2006; KULKARNI u. DHIR 2009; POTSCHKA 2010b). Wir konnten bereits in verschiedenen tierexperimentellen Studien die positiven Effekte einer COX-2-Hemmung auf eine Kontrolle der Pgp-Expression, die Wirksamkeit von AE und die Wiederherstellung der Pharmakosensitivität zeigen (ZIBELL et al. 2009; SCHLICHTIGER et al. 2010; VAN VLIET et al. 2010). Darüber hinaus bestehen Hinweise auf einen Schutz vor exzitotoxischen Nervenzellschäden im epileptischen Gehirn durch eine COX-2-Hemmung (KUNZ et al. 2005; D. K. KIM u. JANG 2006; TAKEMIYA et al. 2006). Frühere, in Nagern durchgeführte Untersuchungen ließen jedoch eine gegenteilige, negative Wirkung einer COX-2-Hemmung auf die Anfallsentstehung vermuten (BAIK et al. 1999; H. J. KIM et al. 2008; TOSCANO et al. 2008; KULKARNI u. DHIR 2009).

Unsere aktuellen Forschungsdaten widerlegen diese Vermutung. Zum einen wurden die oben genannten prokonvulsiven Effekte in akuten Anfallsmodellen an naiven Tieren, nicht jedoch in chronischen Epilepsiemodellen festgestellt, die eine viel höhere klinische und prädiktive Validität für verschiedene Epilepsieformen haben (LOSCHER 1997). Zum anderen hatten zwei COX-2-Hemmer unterschiedlicher Selektivität, die wir an Mäusen im Amygdala-Kindling-Modell getestet haben, weder pro- noch antikonvulsive Wirkungen auf die Anfallsentstehung, -ausbreitung oder –terminierung der vollgekindelten Anfälle. In Anbetracht der sehr guten prädiktiven Validität des Amygdala-Kindling-Modells für Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen, wie beispielsweise die TLE des Menschen, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit

negative Effekte auf Anfallsfrequenz und Anfallsschwere einer Add-on-Therapie von Epilepsiepatienten mit einem COX-2-Hemmer ausschließen. Die Gehirne vollgekindelter Mäuse weisen zahlreiche zelluläre und molekulare Veränderungen mit einem durch den Kindlingprozess entstandenes hyperexzitatorisches Netzwerk auf, die viele Parallelen zur Pathophysiologie chronischer Epilepsien haben (LOSCHER 2002; MCINTYRE u. GILBY 2008).

Der therapeutische Einsatz von COX-2-Inhibitoren wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Humanpräparate dieser Substanzklasse wurden wegen ihrer kardiovaskulären Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen. In der Tiermedizin sind derzeit einige COX-2-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität zugelassen. Firocoxib hemmt die COX-2 beim Hund ca. 384-fach stärker als die COX-1 und wird bei Hunden als Analgetikum und Antiphlogistikum bei degenerativen Gelenkserkrankungen eingesetzt (MCCANN et al. 2004). Meloxicam wirkt beim Hund ebenfalls COX-2-selektiv (12-15-fach stärker COX-2 als COX-1 (AGNELLO et al. 2005)). Meloxicam ist für verschiedene Indikationen (z. B. postoperative Analgesie, Antiphlogistik bei Gelenkserkrankungen) bei Hund, Katze, Schwein, Rind und Pferd zugelassen und wird in der Praxis sehr häufig eingesetzt, da es kaum Nebenwirkungen hat und allgemein gut vertragen wird.

6.1.2 Beeinflussung der Anfallsparameter durch Inhibition des EP1-Rezeptors

Bei den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit im Amygdala-Kindling-Modell durchgeführt wurden, konnten weder pro- noch antikonvulsive Effekte von COX-2-Hemmern festgestellt werden.

Inflammatorische Prozesse, im speziellen die Arachidonsäurekaskade, wurden bereits vielfach als Ansatzpunkte für eine Krankheitsmodulation, Optimierung eines medikamentellen Ansprechens und sogar eine Wiederherstellung von Pharmakosensitivität erkannt und diskutiert (PEKCEC et al. 2009; FISCHBORN et al. 2010; POTSCHKA 2010b). Insbesondere ein Eingreifen in die Kaskade, ohne die Produktion von Prostaglandinen zu blockieren, ist wünschenswert, da davon auszugehen ist, dass eine Dauertherapie mit COX-Hemmstoffen mit nicht tolerierbaren gastrointestinalen und renalen Nebenwirkungen einhergehen würde (RAINSFORD 2007; CHIBA et al. 2008). Wie wir bereits zeigen konnten, verhinderte

eine Blockade des EP1-Rezeptors unter Verwendung von SC-51089 die anfallsassoziierte Hochregulation des Multidrug-Transporters P-Glykoprotein (PEKCEC et al. 2009). Basierend auf der Eigenschaft von Pgp, AE am Übertritt über die BHS zu hindern, gehen wir davon aus, dass ein Antagonismus am EP1-Rezeptor die Wirksamkeit dieser AE sichern kann.

Anschließende Untersuchungen, die für eine Weiterentwicklung solcher Substanzen notwendig sind, wie insbesondere klinische Studien, bedurften jedoch einer vorherigen Abklärung der Verträglichkeit dieser EP1-Rezeptor-Antagonisten.

Im Anbetracht der überaus guten prädiktiven Validität des Amygdala-Kindling-Modells für Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen, kann ein negativer Effekt einer Add-on-Therapie mit einem EP1-Rezeptor-Antagonisten auf die Anfallskontrolle bei dieser Erkrankung durch die Ergebnisse dieser Studie weitgehend ausgeschlossen werden.

Die einzige negative Wirkung, die unter einer Add-on-Therapie mit SC-51089 auftrat, war eine Verlängerung der Anfallsaktivität bei der höchsten getesteten Dosierung (30 mg/kg KGW). Allerdings sollte man bedenken, dass weitaus niedrigere Dosierungen bereits signifikante positive Wirkungen auf Neuroprotektion und die Wiederherstellung der Pharmakosensitivität erzielen konnten (MCCULLOUGH et al. 2004; KAWANO et al. 2006; ABE et al. 2009). So könnte eine Dosisreduktion die negativen Effekte auf die Anfallsdauer auf ein Minimum reduzieren. Möglicherweise ist diese Verlängerung der Anfallsdauer auf eine Interferenz der EP1-Rezeptor-Kaskade mit endogenen Mechanismen der Anfallsterminierung zurückzuführen. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, die nach der Aktivierung des EP1-Rezeptors an der neuronalen Zytoplasmamembran infolge eines Anfalls stattfindet, könnte diese Wirkung verursachen (siehe 2.3.3).

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass 10 und 30 mg/kg SC-51089 die Anfallsstärke signifikant reduzierten. Dieser Effekt kann die antikonvulsive Wirkung der AE bei einer Kombinationstherapie mit einem EP1-Rezeptor-Antagonisten zusätzlich unterstützen.

6.1.3 Beeinflussung der Anfallsparameter durch einen EP1-Rezeptor-Agonisten

Das PGE₂-Analogon Misoprostol, das agonistisch am EP1-Rezeptor wirkt, hatte einen gegenteiligen Effekt auf die Anfallsdauer, es bewirkte eine Verkürzung der Anfälle. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese zusätzlich, dass eine Aktivierung des EP1-Rezeptors auch in die Anfallsmodulation involviert sein könnte. Es werden weitere Studien zur genaueren Untersuchung der Signalwege einer EP1-Rezeptor-Modulation notwendig sein.

Möglicherweise könnte ein Agonismus am EP1-Rezeptor auch zur Generierung eines neuen Modells für Pharmakoresistenz genutzt werden. Ergebnisse von Untersuchungen an isolierten Gehirnkapillaren deuten auf eine Induktion von Pgp durch ein PGE₂-Analogon hin (siehe unten). So könnte es in Zukunft möglich sein, durch eine Verabreichung von Misoprostol, alleine oder unterstützend in bereits etablierten Epilepsiemodellen, die für die Generierung von epileptischen pharmakoresistenten Versuchstieren notwendigen Anfälle in ihrer Anzahl und Schwere zu reduzieren.

6.1.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sowohl COX-2-Hemmer als auch EP1-Rezeptor-Antagonisten bei Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen in Dosierungen, die eine anfallsassoziierte Hochregulation von Pgp verhindern können, kaum negative Effekte auf die Anfallsmodulation haben. Möglicherweise treten auch antikonvulsive Effekte auf, wie es die Reduktion der Anfallsschwere unter SC-51089 zeigte. So könnte eine Add-on-Therapie mit einem EP1-Rezeptor-Antagonisten möglicherweise die antikonvulsive Wirkung von AE unterstützen.

Da der EP1-Rezeptor-Antagonist in einer hohen Dosierung die Anfallsdauer verlängerte und eine Modulation des EP1-Rezeptors womöglich endogene Mechanismen der Anfallsterminierung beeinflussen kann, sollten jedoch weitere Verträglichkeitstests durchgeführt oder die Verabreichung geringerer Dosen in Erwägung gezogen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schaffen eine Basis für weiterführende klinische Studien, deren Durchführung bislang aufgrund der Unsicherheiten bezüglich der oben genannten negativen Effekte von COX-2-Inhibitoren auf das Anfallsgeschehen nicht möglich waren. Aktuell beginnt eine Pilotstudie in Kooperation mit der Abteilung für Veterinärneurologie der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. In dieser soll der selektive COX-2-Hemmer Firocoxib bei Phenobarbital-resistenten Hunden zusätzlich zu Phenobarbital über einen Zeitraum von zwei Monaten verabreicht werden. Dieser Therapiezeitraum ist möglicherweise ausreichend, um eine Pharmakosensitivität wiederherzustellen. Die zunehmend bessere Wirksamkeit des gleichzeitig verabreichten Phenobarbitals und die damit einhergehende Anfallskontrolle könnte diesen Vorgang zusätzlich unterstützen, da eine anfallsinduzierte Hochregulation des Pgp dann ausbliebe.

6.2 UNTERSUCHUNGEN DER SIGNALTRANSDUKTIONSMCHANISMEN DER ANFALLSINDUZIERTEN EXPRESSION DES MULTIDRUG-TRANSPORTERS P-GLYKOPROTEIN AN ISOLIERTEN GEHIRNKAPILLAREN

6.2.1 Methodenetablierung

Untersuchungen an isolierten Gehirnkapillaren als *ex-vivo*-Modell der BHS bieten vielversprechende und weitgreifende Möglichkeiten zu Erforschung der Mechanismen von Pharmakoresistenz und anderen pathophysiologischen Vorgängen an der BHS. Die Vorteile eines solchen Modells gegenüber *in-vivo*-Modellen liegen zum einen bei einer schnelleren Durchführbarkeit. Die Generierung epileptischer Tiere ist in der Regel mit einem großen zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand verbunden, meist dauert es mehrere Wochen, bis das Modell verwendet werden kann (LOSCHER 2002). Verwendet man Epilepsiemodelle, bei denen elektrisch Anfälle ausgelöst werden, muss bei den Versuchstieren beispielsweise zuerst eine Stimulationselektrode in den Bereich des Hippocampus implantiert werden. Bis die klinische und pathologische Situation einer chronischen Epilepsie hergestellt ist, vergehen dann meist mehrere Wochen, in denen die Tiere wiederholt Anfälle durchleben (SHARMA et al. 2007). Isolierte Gehirnkapillaren können hingegen innerhalb eines Tages alle Ergebnisse liefern.

Zum anderen ist eine Reduktion und Ersetzung von Tierversuchen auf diese Weise möglich, da beispielsweise Substanzen zunächst an den isolierten Gehirnkapillaren aus Schlachthofmaterial auf ihre generelle Wirksamkeit getestet werden können, bevor zu weiterführenden Untersuchungen von Pharmakodynamik und –kinetik Tierversuche durchgeführt werden müssen. Diese Tatsache unterstützt die beiden ersten Aspekte des von der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) geforderten Prinzips der „Drei R“ – *Replacement* (Ersatz von Tieren), *Reduction* (Reduktion der Tierzahl) und *Refinement* (Verbesserung der Methoden und Versuchsbedingungen).

Aber nicht nur gegenüber *in-vivo*-Modellen bietet die Kapillarisolation Vorteile. Isolierte Gehirnkapillaren spiegeln die Situation, wie sie *in-vivo* vorzufinden ist, exakter wider, als es Zellkulturen können, da die Endothelzellen noch in ihrem

ursprünglichen Gewebeverband vorliegen (WEGENER et al. 1996). Dies ist der Grund, warum eine artifiziell erzeugte BHS nie die Dichtigkeit aufweisen wird, wie die BHS *in-vivo*. Selbst Kulturen aus primären BCEC, angezchtet auf sogenannten Transwell-Filtern, ob in Kombination mit Astrozyten bzw. Perizyten oder als Monokultur, können die BHS nicht zufriedenstellend nachbilden (WEIDENFELLER et al. 2005). Zellkulturen, insbesondere solche aus primären Zellen, bedürfen darüber hinaus auch eines größeren Zeitaufwandes, als isolierte Kapillaren, da die Zellen zunächst aufwendig aus Gehirngewebe isoliert werden und anschließend in Kultur gebracht werden müssen.

Die Methode der Kapillarisation, wie sie in dieser Arbeit etabliert wurde, kann sowohl bei porcinem, als auch bei murinem oder humanem Gehirngewebe angewendet werden. Dabei konnte die Menge der verwendeten Gehirns substanz immer weiter reduziert werden, was es ermöglichte, eine ausreichende Anzahl an Kapillaren aus sehr kleinen Gewebeproben, wie neurochirurgischen Resektaten, zu isolieren. Mit den so gewonnenen vitalen Kapillaren können Funktionen der Transporter der BHS unter verschiedenen Einflüssen untersucht werden. Weiterhin stehen sie für semiquantitative Verfahren zur Erforschung der Transporter auf Expressionsebene zu Verfügung (z. B. Western Blot).

6.2.2 Bestimmung der P-Glykoprotein-spezifischen luminalen Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Aktivität des Efflux-Transporters Pgp wurde mittels Messung der Pgp-spezifischen luminalen NBD-CSA-Fluoreszenz bestimmt und quantifiziert. Dabei reicherte sich das fluoreszenzmarkierte Pgp-Substrat NBD-Cyclosporin A (NBD-CSA) im Kapillarlumen an und konnte unter dem konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Zunächst galt es, zu zeigen, dass der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, der bei einem Anfall in großer Menge aus Neuronen freigesetzt wird, den Efflux-Transporter Pgp an den isolierten Gehirnkapillaren induzieren kann. Dies ließ sich in signifikanter Weise an porcinen, murinen und humanen Gehirnkapillaren demonstrieren. Gerade beim Menschen wurde eine Induktion des Pgp durch Glutamat lange kontrovers diskutiert, da dieses Phänomen bisher nur bei Schweinen

und Nagern nachgewiesen werden konnte (BAUER et al. 2008), was insbesondere an der geringen Verfügbarkeit von menschlichem Gehirngewebe liegt. Durch diesen Ausschluss von Speziesunterschieden zwischen Mensch und Nager, lassen sich nun viele Daten und Befunde, die in Nager-Modellen erhoben wurden, auf den Menschen übertragen, da Glutamat offenbar bei beiden Spezies eine entscheidende Rolle in der anfallsassoziierten Induktion des Pgp zukommt. Dies eröffnet eine Vielfalt neuer Therapiestrategien für die Behandlung betroffener Menschen und gibt Hoffnung auf eine bessere Therapierbarkeit pharmakoresistenter Patienten.

Das PGE₂-Analogon Misoprostol konnte an isolierten Schweinekapillaren eine Zunahme der Transportfunktion von Pgp konzentrationsabhängig erreichen. Die höchste getestete Konzentration (1 µM) lieferte annähernd gleich hohe Werte wie unter dem Einfluss von Glutamat. Diese Ergebnisse lassen auf eine herausragende Bedeutung der Arachidonsäurekaskade auf die Transportaktivität des Pgp schließen. Der selektive EP1-Rezeptor-Antagonist SC-51089 konnte die Wirkung von 1 µM Misoprostol vollständig antagonisieren, was die entscheidende Rolle des EP1-Rezeptors in dieser Kaskade erneut bestätigt. Vermutlich findet nach einer Aktivierung des kernständigen EP1-Rezeptors eine Aktivierung des MDR1-Gens statt, was zu einem vermehrten Einbau von Pgp in die luminale Membran der Endothelzellen führt. Künftige Untersuchungen auf Expressionsebene müssen diese Theorie jedoch noch weiter absichern.

Darüber hinaus bietet ein Agonismus am EP1-Rezeptor einerseits vielfältige neue Therapiestrategien für die Behandlung anderer ZNS-Erkrankungen, birgt andererseits aber auch Risiken. Pgp fungiert an verschiedenen biologischen Barrieren als Efflux-Pumpe, die den Kontakt des Gewebes mit schädlichen Xenobiotika verhindert (HULS et al. 2009). Ein bereits in den Forschungsfokus gerücktes Beispiel für die Bedeutung der Pgp-Funktion und - Expression für die Pathophysiologie von ZNS-Erkrankungen ist der pestizidinduzierte Morbus Parkinson. So konnte ein Zusammenhang zwischen der Pgp-Expression, der Pestizid-Exposition und dem Risiko, an Morbus Parkinson zu erkranken festgestellt werden (G. LEE u. BENDAYAN 2004). Morbus Parkinson entsteht aus dem durch oxidativen Stress bedingten Zelltod von Neuronen der Substantia nigra, der u. A. durch verschiedene Pestizide, die Pgp-Substrate sind, ausgelöst werden kann (LAI et al. 2002). Da der Genotyp des ABCB1/MDR1-Gens mit der Pestizid-Sensitivität in verschiedenen Studien korrelierte, vermutet man eine genetische Komponente in der

Pathophysiologie dieses pestizidinduzierten Morbus Parkinson. Ebenso waren ABCB1/MDR1-Transkripte bei Parkinson-Patienten im Vergleich zu denen bei Gesunden reduziert (FURUNO et al. 2002; DROZDZIK et al. 2003; C. G. LEE et al. 2004; TAN et al. 2005; ZSCHIEDRICH et al. 2009). Auch die Gehirnpenetration des Radiotracers und Pgp-Substrates [(11)C] Verapamil war bei Patienten mit progressivem Morbus Parkinson signifikant erhöht (KORTEKAAS et al. 2005; BARTELS et al. 2008; BARTELS et al. 2009). So könnte eine langandauernde Pgp-Inhibition möglicherweise zu einer Prädisposition führen, Morbus Parkinson zu entwickeln, insbesondere bei Patienten, die vermehrt Pestiziden ausgesetzt sind, wie beispielsweise Landwirte.

Eine weitere ZNS-Erkrankung, die sich durch eine langandauernde Unterdrückung von Pgp verschlechtern oder durch einer Unterstützung der Pgp-Funktion verbessern könnte, ist Morbus Alzheimer. Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass die Pgp-Funktion und - Expression von Efflux-Transporten an BVEC negativ mit der Ablagerung von Amyloid A β im Gehirn korreliert ist (VOGELGESANG et al. 2002; CIRRITO et al. 2005). HARTZ et al. (2010) konnten bereits an isolierten murinen Gehirnkapillaren zeigen, dass Amyloid A β , wie es sich bei Morbus Alzheimer auf pathologische Weise im Gehirn anreichert, von Pgp transportiert wird. Bei den Pathomechanismen dieser Erkrankung scheint eine Unterfunktion oder verminderte Expression des Pgp eine Rolle zu spielen.

Trotz der Risiken einer Inhibition der Pgp-Expression bietet das Eingreifen in die Arachidonsäurekaskade im Sinne einer Unterstützung der Pgp-Induktion mithilfe von PGE₂-Analoge neue therapeutische Ansatzpunkte in der Behandlung von Patienten mit Erkrankungen, die aus einer Unterfunktion des Pgp resultieren.

Auch wenn es bislang noch keine Daten zur Wirkung der PGE₂-Analoge auf die Pathomechanismen von Epilepsien gibt, konnten für andere neurodegenerative Erkrankungen bereits neuroprotektive Effekte dieser Substanzen gezeigt werden. So führte Misoprostol, das während und nach dem Infarktgeschehen verabreicht wurde, in einem murinen Schlaganfallsmodell zu einer signifikanten Reduktion des Infarkt Volumens und der Neuronenverluste (LI et al. 2008). Darüber hinaus konnte ein PGE₂-Analogon in einem Nagermodeill mit durch Pentylentetrazol induzierten Anfällen exzitotische Effekte verhindern (OLIVEIRA et al. 2008). In beiden Studien scheint die neuroprotektive Wirkung über einen Agonismus an EP2- und EP4-Rezeptoren stattzufinden. Diese kontroversen Effekte von PGE₂-Analoge auf das

ZNS können insbesondere bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer (s. o.) einen positiven Nutzen im Hinblick auf eine Verminderung der progressiven Neurodegeneration haben.

Neben Substanzen, die über eine Modulation der Arachidonsäurekaskade in die anfallsinduzierte Aktivität von Pgp eingreifen, können an den isolierten Gehirnkapillaren unter Ermittlung der Pgp-spezifischen luminalen NBD-CSA-Fluoreszenz ebenfalls die Effekte von Substanzen, die über andere Mechanismen wirken, getestet werden. So konnte unter Anwendung eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten, der an der Glycin-Bindungsstelle des Rezeptors wirkt, eine glutamatvermittelte Induktion des Pgp verhindert werden (KOHL u. DANNHARDT 2001; JANSEN u. DANNHARDT 2003). Diese sogenannten Glycin-Antagonisten wie beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete L-701.324 verhindern an Neuronen durch eine Inhibition des NMDA-Rezeptors die Entstehung und Ausbreitung von Anfällen (POTSCHKA et al. 1998). Darüber hinaus scheinen sie, wie hier erstmals gezeigt, eine anfallsinduzierte Aktivitätssteigerung des Pgp-vermittelten Arzneimittel-efflux aus dem Gehirn zu vermindern und damit zu einer Verhinderung der Pharmakoresistenzbildung im Rahmen chronischer Epilepsien beizutragen. Ein entscheidender Vorteil von Liganden der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors gegenüber Liganden der Glutamat-Bindungsstelle ist auch, dass die basale Expression des Pgp erhalten bleibt, wie an den isolierten Kapillaren gezeigt werden konnte.

An isolierten humanen Gehirnkapillaren konnte gezeigt werden, dass die Arachidonsäurekaskade auch beim Menschen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Pharmakoresistenz spielt. Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib konnte die signifikante Aktivitätssteigerung des Pgp nach einer Glutamatinkubation auf Kontrollniveau halten.

6.2.3 Schlussfolgerung

Untersuchungen an isolierten Gehirnkapillaren können künftig Tierversuchen zur Erforschung der Pathophysiologie der BHS vorausgehen und diese somit in ihrer Anzahl reduzieren oder diese gänzlich ersetzen. Speziesunterschiede in der Expression und Funktion von Efflux-Transportern lassen sich an diesem Modell der

BHS ausschließen oder feststellen, was vielfältige neue Strategien für die Behandlung verschiedener ZNS-Erkrankungen bietet, da sich die im häufig verwendeten Nager-Modell getroffenen Erkenntnisse dann auch auf den Menschen oder beispielsweise den Hund übertragen lassen würden.

Die Bedeutung der Arachidonsäurekaskade im Hinblick auf eine anfallsinduzierte Überfunktion des Multidrug-Transporters Pgp konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus ergeben sich neue therapeutische und präventive Ansätze durch die Möglichkeiten einer Kontrolle der Pgp-Expression bei pharmakoresistenter Epilepsie durch Glycin-Antagonismus des NMDA-Rezeptors oder deren Induktion mittels eines PGE₂-Analogons bei Morbus Alzheimer und dem pestizid-induzierten Morbus Parkinson.

An isolierten Kapillaren aus epilepsiechirurgischen Resektaten pharmakoresistenter Patienten lässt sich künftig eine mögliche Korrelation zwischen der Pgp-Expression und klinischen Parametern, wie Anfallstyp oder Therapieregime untersuchen. Ebenfalls könnte eine mögliche Rolle der Pharmakogenetik für pharmakoresistente Epilepsien im Zusammenhang mit klinischen und molekularbiologischen Befunden der einzelnen Patienten abgeklärt werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Mensch, Hund und Katze. Sie sind mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität und Lebenserwartung verbunden und führen zu einer fortschreitenden Schädigung des gesamten Nervensystems. Die wichtigste Therapieform der Epilepsie beschränkt sich nach wie vor eine medikamentelle Unterdrückung der Anfälle, eine Heilung ist bislang nicht möglich. Bei über 30% der Menschen, aber auch der Hunde oder Katzen mit Epilepsien kann durch eine medikamentelle Therapie jedoch keine ausreichende Kontrolle der Anfälle herbeigeführt werden. Diese Pharmakoresistenz stellt ein schwerwiegendes Problem dar und macht neue Therapie- und Behandlungsstrategien unbedingt erforderlich.

Es wird vermutet, dass es sich bei der Pharmakoresistenz um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Eine der in diesem Zusammenhang am häufigsten erwähnten Thesen ist die Multidrug-Transporter-Hypothese. Hier wird davon ausgegangen, dass es durch an der Blut-Hirn-Schranke überexprimierte Efflux-Transporter nicht zu einer ausreichend hohen Konzentration eines Antiepileptikums im neuronalen Gewebe kommt. Dem Multidrug-Transporter P-Glycoprotein (Pgp) wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen.

In der Vergangenheit konnte bereits in verschiedenen Nager-Modellen die zentrale Rolle der Arachidonsäurekaskade (AS-Kaskade) in den Prozessen einer anfallsinduzierten Hochregulation des Pgp nachgewiesen werden. Insbesondere die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der EP1-Rezeptor scheinen wichtige Zielstrukturen für neue therapeutische Strategien zur Überwindung transportervermittelter Pharmakoresistenz zu sein. Während in einigen der Studien antikonvulsive und neuroprotektive Effekte einer Blockade der AS-Kaskade verzeichnet werden konnten, wurde in anderen eine Progression der Anfälle beobachtet. Deshalb bestand die Notwendigkeit, die Verträglichkeit der Substanzen, die bisher in Tiermodellen zum Einsatz kamen, im Hinblick auf negative ZNS-Effekte zu untersuchen. Das Amygdala-Kindling-Modell besitzt eine hervorragende prädiktive Validität für sowohl anti- als auch prokonvulsive Effekte von Substanzen, ebenso für Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen, wie die Temporallappenepilepsie (TLE). Aus diesem Grund ist es besonders gut für die Untersuchung anfallsmodulierender Wirkungen von Substanzen, die die AS-Kaskade beeinflussen können, geeignet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte der beiden selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und NS-398 sowie des selektiven EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 und des PGE₂-Analogons Misoprostol auf gekindelte Anfälle im Amygdala-Kindling-Modell an Mäusen untersucht.

Unter den COX-2-Hemmern Celecoxib und NS-398 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Anfallsschwellen, Anfallsschwere, Anfallsdauer sowie der postiktalen Phase. Pro- bzw. antikonvulsive Effekte konnten demnach weder unter der Wirkung von Celecoxib noch unter der des noch stärker COX-2-selektiven NS-398 festgestellt werden. Der selektive EP1-Rezeptor-Antagonist SC-51089 nahm zwar keinen Einfluss auf die Anfallsschwellen der gekindelten Anfälle, die Anfallsschwere reduzierte sich jedoch durch 30 mg/kg KGW und 60 min Vorbehandlungszeit signifikant. Die Anfallsdauer hingegen wurde signifikant erhöht, wenn 30 mg/kg KGW SC-51089 30 bzw. 60 min vor der Schwellenbestimmung verabreicht wurden.

Um die Erkenntnisse, die unter einer Behandlung mit dem EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089 gewonnen wurden, weiter zu vertiefen, wurden die Effekte des PGE₂-Derivates Misoprostol, welches am EP1-Rezeptor agonistisch wirkt, untersucht. Dabei zeigten sich gegenteilige Effekte zum SC-51089, nämlich eine Reduktion der Anfallsdauer.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sowohl COX-2-Hemmer als auch EP1-Rezeptor-Antagonisten bei der Behandlung von Epilepsien in Dosierungen, die eine anfallsassoziierte Hochregulation von Pgp verhindern können, keine relevanten negativen Effekte auf die Anfallskontrolle haben. Die Ergebnisse bezüglich SC-51089 deuten darauf hin, dass eine Modulation des EP1-Rezeptors womöglich endogene Mechanismen der Anfallsterminierung beeinflussen kann. Deshalb sollten weitere Verträglichkeitstests sowie Untersuchungen der Signaltransduktion von EP1-Rezeptoren auch an neuronalen Zellen durchgeführt werden.

In den vergangenen Jahren konnten zentrale Schlüsselfaktoren in der Regulation des Arzneimitteltransporters Pgp in Gehirnkapillaren identifiziert werden. Entsprechend dieser Untersuchungen scheint eine glutamatvermittelte Aktivierung der AS-Kaskade wesentlich zur Induktion von Pgp im epileptischen Gehirn beizutragen. Durch eine pharmakologische Blockade der Signalprozesse gelang es im Tiermodell die Gehirngängigkeit von Antiepileptika zu verbessern und Pharmakoresistenz zu überwinden. Ungeklärt war bislang, ob durch eine

pharmakologische Modulation der Signalprozesse auch eine Induktion von Pgp erzielt werden kann. Im Weiteren stellte sich die Frage, ob die bisherigen Erkenntnisse zur Regulation von Pgp auf die humane Pgp-Isoform übertragen werden können.

Zur weiterführenden Untersuchung der Regulation von Pgp wurden Versuche an frisch isolierten porcinen und humanen Gehirnkapillaren durchgeführt. Substanzen, die zum Einsatz kamen, umfassten den selektiven COX-2-Hemmer Celecoxib, den selektiven EP1-Rezeptor-Antagonisten SC-51089, das PGE₂-Analogon Misoprostol sowie L-701.324, einen Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors. Die Pgp-Transportfunktion wurde durch Anreicherung eines fluoreszenzmarkierten Pgp-Substrates im Kapillarlumen mithilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bestimmt.

In porcinen Gehirnkapillaren konnte durch Inkubation mit Misoprostol eine konzentrationsabhängige Induktion der Pgp-Expression erzielt werden. Dieser Effekt wurde durch SC-51089 wirksam antagonisiert. Eine Co-Inkubation der Kapillaren mit L-701.324 konnte eine glutamatvermittelte Induktion von Pgp verhindern. In humanen Kapillaren gelang es, funktionelle Transportuntersuchungen durchzuführen und erste Hinweise dafür zu erzielen, dass Glutamat und die COX-2 die Expression von humanem Pgp erhöhen. Celecoxib verhinderte dabei die glutamatinduzierte Hochregulation von Pgp in isolierten humanen Gehirnkapillaren.

Die sogenannten Glycin-Antagonisten wie L-701.324 bieten Möglichkeiten für neue therapeutische Konzepte einer Add-on-Therapie zur Überwindung von Pharmakoresistenz. Neben der Kontrolle der Pgp-Expression durch einen EP1-Rezeptor-Antagonismus, eröffnet die Pgp-Induktion durch ein PGE₂-Analogon mögliche Strategien zur Therapie von ZNS-Erkrankungen, bei denen eine Unterfunktion des Pgp vermutet wird wie beim Morbus Alzheimer und dem pestizidinduzierten Morbus Parkinson.

Die Bedeutung von Glutamat und der Arachidonsäurekaskade für die Regulation von Pgp konnte durch diese Studie erstmals für die humane Pgp-Isoform dargestellt werden, was eine Vielzahl neuer Strategien zur Therapie pharmakoresistenter Epilepsien eröffnet.

8 SUMMARY

Epilepsy is the most common chronic neurological disease in humans and animals, such as dogs and cats. It is associated with considerable limitations in quality of life and lifespan and leads to progressive brain damage. At present the therapy of this disease is restricted to the treatment with antiepileptic drugs since a real cure is not possible. However, one third of all human and veterinary patients with epilepsy are affected by seizures despite of the drug treatment. This intractable type of epilepsy remains a major, unsolved problem and necessitates new therapeutic strategies.

Pharmacoresistance is supposed to be a multifactorial process. There is cumulating evidence that a seizure-induced overexpression of multidrug transporters at the blood brain barrier contributes to limited brain access of antiepileptic drugs and insufficient concentrations of antiepileptic drugs in the epileptic tissue. The multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp) seems to be of specific relevance in association with intractable epilepsy.

In different rodent studies a central role of the arachidonic acid cascade for seizure-induced up-regulation of Pgp became evident. In particular, the cyclooxygenase-2 (COX-2) and the prostaglandin E2 receptor EP1 seem to be important targets for new therapeutic strategies to overcome transporter-induced pharmacoresistance. Whereas several of these studies indicated that blocking the cascade exerts beneficial effects, others described aggravation of seizures. Therefore, translational development of respective add-on approaches requires further tolerability testing. The amygdala kindling model has a high predictive validity for both, anticonvulsant and proconvulsant effects in epilepsies with complex focal seizures as the temporal lobe epilepsy, and was therefore considered as the optimal model to further explore the impact of compounds that target arachidonic acid signalling.

In the first part of this study the effects on kindled seizures of the COX-2 inhibitors celecoxib and NS-398 as well as the prostaglandin E2 EP1 receptor antagonist SC-51089 and the prostaglandin E2 derivate misoprostol were tested in fully kindled mice. The COX-2 inhibitors celecoxib and NS-398 did neither affect seizure thresholds nor seizure severity or duration. SC-51089 dose-dependently decreased the seizure severity, effects being significantly different from control data at 10 and 30 mg/kg with a pretreatment time of 60 min. There was no significant effect on the seizure threshold by SC-51089. Seizure duration was significantly increased by 30 mg/kg SC-51089 and a pretreatment time of 30 and 60 min respectively.

To confirm the results obtained from the treatment with the EP1 receptor antagonist SC-51089, we evaluated the effects of the prostaglandin E2 derivative misoprostol which acts as an EP1 receptor agonist. In this case, a reduction of seizure duration was observed.

In conclusion there were no proconvulsant effects observed under both COX-2-inhibitors and the EP1 receptor antagonist SC-51089 in dosages that can prevent seizure induced up-regulation of Pgp. The results concerning SC-51089 indicate a role of EP1 receptors in endogenous mechanisms of seizure termination. Therefore, additional tolerability testings as well as analyses of EP1 signalling pathways in neuronal cells should be taken into account.

During the last years main factors of the regulatory pathway of Pgp have been identified in isolated brain capillaries. Related to these findings a glutamate-induced activation of the arachidonic acid cascade seems to make a major contribution to up-regulate Pgp in the epileptic brain. Pharmacological blocking of the signalling pathway resulted in higher penetration levels of antiepileptic drugs into the brain and overcoming pharmacoresistance. However, it was not clear so far if a pharmacological modulation of the cascade can lead to an induction of Pgp. In addition it was still unknown if former results also apply to the human Pgp isoform.

To further investigate the regulation of Pgp, freshly isolated human and porcine brain capillaries were used for experiments. Drugs used included the selective COX-2-inhibitor celecoxib, the selective EP1-receptor antagonist SC-51089, the prostaglandin E2 derivative misoprostol, and the glycine-site NMDA-receptor-antagonist L-701.324. The Pgp-mediated transport of a fluorescent Pgp-substrate into the capillary lumen was measured by confocal laser-scanning microscopy. In porcine brain capillaries a concentration-dependent induction of Pgp expression has been activated by incubation with misoprostol. Furthermore, co-incubation with L-701.324 prevented the glutamate-induced up-regulation of Pgp. We also succeeded in performing transport experiments in human brain capillaries, in which glutamate increased the Pgp expression whereas celecoxib blocked the glutamate-induced up-regulation of the efflux transporter.

Glycine-antagonists like L-701.324 offer opportunities for new strategies of an add-on therapy to overcome pharmacoresistance. Beside the control of the Pgp-expression by antagonising the EP1-receptor the induction of Pgp by an activation of this receptor opens up new vistas in the treatment of central nervous system diseases

caused by hypofunction of Pgp like pesticide-induced Morbus Parkinson or Morbus Alzheimer. For the first time the impact of glutamate and the arachidonic acid cascade on the regulation of Pgp has been shown for the human Pgp-isoform in this study.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT, N. J. (2002):

Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability.
J Anat 200, 629-638

ABBOTT, N. J., L. RONNBACK u. E. HANSSON (2006):

Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.
Nat Rev Neurosci 7, 41-53

ABE, T., A. KUNZ, M. SHIMAMURA, P. ZHOU, J. ANRATHER u. C. IADECOLA (2009):

The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic.
J Cereb Blood Flow Metab 29, 66-72

AGNELLO, K. A., L. R. REYNOLDS u. S. C. BUDSBERG (2005):

In vivo effects of tepoxalin, an inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase, on prostanoid and leukotriene production in dogs with chronic osteoarthritis.
Am J Vet Res 66, 966-972

AHMAD, A. S., M. AHMAD, A. J. DE BRUM-FERNANDES u. S. DORE (2005):

Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity.
Brain Res 1066, 71-77

AK, H., B. AY, T. TANRIVERDI, G. Z. SANUS, M. IS, M. SAR, B. OZ, C. OZKARA, E. OZYURT u. M. UZAN (2007):

Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in patients with focal cortical dysplasia.
Seizure 16, 493-503

ALDENKAMP, A. P., W. C. OVERWEG-PLANDSOEN u. J. ARENDS (1999):

An open, nonrandomized clinical comparative study evaluating the effect of epilepsy on learning.
J Child Neurol 14, 795-800

ALLEN, D. D. u. W. J. GELDENHUYS (2006):

Molecular modeling of blood-brain barrier nutrient transporters: in silico basis for evaluation of potential drug delivery to the central nervous system.
Life Sci 78, 1029-1033

ANTONELLI-ORLIDGE, A., K. B. SAUNDERS, S. R. SMITH u. P. A. D'AMORE (1989):

An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes.
Proc Natl Acad Sci U S A 86, 4544-4548

ARIAS, C., I. ARRIETA u. R. TAPIA (1995):

beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices.
J Neurosci Res 41, 561-566

- ARONICA, E., J. A. GORTER, G. H. JANSEN, C. W. VAN VEELLEN, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER u. D. TROOST (2003): Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 118, 417-429
- ARONICA, E., F. OZBAS-GERCEKER, S. REDEKER, M. RAMKEMA, W. G. SPLIET, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, J. A. GORTER u. D. TROOST (2004): Expression and cellular distribution of high- and low-affinity neurotrophin receptors in malformations of cortical development. *Acta Neuropathol* 108, 422-434
- BACHMEIER, C. J., W. J. TRICKLER u. D. W. MILLER (2006): Comparison of drug efflux transport kinetics in various blood-brain barrier models. *Drug Metab Dispos* 34, 998-1003
- BAGLEY, R. (2005): Clinical Evaluation and Management of Animals with Seizures. In: *Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology*. Oxford Blackwell Publishing; 2005 p. 363-76.
- BAIK, E. J., E. J. KIM, S. H. LEE u. C. MOON (1999): Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 843, 118-129
- BANKSTAHL, J. P., K. HOFFMANN, K. BETHMANN u. W. LOSCHER (2008): Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology* 54, 1006-1016
- BARANANO, D. E., C. D. FERRIS u. S. H. SNYDER (2001): Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24, 99-106
- BARTELS, A. L., R. KORTEKAAS, J. BART, A. T. WILLEMSSEN, O. L. DE KLERK, J. J. DE VRIES, J. C. VAN OOSTROM u. K. L. LEENDERS (2009): Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 30, 1818-1824
- BARTELS, A. L., A. T. WILLEMSSEN, R. KORTEKAAS, B. M. DE JONG, R. DE VRIES, O. DE KLERK, J. C. VAN OOSTROM, A. PORTMAN u. K. L. LEENDERS (2008): Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *J Neural Transm* 115, 1001-1009
- BAUER, B., A. M. HARTZ, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2004): Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 66, 413-419
- BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2008): Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling.

Mol Pharmacol 73, 1444-1453

BAZAN, N. G., V. L. MARCHESSELLI u. K. COLE-EDWARDS (2005):
Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling.
Ann N Y Acad Sci 1053, 137-147

BEGLEY, D. J., D. LECHARDEUR, Z. D. CHEN, C. ROLLINSON, M. BARDOUL, F. ROUX,
D. SCHERMAN u. N. J. ABBOTT (1996):
Functional expression of P-glycoprotein in an immortalised cell line of rat brain endothelial
cells, RBE4.
J Neurochem 67, 988-995

BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, D. RICHE, G. GHILINI u. R. NAQUET (1981):
Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic
acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with
special reference to the pathology of epilepsy.
Neuroscience 6, 1361-1391

BENCE, A. K., D. T. ROGERS, D. R. WORTHEN, M. FU, J. M. LITTLETON u. P. A.
CROOKS (2000):
Aminoanthraquinones as novel ligands at the polyamine binding site on the N-methyl-D-
aspartate receptor complex.
Bioorg Med Chem Lett 10, 2621-2623

BERETTA, C., G. GARAVAGLIA u. M. CAVALLI (2005):
COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and
meloxicam: an in vitro analysis.
Pharmacol Res 52, 302-306

BILAK, M., L. WU, Q. WANG, N. HAUGHEY, K. CONANT, C. ST HILLAIRE u. K.
ANDREASSON (2004):
PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis.
Ann Neurol 56, 240-248

BLUMER, D. (2002):
Psychiatric aspects of intractable epilepsy.
Adv Exp Med Biol 497, 133-147

BOBADILLA, R. V., E. M. BARNETT u. C. L. RANDELS (2005):
COX-2 inhibitors and the heart: putting risk in perspective.
Adv Nurse Pract 13, 48-50

BRAUNER-OSBORNE, H., J. EGEBJERG, E. O. NIELSEN, U. MADSEN u. P.
KROGSGAARD-LARSEN (2000):
Ligands for glutamate receptors: design and therapeutic prospects.
J Med Chem 43, 2609-2645

BREIER, J. I., P. M. PLENGER, R. CASTILLO, K. FUCHS, J. W. WHELESS, A. B.
THOMAS, B. L. BROOKSHIRE, L. J. WILLMORE u. A. PAPANICOLAOU (1996):
Effects of temporal lobe epilepsy on spatial and figural aspects of memory for a complex
geometric figure.
J Int Neuropsychol Soc 2, 535-540

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):
Epilepsy.
N Engl J Med 344, 1145-1151

- CAMPBELL, J. D., K. KOIKE, C. MOREAU, M. S. SANSOM, R. G. DEELEY u. S. P. COLE (2004):
Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1).
J Biol Chem 279, 463-468
- CERVOS NAVARRO, J. (1963):
[Electron Microscopic Findings in the Capillaries of the Cerebral Cortex.].
Arch Psychiatr Nervenkr 204, 484-504
- CHANG, MELLOR u. ANDERSON (2006):
Idiopathic epilepsy in dogs: owners' perspectives on management with phenobarbitone and/or potassium bromide.
J Small Anim Pract 47, 574-581
- CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):
Epilepsy.
N Engl J Med 349, 1257-1266
- CHEN, Y., G. DALWADI u. H. A. BENSON (2004):
Drug delivery across the blood-brain barrier.
Curr Drug Deliv 1, 361-376
- CHIBA, T., K. SATO, N. KUDARA, H. SHINOZAKI, K. IKEDA, M. ENDO, S. ORII u. K. SUZUKI (2008):
Upper gastrointestinal disorders induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Inflammopharmacology 16, 16-20
- CIRRITO, J. R., R. DEANE, A. M. FAGAN, M. L. SPINNER, M. PARSADANIAN, M. B. FINN, H. JIANG, J. L. PRIOR, A. SAGARE, K. R. BALES, S. M. PAUL, B. V. ZLOKOVIC, D. PIWNICA-WORMS u. D. M. HOLTZMAN (2005):
P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model.
J Clin Invest 115, 3285-3290
- CLAUDE, P. u. D. A. GOODENOUGH (1973):
Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia.
J Cell Biol 58, 390-400
- COLE-EDWARDS, K. K. u. N. G. BAZAN (2005):
Lipid signaling in experimental epilepsy.
Neurochem Res 30, 847-853
- CULL-CANDY, S., S. BRICKLEY u. M. FARRANT (2001):
NMDA receptor subunits: diversity, development and disease.
Curr Opin Neurobiol 11, 327-335
- DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.
Curr Opin Neurol 14, 187-192
- DALBY, N. O. u. E. B. NIELSEN (1997):
Comparison of the preclinical anticonvulsant profiles of tiagabine, lamotrigine, gabapentin and vigabatrin.
Epilepsy Res 28, 63-72

- DANYSZ, W. u. C. G. PARSONS (1998):
Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications.
Pharmacol Rev 50, 597-664
- DE BOER, A. G. u. P. J. GAILLARD (2007):
Strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier.
Clin Pharmacokinet 46, 553-576
- DEAN, M. u. R. ALLIKMETS (2001):
Complete characterization of the human ABC gene family.
J Bioenerg Biomembr 33, 475-479
- DEWEY, C. W., S. CERDA-GONZALEZ, J. M. LEVINE, B. L. BADGLEY, J. M. DUCOTE, G. M. SILVER, J. J. COOPER, R. A. PACKER u. J. A. LAVELY (2009):
Pregabalin as an adjunct to phenobarbital, potassium bromide, or a combination of phenobarbital and potassium bromide for treatment of dogs with suspected idiopathic epilepsy.
J Am Vet Med Assoc 235, 1442-1449
- DINGLEDINE, R., K. BORGES, D. BOWIE u. S. F. TRAYNELIS (1999):
The glutamate receptor ion channels.
Pharmacol Rev 51, 7-61
- DINGLEDINE, R., C. J. MCBAIN u. J. O. MCNAMARA (1990):
Excitatory amino acid receptors in epilepsy.
Trends Pharmacol Sci 11, 334-338
- DROZDZIK, M., M. BIALECKA, K. MYSLIWIEC, K. HONCZARENKO, J. STANKIEWICZ u. Z. SYCH (2003):
Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease.
Pharmacogenetics 13, 259-263
- EISENBLATTER, T. u. H. J. GALLA (2002):
A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier.
Biochem Biophys Res Commun 293, 1273-1278
- ERBEN, M., S. DECKER, H. FRANKE u. H. J. GALLA (1995):
Electrical resistance measurements on cerebral capillary endothelial cells--a new technique to study small surface areas.
J Biochem Biophys Methods 30, 227-238
- ERDOGAN, F., A. GOLGELI, A. KUCUK, F. ARMAN, Y. KARAMAN u. A. ERSOY (2005):
Effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory and learning in immature rats.
Epilepsy Behav 6, 537-542
- FISCHER, A. (1995):
Seizure disorders in the dog. 1. Clinical features and differential diagnosis.
Tierärztl Prax. 1995 Dec; 23(6): 596-602.
- FISHER, R. S. (1989):
Animal models of the epilepsies.
Brain Res Brain Res Rev 14, 245-278

- FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):
Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).
Epilepsia 46, 470-472
- FOX, E. u. S. E. BATES (2007):
Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor.
Expert Rev Anticancer Ther 7, 447-459
- FRANK, R. N., S. DUTTA u. M. A. MANCINI (1987):
Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat.
Invest Ophthalmol Vis Sci 28, 1086-1091
- FRANKLIN, K. B. J. u. PAXINOS, G. (2003):
The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition.
Academic Press; 2 edition (December 8, 2003).
- FRAUNFELDER, F. W., J. SOLOMON u. T. J. MEHELAS (2006):
Ocular adverse effects associated with cyclooxygenase-2 inhibitors.
Arch Ophthalmol 124, 277-279
- FRAY, M. J., D. J. BULL, C. L. CARR, E. C. GAUTIER, C. E. MOWBRAY u. A. STOBIE (2001):
Structure-activity relationships of 1,4-dihydro-(1H,4H)-quinoxaline-2,3-diones as N-methyl-D-aspartate (glycine site) receptor antagonists. 1. Heterocyclic substituted 5-alkyl derivatives.
J Med Chem 44, 1951-1962
- FROMM, M. F. (2004):
Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.
Trends Pharmacol Sci 25, 423-429
- FURUNO, T., M. T. LANDI, M. CERONI, N. CAPORASO, I. BERNUCCI, G. NAPPI, E. MARTIGNONI, E. SCHAEFFELER, M. EICHELBAUM, M. SCHWAB u. U. M. ZANGER (2002):
Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease.
Pharmacogenetics 12, 529-534
- GAILLARD, P. J., L. H. VOORWINDEN, J. L. NIELSEN, A. IVANOV, R. ATSUMI, H. ENGMAN, C. RINGBOM, A. G. DE BOER u. D. D. BREIMER (2001):
Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes.
Eur J Pharm Sci 12, 215-222
- GENNUSO, F., C. FERNETTI, C. TIROLO, N. TESTA, F. L'EPISCOPO, S. CANIGLIA, M. C. MORALE, J. D. OSTROW, L. PASCOLO, C. TIRIBELLI u. B. MARCHETTI (2004):
Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-regulation and translocation of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1).
Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2470-2475
- GHERSI-EGEA, J. F. u. N. STRAZIELLE (2001):
Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus.
Microsc Res Tech 52, 83-88

- GILLIAM, F., H. HECIMOVIC u. Y. SHELINE (2003):
Psychiatric comorbidity, health, and function in epilepsy.
Epilepsy Behav 4 Suppl 4, S26-30
- GODDARD, G. V. (1969):
Analysis of avoidance conditioning following cholinergic stimulation of amygdala in rats.
J Comp Physiol Psychol 68, 1-18
- GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Exp Neurol 25, 295-330
- GOLDSTEIN, G. W., A. L. BETZ, P. D. BOWMAN u. K. DOROVINI-ZIS (1986a):
In vitro studies of the blood-brain barrier using isolated brain capillaries and cultured endothelial cells.
Ann N Y Acad Sci 481, 202-213
- GOLDSTEIN, G. W., A. L. BETZ, P. D. BOWMAN u. K. DOROVINI-ZIS (1986b):
In vitro studies of the blood-brain barrier using isolated brain capillaries and cultured endothelial cells.
Ann NY Acad Sci 1986;481:202-13.
- GOLDSTEIN, G. W., J. S. WOLINSKY u. J. CSEJTEY (1977):
Isolated brain capillaries: a model for the study of lead encephalopathy.
Ann Neurol 1, 235-239
- GRAFF, C. L. u. G. M. POLLACK (2005):
Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier.
Pharm Res 22, 86-93
- HAMM, S., B. DEHOUCK, J. KRAUS, K. WOLBURG-BUCHHOLZ, H. WOLBURG, W. RISAU, R. CECHELLI, B. ENGELHARDT u. M. P. DEHOUCK (2004):
Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts.
Cell Tissue Res 315, 157-166
- HARTZ, A. M., D. S. MILLER u. B. BAUER (2010):
Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease.
Mol Pharmacol 77, 715-723
- HASELOFF, R. F., I. E. BLASIG, H. C. BAUER u. H. BAUER (2005):
In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro.
Cell Mol Neurobiol 25, 25-39
- HATA, A. N. u. R. M. BREYER (2004):
Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.
Pharmacol Ther 103, 147-166
- HEIM, H. K. u. K. BROICH (2006):
Selective COX-2 inhibitors and risk of thromboembolic events - regulatory aspects.
Thromb Haemost 96, 423-432

- HELMSTAEDTER, C. u. C. E. ELGER (2000):
Behavioral markers for self- and other-attribution of memory: a study in patients with temporal lobe epilepsy and healthy volunteers.
Epilepsy Res 41, 235-243
- HELMSTAEDTER, C., C. POHL, A. HUFNAGEL u. C. E. ELGER (1991):
Visual learning deficits in nonresected patients with right temporal lobe epilepsy.
Cortex 27, 547-555
- HENDERSON, A. J., I. J. HACKETT, H. GANZ u. C. JUSTUS (1994):
Klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von Metacam.
Prakt Tierarzt 3: 179-189, 1994.
- HIGGINS, C. F. u. K. J. LINTON (2004):
The ATP switch model for ABC transporters.
Nat Struct Mol Biol 11, 918-926
- HOLMES, G. L. (2002):
Seizure-induced neuronal injury: animal data.
Neurology 59, S3-6
- HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.
Science 220, 323-325
- HUFNAGEL, A. (2000):
Epilepsien und ihre Therapie.
Unimed Bremen.
- HULS, M., F. G. RUSSEL u. R. MASEREEUW (2009):
The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration.
J Pharmacol Exp Ther 328, 3-9
- JACOBY, A., G. A. BAKER, N. STEEN, P. POTTS u. D. W. CHADWICK (1996):
The clinical course of epilepsy and its psychosocial correlates: findings from a U.K. Community study.
Epilepsia 37, 148-161
- JANSEN, M. u. G. DANNHARDT (2003):
Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDA receptor for therapeutic interventions.
Eur J Med Chem 38, 661-670
- JETTE, L., B. TETU u. R. BELIVEAU (1993):
High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries.
Biochim Biophys Acta 1150, 147-154
- JOO, F. (1986):
The blood-brain barrier. New aspects to the function of the cerebral endothelium.
Nature 321, 197-198
- KANNER, A. M. (2003):
Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment.
Biol Psychiatry 54, 388-398

- KANNER, A. M., S. STAGNO, P. KOTAGAL u. H. H. MORRIS (1996):
Postictal psychiatric events during prolonged video-electroencephalographic monitoring studies.
Arch Neurol 53, 258-263
- KATAYAMA, S., N. AE u. R. NAGATA (2001):
Synthesis of tricyclic indole-2-carboxylic [correction of caboxylic] acids as potent NMDA-glycine antagonists.
J Org Chem 66, 3474-3483
- KAWAGUCHI, K., R. W. HICKEY, M. E. ROSE, L. ZHU, J. CHEN u. S. H. GRAHAM (2005):
Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus.
Brain Res 1050, 130-137
- KAWANO, T., J. ANRATHER, P. ZHOU, L. PARK, G. WANG, K. A. FRY, A. KUNZ, S. CHO, M. ORIO u. C. IADECOLA (2006):
Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity.
Nat Med 12, 225-229
- KIM, D. K. u. T. J. JANG (2006):
Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure.
Int J Exp Pathol 87, 73-78
- KIM, H. J., J. I. CHUNG, S. H. LEE, Y. S. JUNG, C. H. MOON u. E. J. BAIK (2008):
Involvement of endogenous prostaglandin F2alpha on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors.
Brain Res 1193, 153-161
- KIM, Y. S., K. P. KIM, H. J. RHEE, S. DAS, J. D. RAFTER, Y. S. OH u. W. CHO (2002):
Internalized group V secretory phospholipase A2 acts on the perinuclear membranes.
J Biol Chem 277, 9358-9365
- KOENIG, H., J. J. TROUT, A. D. GOLDSTONE u. C. Y. LU (1992):
Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown.
Brain Res 588, 297-303
- KOHL, B. K. u. G. DANNHARDT (2001):
The NMDA receptor complex: a promising target for novel antiepileptic strategies.
Curr Med Chem 8, 1275-1289
- KONDO, T., S. IMAIZUMI, I. KATO u. T. YOSHIMOTO (1994):
Isolation and culture of brain endothelial cells and establishment of in vitro blood-brain barrier model.
Cell Transplant 3 Suppl 1, S35-37
- KORTEKAAS, R., K. L. LEENDERS, J. C. VAN OOSTROM, W. VAALBURG, J. BART, A. T. WILLEMSSEN u. N. H. HENDRIKSE (2005):
Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo.
Ann Neurol 57, 176-179
- KRAUSE, D., J. KUNZ u. R. DERMIETZEL (1993):
Cerebral pericytes--a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism.
Adv Exp Med Biol 331, 149-152

KROLL, R. A., M. A. PAGEL, L. L. MULDOON, S. ROMAN-GOLDSTEIN, S. A. FIAMENGO u. E. A. NEUWELT (1998):

Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers.

Neurosurgery 43, 879-886; discussion 886-879

KUBOVA, H. u. S. L. MOSHE (1994):

Experimental models of epilepsy in young animals.

J Child Neurol 9 Suppl 1, S3-11

KULKARNI, S. K. u. A. DHIR (2009):

Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application.

Drugs Today (Barc) 45, 135-154

KUNZ, T., N. MARKLUND, L. HILLERED u. E. H. OLIW (2005):

Assessment of the effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on visuospatial learning and hippocampal cell death following kainate-induced seizures in the rat.

Brain Res Cogn Brain Res 25, 826-832

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

Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.

Expert Rev Neurother 6, 397-406

LAI, B. C., S. A. MARION, K. TESCHKE u. J. K. TSUI (2002):

Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease.

Parkinsonism Relat Disord 8, 297-309

LASCELLES, B. D., A. T. BLIKSLAGER, S. M. FOX u. D. REECE (2005):

Gastrointestinal tract perforation in dogs treated with a selective cyclooxygenase-2 inhibitor: 29 cases (2002-2003).

J Am Vet Med Assoc 227, 1112-1117

LECHARDEUR, D. u. D. SCHERMAN (1995):

Functional expression of the P-glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells.

Cell Biol Toxicol 11, 283-293

LEE, C. G., K. TANG, Y. B. CHEUNG, L. P. WONG, C. TAN, H. SHEN, Y. ZHAO, R.

PAVANNI, E. J. LEE, M. C. WONG, S. S. CHONG u. E. K. TAN (2004):

MDR1, the blood-brain barrier transporter, is associated with Parkinson's disease in ethnic Chinese.

J Med Genet 41, e60

LEE, G. u. R. BENDAYAN (2004):

Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders.

Pharm Res 21, 1313-1330

LEVIN, V. A. (1980):

Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability.

J Med Chem 23, 682-684

LI, J., X. LIANG, Q. WANG, R. M. BREYER, L. MCCULLOUGH u. K. ANDREASSON (2008):
Misoprostol, an anti-ulcer agent and PGE2 receptor agonist, protects against cerebral
ischemia.
Neurosci Lett 438, 210-215

LIENERT, G. A. u. U. RAATZ (1998):
Testaufbau und Testanalyse.
Beltz PsychologieVerlagsUnion. 6. Auflage.,

LING, V. (1987):
Multidrug resistance and P-glycoprotein expression.
Ann N Y Acad Sci 507, 7-8

LIU, X., Z. YANG, J. YANG u. H. YANG (2007):
Increased P-glycoprotein expression and decreased phenobarbital distribution in the brain of
pentylentetrazole-kindled rats.
Neuropharmacology 53, 657-663

LOHMANN, C. (2003):
Die Blut-Hirn-Schranke in vitro.
Dissertation aus dem Institut für Biochemie, Universität zu Münster.

LOSCHER, W. (1997):
Animal models of intractable epilepsy.
Prog Neurobiol 53, 239-258

LOSCHER, W. (1998):
Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy.
Prog Neurobiol 54, 721-741

LOSCHER, W. (2002):
Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying
drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of
temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 50, 105-123

LOSCHER, W. (2003):
Pharmakologische Grundlagen zur Behandlung der Epilepsie bei Hund und Katze.
Praktischer Tierarzt 84: 8, 574–586 (2003); © Schlütersche GmbH & Co.KG, Verlag und
Druckerei; ISSN 0032-681 X

LOSCHER, W., R. JACKEL u. S. J. CZUCZWAR (1986):
Is amygdala kindling in rats a model for drug-resistant partial epilepsy?
Exp Neurol 93, 211-226

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):
Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.
J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005a):
Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family.
NeuroRx 2, 86-98

LOSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005b):
Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.
Nat Rev Neurosci 6, 591-602

- LOSCHER, W., P. WLAZ u. L. SZABO (1998):
Focal ischemia enhances the adverse effect potential of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in rats.
Neurosci Lett 240, 33-36
- LOSCHMANN, P. A., K. W. LANGE, M. KUNOW, K. J. RETTIG, P. JAHNIG, T. HONORE, L. TURSKI, H. WACHTEL, P. JENNER u. C. D. MARSDEN (1991):
Synergism of the AMPA-antagonist NBQX and the NMDA-antagonist CPP with L-dopa in models of Parkinson's disease.
J Neural Transm Park Dis Dement Sect 3, 203-213
- LYNCH, D. R. u. R. P. GUTTMANN (2001):
NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology.
Curr Drug Targets 2, 215-231
- MACIEJAK, P., J. SZYNDLER, D. TURZYNSKA, A. SOBOLEWSKA, E. TARACHA, A. SKORZEWSKA, M. LEHNER, A. BIDZINSKI u. A. PLAZNIK (2009):
Time course of changes in the concentration of kynurenic acid in the brain of pentylenetetrazol-kindled rats.
Brain Res Bull 78, 299-305
- MADARA, J. L. (1988):
Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated?
Cell 53, 497-498
- MAJAK, K. u. A. PITKANEN (2004):
Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies.
Epilepsy Behav 5 Suppl 1, S35-44
- MÄRTEN, S. (2004):
Proteomanalyse der Blut-Hirn-Schranke.
Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt.
- MATSUDA, K., Y. KAMIYA, S. MATSUDA u. M. YUZAKI (2002):
Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability.
Brain Res Mol Brain Res 100, 43-52
- MATTSON, M. P., B. CHENG, D. DAVIS, K. BRYANT, I. LIEBERBURG u. R. E. RYDEL (1992):
beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity.
J Neurosci 12, 376-389
- MAWATARI, K., Y. YASUI, K. SUGITANI, T. TAKADERA u. S. KATO (1996):
Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via xc antiporter system.
Neuroscience 73, 201-208
- MAZARATI, A. M. u. C. G. WASTERLAIN (1999):
N-methyl-D-aspartate receptor antagonists abolish the maintenance phase of self-sustaining status epilepticus in rat.
Neurosci Lett 265, 187-190

- MCCANN, M. E., D. R. ANDERSEN, D. ZHANG, C. BRIDEAU, W. C. BLACK, P. D. HANSON u. G. J. HICKEY (2004):
In vitro effects and in vivo efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in dogs with experimentally induced synovitis.
Am J Vet Res 65, 503-512
- MCCULLOUGH, L., L. WU, N. HAUGHEY, X. LIANG, T. HAND, Q. WANG, R. M. BREYER u. K. ANDREASSON (2004):
Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia.
J Neurosci 24, 257-268
- MCINTYRE, D. C. u. K. L. GILBY (2008):
Mapping seizure pathways in the temporal lobe.
Epilepsia 49 Suppl 3, 23-30
- MCINTYRE, D. C. u. K. L. GILBY (2009):
Kindling as a model of human epilepsy.
Can J Neurol Sci 36 Suppl 2, S33-35
- MCNAMARA, J. O. (1984):
Kindling: an animal model of complex partial epilepsy.
Ann Neurol 16 Suppl, S72-76
- MCNAMARA, J. O. (1994):
Cellular and molecular basis of epilepsy.
J Neurosci 14, 3413-3425
- MCNAMARA, J. O., M. C. BYRNE, R. M. DASHEIFF u. J. G. FITZ (1980):
The kindling model of epilepsy: a review.
Prog Neurobiol 15, 139-159
- MERESSE, S., M. P. DEHOUCK, P. DELORME, M. BENSALID, J. P. TAUBER, C. DELBART, J. C. FRUCHART u. R. CECHELLI (1989):
Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture.
J Neurochem 53, 1363-1371
- MERKUS, F. W. u. M. P. VAN DEN BERG (2007):
Can nasal drug delivery bypass the blood-brain barrier?: questioning the direct transport theory.
Drugs R D 8, 133-144
- MEYER, J., U. MISCHECK, M. VEYHL, K. HENZEL u. H. J. GALLA (1990):
Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells.
Brain Res 514, 305-309
- MISHRA, O. P. u. M. DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1999):
Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain.
Brain Res Bull 48, 233-238
- NAKANISHI, S., Y. NAKAJIMA, M. MASU, Y. UEDA, K. NAKAHARA, D. WATANABE, S. YAMAGUCHI, S. KAWABATA u. M. OKADA (1998):
Glutamate receptors: brain function and signal transduction.
Brain Res Brain Res Rev 26, 230-235

- NOBMANN, S., B. BAUER u. G. FRICKER (2001):
Ivermectin excretion by isolated functionally intact brain endothelial capillaries.
Br J Pharmacol 132, 722-728
- NOREL, X. (2007):
Prostanoid receptors in the human vascular wall.
ScientificWorldJournal 7, 1359-1374
- OHTANI, K., H. TANAKA, Y. YONEDA, H. YASUDA, A. ITO, R. NAGATA u. M. NAKAMURA (2002):
In vitro and in vivo antagonistic activities of SM-31900 for the NMDA receptor glycine-binding site.
Brain Res 944, 165-173
- OHTSUKI, S., S. HORI u. T. TERASAKI (2003):
[Molecular mechanisms of drug influx and efflux transport at the blood-brain barrier].
Nippon Yakurigaku Zasshi 122, 55-64
- OLDENDORF, W. H. (1974):
Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier.
Proc Soc Exp Biol Med 147, 813-815
- OLIVEIRA, M. S., A. F. FURIAN, L. M. RAMBO, L. R. RIBEIRO, L. F. ROYES, J. FERREIRA, J. B. CALIXTO u. C. F. MELLO (2008):
Modulation of pentylene-tetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors.
Neuroscience 152, 1110-1118
- PALLIS, M., J. TURZANSKI, Y. HIGASHI u. N. RUSSELL (2002):
P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: therapeutic implications of its association with both a multidrug-resistant and an apoptosis-resistant phenotype.
Leuk Lymphoma 43, 1221-1228
- PALMER, G. C. (2001):
Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies.
Curr Drug Targets 2, 241-271
- PAOLETTI, P. u. J. NEYTON (2007):
NMDA receptor subunits: function and pharmacology.
Curr Opin Pharmacol 7, 39-47
- PARDRIDGE, W. M. (1993):
Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier.
Ann N Y Acad Sci 692, 126-137
- PARDRIDGE, W. M. (2003):
Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development.
Mol Interv 3, 90-105, 151
- PARDRIDGE, W. M., J. YANG, J. EISENBERG u. W. W. TOURTELLOTTE (1987):
Isolation of intact capillaries and capillary plasma membranes from frozen human brain.
J Neurosci Res 18, 352-357
- PEKCEC, A., B. UNKRUER, J. SCHLICHTIGER, J. SOERENSEN, A. M. HARTZ, B. BAUER, E. A. VAN VLIET, J. A. GORTER u. H. POTSCCHKA (2009):
Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation.

J Pharmacol Exp Ther 330, 939-947

PERRIN, R., A. MINN, J. F. GHERSI-EGEA, M. C. GRASSIOT u. G. SIEST (1990):
Distribution of cytochrome P450 activities towards alkoxyresorufin derivatives in rat brain
regions, subcellular fractions and isolated cerebral microvessels.
Biochem Pharmacol 40, 2145-2151

PINEL, J. P. (1981):
Kindling-induced experimental epilepsy in rats: cortical stimulation.
Exp Neurol 72, 559-569

PINEL, J. P. u. L. I. ROVNER (1978a):
Electrode placement and kindling-induced experimental epilepsy.
Exp Neurol 58, 335-346

PINEL, J. P. u. L. I. ROVNER (1978b):
Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats.
Exp Neurol 58, 190-202

PLATT, S. R., V. ADAMS, L. S. GAROSI, C. J. ABRAMSON, J. PENDERIS, A. DE STEFANI
u. L. MATIASEK (2006):
Treatment with gabapentin of 11 dogs with refractory idiopathic epilepsy.
Vet Rec 159, 881-884

PODELL, M. (2004):
Tremor, fasciculations, and movement disorders.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004 Nov;34(6):1435-52.

PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995):
Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population.
J Am Vet Med Assoc. 1995 Jun 1;206(11):1721-8.

POTSCHKA, H. (2010a):
Modulating P-glycoprotein regulation: Future perspectives for pharmaco-resistant epilepsies?
Epilepsia

POTSCHKA, H. (2010b):
Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic
approach.
Pharmacol Ther 125, 118-127

POTSCHKA, H., E. FRIDERICHS u. W. LOSCHER (2000):
Anticonvulsant and proconvulsant effects of tramadol, its enantiomers and its M1 metabolite
in the rat kindling model of epilepsy.
Br J Pharmacol 131, 203-212

POTSCHKA, H., W. LOSCHER, P. WLAZ, B. BEHL, H. P. HOFMANN, H. J. TREIBER u. L.
SZABO (1998):
LU 73068, a new non-NMDA and glycine/NMDA receptor antagonist: pharmacological
characterization and comparison with NBQX and L-701,324 in the kindling model of epilepsy.
Br J Pharmacol 125, 1258-1266

POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. A. PEKCEC (2009):
Aktueller Stand und Trends in der Epilepsithherapie bei Hund und Katze. .
Tierärztl Prax. 2009;37(K):211-7.
RACINE, R. J. (1972):

Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32, 281-294

RAINSFORD, K. D. (2007):
Anti-inflammatory drugs in the 21st century.
Subcell Biochem 42, 3-27

RACINE, R. J. (1972):
Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1972 Mar;32(3):281-94.

REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999):
Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies.
Epilepsy Res 34, 109-122

REMY, S. u. H. BECK (2006):
Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy.
Brain 129, 18-35

RIZZI, M., S. CACCIA, G. GUIISO, C. RICHICHI, J. A. GORTER, E. ARONICA, M.
ALIPRANDI, R. BAGNATI, R. FANELLI, M. D'INCALCI, R. SAMANIN u. A. VEZZANI (2002):
Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for
pharmacoresistance.
J Neurosci 22, 5833-5839

ROGAWSKI, M. A. u. M. R. JOHNSON (2008):
Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness.
Epilepsy Curr 8, 127-130

RUEHLMANN, D., M. PODELL u. P. MARCH (2001):
Treatment of partial seizures and seizure-like activity with felbamate in six dogs.
J Small Anim Pract 42, 403-408

SAMANDARI, F. u. J. K. MAI (2009):
Curriculum - Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner; 2. überarbeitete und erweiterte
Auflage.
Quintessenz Verlags-GmbH; März 2009

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990):
Kindling: basic mechanisms and clinical validity.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76, 459-472

SATTLER, R. u. M. TYMIANSKI (2000):
Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity.
J Mol Med 78, 3-13

SAUNDERS, N. R., M. D. HABGOOD u. K. M. DZIEGIELEWSKA (1999):
Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain.
Clin Exp Pharmacol Physiol 26, 11-19

SCHIEBLER, T. H. u. H. W. KORF (2007):
Anatomie.
Steinkopf Verlag; Springer Science+Business Media Heidelberg 10. Auflage, Seiten 191-193.

SCHINKEL, A. H. (1999):
P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.

Adv Drug Deliv Rev 36, 179-194

SCHLICHTIGER, J., A. PEKCEC, H. BARTMANN, P. WINTER, C. FUEST, J. SOERENSEN u. H. POTSCHKA (2010):

Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy.

Br J Pharmacol 160, 1062-1071

SCHMIDT, D. u. C. E. ELGER (1999):

Praktische Epilepsiebehandlung.

Thieme, Stuttgart.

SCHRÖDER, B. u. M. DIENER (2000):

Grundlagen der Zellphysiologie. In: Physiologie der Haustiere. Hrsg: Engelhardt W. von, Breves G.

Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart. Seiten 5 – 21.

SCHWARTZ-PORSCHKE, D. (1994):

Seizures.

Clinical syndromes in veterinary neurology, 2nd edn. Braund KG, editor. St. Louis: Mosby-Year Book; 1994. 234-251

SEIDMAN, L. J., W. S. STONE, R. JONES, R. H. HARRISON u. A. F. MIRSKY (1998):

Comparative effects of schizophrenia and temporal lobe epilepsy on memory.

J Int Neuropsychol Soc 4, 342-352

SESSA, G., M. ORLOWSKI u. J. P. GREEN (1976):

Isolation from bovine brain of a fraction containing capillaries and a fraction containing membrane fragments of the choroid plexus.

J Neurobiol 7, 51-61

SHARMA, A. K., R. Y. REAMS, W. H. JORDAN, M. A. MILLER, H. L. THACKER u. P. W. SNYDER (2007):

Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions.

Toxicol Pathol 35, 984-999

SIAKOTOS, A. N. (1974):

The isolation of endothelial cells from normal human and bovine brain.

Methods Enzymol 32, 717-722

SIMS, D. E. (2000):

Diversity within pericytes.

Clin Exp Pharmacol Physiol 27, 842-846

SISODIYA, S. M. (2003):

Mechanisms of antiepileptic drug resistance.

Curr Opin Neurol 16, 197-201

SISODIYA, S. M., W. R. LIN, B. N. HARDING, M. V. SQUIER u. M. THOM (2002):

Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy.

Brain 125, 22-31

SKOLNICK, P. (2002):

Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants.

Amino Acids 23, 153-159

SMIT, H. u. V. A. LANGMAN (1974):

A capacitive method of measuring circadian activity in laboratory animals.
Med Biol Eng 12, 831-836

SMITH, B. J., A. C. DORAN, S. MCLEAN, F. D. TINGLEY, 3RD, B. T. O'NEILL u. S. M. KAJIJI (2001):

P-glycoprotein efflux at the blood-brain barrier mediates differences in brain disposition and pharmacodynamics between two structurally related neurokinin-1 receptor antagonists.
J Pharmacol Exp Ther 298, 1252-1259

SRINIVAS, H. V. Epilepsy: The future scenario.

Ann Indian Acad Neurol 13, 2-5

STARK, H., U. REICHERT u. S. GRASSMANN (2000):

[Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 2. Therapy concepts and new receptor ligands].
Pharm Unserer Zeit 29, 228-236

STEFAN, H., F. H. LOPES DA SILVA, W. LOSCHER, D. SCHMIDT, E. PERUCCA, M. J. BRODIE, P. A. BOON, W. H. THEODORE u. S. L. MOSHE (2006):

Epileptogenesis and rational therapeutic strategies.
Acta Neurol Scand 113, 139-155

STEINLEIN, O. K. (2004):

Genetic mechanisms that underlie epilepsy.
Nat Rev Neurosci 5, 400-408

STONE, T. W. (2000):

Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection.
Trends Pharmacol Sci 21, 149-154

SUTULA, T., S. LAUERSDORF, M. LYNCH, C. JURGELLA u. A. WOODARD (1995):

Deficits in radial arm maze performance in kindled rats: evidence for long-lasting memory dysfunction induced by repeated brief seizures.
J Neurosci 15, 8295-8301

SWINKELS, W. A., J. KUYK, E. H. DE GRAAF, R. VAN DYCK u. P. SPINHOVEN (2001):

Prevalence of Psychopathology in Dutch Epilepsy Inpatients: A Comparative Study.
Epilepsy Behav 2, 441-447

SYVANEN, S., R. XIE, S. SAHIN u. M. HAMMARLUND-UDENAES (2006):

Pharmacokinetic consequences of active drug efflux at the blood-brain barrier.
Pharm Res 23, 705-717

SZYNDLER, J., P. ROK, P. MACIEJAK, J. WALKOWIAK, A. I. CZLONKOWSKA, H. SIENKIEWICZ-JAROSZ, A. WISLOWSKA, M. ZIENOWICZ, M. LEHNER, A. BIDZINSKI, W. KOSTOWSKI u. A. PLAZNIK (2002):

Effects of pentylenetetrazol-induced kindling of seizures on rat emotional behavior and brain monoaminergic systems.
Pharmacol Biochem Behav 73, 851-861

- SZYNDLER, J., T. WIERZBA-BOBROWICZ, A. SKORZEWSKA, P. MACIEJAK, J. WALKOWIAK, W. LECHOWICZ, D. TURZYNSKA, A. BIDZINSKI u. A. PLAZNIK (2005): Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 15-23
- TAKAKURA, Y., K. L. AUDUS u. R. T. BORCHARDT (1991): Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Adv Pharmacol* 22, 137-165
- TAKEMIYA, T., M. MAEHARA, K. MATSUMURA, S. YASUDA, H. SUGIURA u. K. YAMAGATA (2006): Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. *Neurosci Res* 56, 103-110
- TAN, E. K., D. K. CHAN, P. W. NG, J. WOO, Y. Y. TEO, K. TANG, L. P. WONG, S. S. CHONG, C. TAN, H. SHEN, Y. ZHAO u. C. G. LEE (2005): Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 62, 460-464
- TATSUTA, T., M. NAITO, T. OH-HARA, I. SUGAWARA u. T. TSURUO (1992): Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J Biol Chem* 267, 20383-20391
- THOMAS, H. u. H. M. COLEY (2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159-165
- THUERAUF, N. u. M. F. FROMM (2006): The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 281-286
- TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u. C. RAFFEL (1995): MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36, 1-6
- TOMKINS, O., O. FRIEDMAN, S. IVENS, C. REIFFURTH, S. MAJOR, J. P. DREIER, U. HEINEMANN u. A. FRIEDMAN (2007): Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 25, 367-377
- TOSCANO, C. D., P. J. KINGSLEY, L. J. MARNETT u. F. BOSETTI (2008): NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *Neurotoxicology* 29, 1114-1120
- 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

- TRIMBLE, M. R. (1991):
Epilepsy and behaviour.
Epilepsy Res 10, 71-79
- TSUJI, A. (2005):
Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems.
NeuroRx 2, 54-62
- UEDA, K., M. M. CORNWELL, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN, I. B. RONINSON, V. LING u. J. R. RIORDAN (1986):
The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein.
Biochem Biophys Res Commun 141, 956-962
- UENO, N., M. MURAKAMI, T. TANIOKA, K. FUJIMORI, T. TANABE, Y. URADE u. I. KUDO (2001):
Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2.
J Biol Chem 276, 34918-34927
- VAMOS, E., A. PARDUTZ, P. KLIVENYI, J. TOLDI u. L. VECSEI (2009):
The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection.
J Neurol Sci 283, 21-27
- VAN BREE, J. B., A. G. DE BOER, M. DANHOF u. D. D. BREIMER (1992):
Drug transport across the blood--brain barrier. I. Anatomical and physiological aspects.
Pharm Weekbl Sci 14, 305-310
- VAN VLIET, E. A., S. DA COSTA ARAUJO, S. REDEKER, R. VAN SCHAİK, E. ARONICA u. J. A. GORTER (2007):
Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy.
Brain 130, 521-534
- VAN VLIET, E. A., G. ZIBELL, A. PEKCEC, J. SCHLICHTIGER, P. M. EDELBROEK, L. HOLTMAN, E. ARONICA, J. A. GORTER u. H. POTSCSKA (2010):
COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats.
Neuropharmacology 58, 404-412
- VAZQUEZ, B. u. O. DEVINSKY (2003):
Epilepsy and anxiety.
Epilepsy Behav 4 Suppl 4, S20-25
- VLAMING, M. L., J. S. LAGAS u. A. H. SCHINKEL (2009):
Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice.
Adv Drug Deliv Rev 61, 14-25
- VOGELGESANG, S., I. CASCORBI, E. SCHROEDER, J. PAHNKE, H. K. KROEMER, W. SIEGMUND, C. KUNERT-KEIL, L. C. WALKER u. R. W. WARZOK (2002):
Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans.
Pharmacogenetics 12, 535-541

- VOLK, H. A. u. W. LOSCHER (2005):
Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures.
Brain 128, 1358-1368
- VOLK, H. A., L. A. MATIASEK, A. LUJAN FELIU-PASCUAL, S. R. PLATT u. K. E. CHANDLER (2008):
The efficacy and tolerability of levetiracetam in pharmaco-resistant epileptic dogs.
Vet J 176, 310-319
- VON KLOPMANN, T., B. RAMBECK u. A. TIPOLD (2007):
Prospective study of zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs.
J Small Anim Pract 48, 134-138
- WEGENER, J., M. SIEBER u. H. J. GALLA (1996):
Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces.
J Biochem Biophys Methods 32, 151-170
- WEIDENFELLER, C., S. SCHROT, A. ZOZULYA u. H. J. GALLA (2005):
Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone.
Brain Res 1053, 162-174
- WEISS, K. L., C. E. SCHROEDER, S. J. KASTIN, J. P. GIBSON, J. T. YARRINGTON, W. E. HEYDORN, R. G. MCBRIDE, N. M. SUSSMAN u. J. C. AREZZO (1994):
MRI monitoring of vigabatrin-induced intramyelinic edema in dogs.
Neurology 44, 1944-1949
- WELSCH, U. (2006):
Sobotta Lehrbuch Histologie.
Urban & Fischer @ Elsevier, München 2. Auflage, Seiten 247 - 248.
- WILLIAMS, S. K., J. F. GILLIS, M. A. MATTHEWS, R. C. WAGNER u. M. W. BITENSKY (1980):
Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity.
J Neurochem 35, 374-381
- WONG, I. C. u. S. D. LHATOO (2000):
Adverse reactions to new anticonvulsant drugs.
Drug Saf 23, 35-56
- WU, Z., F. M. HOFMAN u. B. V. ZLOKOVIC (2003):
A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells.
J Neurosci Methods 130, 53-63
- XIA, Y., R. E. RAGAN, E. E. SEAH, M. L. MICHAELIS u. E. K. MICHAELIS (1995):
Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced neurotoxicity, NMDA receptor function, and the NMDAR1 and glutamate-binding protein subunits in cerebellar granule cells in primary cultures.
Neurochem Res 20, 617-629
- YAMAGATA, K., M. TAGAMI, Y. NARA, M. MITANI, A. KUBOTA, H. FUJINO, F. NUMANO, T. KATO u. Y. YAMORI (1997):
Astrocyte-conditioned medium induces blood-brain barrier properties in endothelial cells.
Clin Exp Pharmacol Physiol 24, 710-713

YILMAZER-HANKE, D. M., H. K. WOLF, J. SCHRAMM, C. E. ELGER, O. D. WIESTLER u. I. BLUMCKE (2000):

Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy.

J Neuropathol Exp Neurol 59, 907-920

ZHU, H. J. u. G. Q. LIU (2004):

Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism.

Life Sci 75, 1313-1322

ZIBELL, G., B. UNKRUER, A. PEKCEC, A. M. HARTZ, B. BAUER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2009):

Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition.

Neuropharmacology 56, 849-855

ZSCHIEDRICH, K., I. R. KONIG, N. BRUGGEMANN, N. KOCK, M. KASTEN, K. L. LEENDERS, V. KOSTIC, P. VIEREGGE, A. ZIEGLER, C. KLEIN u. K. LOHMANN (2009):

MDR1 variants and risk of Parkinson disease. Association with pesticide exposure?

J Neurol 256, 115-120

10 ANHANG

10.1 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN

Substanz	Bezugsquelle
Bovines Serumalbumin (bovine serum albumine)	Sigma
Bupivacain	Jenapharm
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Riedel-de Haen
Celecoxib	Pfizer
Chloralhydrat	Merck
Dextran from Leuconostoc spp. (Mr ~ 100.000 Da)	Sigma
Dextran from Leuconostoc spp. (Mr ~ 6.000 Da)	Sigma
D-Glucose	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dispase-II	Sigma
Ethanol 70%	Roth
H ₂ O ₂	Roth
HEPES Lösung	PAN
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma
L-701.324	Sigma
L-Glutamin (Glutamat)	PAN
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Misoprostol	Pfizer
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumpyruvat (sodium pyruvate)	Sigma
NBD-CyclosporinA	Novartis
NS-398	Cayman Chemicals
Paladur Flüssigkeit	Pluradent
Paladur Pulver	Pluradent
PSC-833 (Valspodar)	Novartis
SC-51089	Sigma
Wasser für Injektionszwecke (Aqua ad injectabilia)	Serumwerk Bernburg

10.1.1 Protokolle für die Kapillarisation

Puffer A:

- 103 mM NaCl = 6,020 g/l

• 4,7 mM KCL	=	0,349 g/l
• 1,2 mM MgSO ₄	=	0,269 g/l
• 1,2 mM KH ₂ PO ₄	=	1,620 g/l
• 2,5 mM CaCl ₂	=	0,367 g/
• 10 mM HEPES Lösung	=	10 ml/l

Puffer B:

• Puffer A + :		
• 25 mM NaHCO ₃	=	2,100 g/l
• 10 mM D-Glucose	=	1,802 g/l
• 1 mM sodium pyruvate	=	0,110 g/l
• 0,5% bovine serum albumine	=	5 g/l

Dextran-Lösung 1:

30, 40, 60 oder 80 g Dextran from Leuconostoc spp. (Mr ~ 6.000 Da) gelöst in 200 ml Puffer A.

Dextran-Lösung 2:

30, 40, 60 oder 80 g Dextran from Leuconostoc spp. (Mr ~ 100.000 Da) gelöst in 200 ml Puffer A.

0,3% Dispase II:

12 mg Dispase II gelöst in 4 ml Puffer A.

10.2 GERÄTE

Geräte	Typ/Bezeichnung	Bezugsquelle
Stereotaktische Apparate	-	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stimulatoreinheit	Typ 215/II oder NR. 6872	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten
Stimulations- und EEG-Kabel	Dreipoliges, abgeschirmtes, ummanteltes Kabel BNC-Stecker Bananenstecker	Conrad Elektronik, München
Switchbox	-	AD-Instruments, Spechbach
EEG-Software	Chart 5	AD-Instruments, Spechbach
EEG-Ableitung	Powerlab 8/30, Animal Bio Amplifier	AD-Instruments, Spechbach
Zentrifuge	RC5B	Sorvall
Zentrifuge	Biofuge A	Haraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Laborlux D	Leitz, Wetzlar
Konfokales Mikroskop	LSM510	Eigenanfertigung
Software für konfokales Mikroskop	AxioVision	Zeiss
Glashomogenisator	40 ml, 0,2 mm Spaltbreite	Kontes
Glasperlen	3 mm Durchmesser	Hartenstein, Würzburg
Nylongaze	50 µM Maschenweite 210 µM Maschenweite	Hartenstein, Würzburg
Objektträger		Hartenstein, Würzburg
Deckgläschen	24 x 32 mm	Hartenstein, Würzburg
Zentrifugengefäße	50 ml 250 ml	Nalgene, Thermo Fischer Scientific, Rochester, USA

10.3 PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen in internationalen Zeitschriften:

Fischborn S. V., Soerensen J., Potschka H. (2010): Targeting the prostaglandin E2 EP1 receptor and cyclooxygenase-2 in the amygdala kindling model in mice. *Epilepsy Res.* 2010 Jul 22.

Zitierfähige Kongressbeiträge:

Fischborn S. V., Soerensen J., Potschka H.:
Impact of EP1 receptor antagonism and COX-2 inhibition on amygdala kindled seizures.
Abstract book, Poster No 48
51. Jahrestagung der DGPT, Mainz, März 2010

Fischborn S. V., Soerensen J., Potschka H.:
Targeting the arachidonic acid cascade in the amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy.
Abstract book, Poster No 440
9th European Congress on Epileptology, Rhodos, Juni 2010

10.4 DANKSAGUNG

Mein größter Dank richtet sich an Frau Prof. Dr. H. Potschka für die Überlassung des Themas, die jederzeitige Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen, die mich immer sehr inspiriert und motiviert haben. Insbesondere danke ich ihr aber für das mir entgegengebrachte Vertrauen, den Glauben an meine Team- und Leistungsfähigkeit, das uneingeschränkte Verständnis für die ein oder andere verzwickte Lebenslage und ihre Unterstützung und Förderung meines beruflichen Werdeganges.

Jonna Soerensen danke ich für ihre unersetzliche und unermüdliche Unterstützung bei der Einarbeitung in das neurowissenschaftliche und tierexperimentelle Arbeiten sowie in das Verfassen wissenschaftlicher Texte. Ihre Geduld und Klarheit haben mir über viele große und kleine Hindernisse hinweggeholfen und mir immer wieder gezeigt, worauf es wirklich ankommt. Ohne ihre Hilfe hätte ich sicher längst aufgegeben. Neben der exzellenten Betreuung danke ich ihr aber ganz besonders für ihre Freundschaft, die Gespräche bei Z & K, die mir unvergessen bleiben werden und die Aufmunterung und die Wärme, die ich nach ihrem Weggang jeden Tag aufs Neue vermisst habe.

Ariane Rode danke ich für ihre Unterstützung und Betreuung zu jeder Tag- und Nachtzeit. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen haben mich stets inspiriert und mich die oft doch komplizierten Versuchsabläufe klarer sehen lassen. Ich danke ihr für die Einführung in das Arbeiten mit Zellkultur und Western Blot, aber auch die vielen fachlichen und privaten Gespräche, die jede gemeinsame Fahrt wie z. B. nach Großhadern, zum Schlachthof oder gar nach Münster um ein Vielfaches schöner und leichter gemacht haben.

Bei Christina Zellinger möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Instituts bedanken. Ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft erleichterten mir den Einstieg ins Team und ihr Optimismus rettete mich aus so manchem Stimmungstief.

Frau Dr. PD A. Péraud danke ich für die Überlassung der epilepsiechirurgischen Resektate, die reibungslose Zusammenarbeit sowie den Einblick in ihren OP.

Herrn M. Pöllat von Schlachthof München danke ich für die liebenswürdige und geduldige Unterstützung bei der Abholung der Schweinegehirne.

Ich danke meinen ehemaligen Mitdoktoranden Hero, Hannes, Natalie, Lotta, Vera und Mehrnoosh für die stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die tolle und effektive Zusammenarbeit im OP, Lager und darüber hinaus und natürlich für die oft sehr lustigen gemeinsamen Stunden in unserem „Großraumbüro“, in dem es oft zugeht wie in einem

Taubenschlag. Danke, dass ihr meine Launen und Eigenarten mit so viel Humor getragen habt. Gemeinsam haben wir viele Höhen und Tiefen durchlebt und immer zusammengehalten, dafür danke ich euch!

Katharina Gabriel danke ich für die exzellente und engagierte Pflege unserer Versuchstiere, ihre große Zuverlässigkeit, ihren Scharfsinn und Weitblick bei der Planung und Durchführung aller anfallenden Arbeiten in den Tierräumen.

Für die tägliche freundliche und kompetente Unterstützung möchte ich mich bedanken bei Marion Fisch, Carmen Meyer, Heidi Zankl, Andrea Wehmeyer, Sieglinde Fischlein und Eva Stelling.

Meinen Freunden und meiner Familie, gilt mein großer Dank für ihre Geduld und ihre Unterstützung in jeglicher Form.

Als Letztes und am allermeisten möchte ich Martin danken, dem Menschen, der sicherlich den größten Dank verdient, da er mich jeden Tag bedingungslos und liebevoll unterstützt und in dieser nicht immer leichten Zeit begleitet hat. Er hat es geschafft, dass ich an mich geklaubit und mich nicht verloren habe!