

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Potschka**

---

**Untersuchungen in einem Post-Status epilepticus-Modell:  
Evaluierung eines  
positronen-emissions-tomographischen Verfahrens und  
Prüfung des Peptidmimetikums Cintrofin**

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

von  
Vera Franziska Agnes Rußmann  
aus Heidelberg

München 2012

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. Göbel  
Univ.-Prof. Dr. Poulsen Nautrup  
Priv.-Doz. Dr. Maierl  
Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
1.	Epilepsien.....	3
1.1	Definition und Bedeutung.....	3
1.2	Klassifizierung.....	4
1.3	Tiermodelle.....	5
2.	Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions- tomographischen Verfahrens.....	8
2.1	Pharmakoresistente Epilepsien.....	8
2.1.1	Einführung.....	8
2.1.2	Mechanismen der Pharmakoresistenz.....	9
2.1.2.1	Multidrug-Transporter-Hypothese.....	9
2.2	Positronen-Emissions-Tomographie.....	16
2.2.1	Funktionsprinzip.....	16
2.2.2	Klinische Anwendungsgebiete der Positronen-Emissions-Tomographie.....	16
3.	Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin.....	17
3.1	Anfallsinduzierte neuronale Plastizität.....	17
3.1.1	Neurogenese.....	17
3.1.1.1	Neurogenese und Epilepsie-assoziierte Störungen.....	19
3.1.2	Neurodegeneration.....	19
3.2	Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsien.....	21
3.3	Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien.....	22
3.3.1	Einführung.....	22
3.3.2	Mimetische Peptide.....	25
3.3.2.1	Cintrofin.....	26
3.4	Verhaltensuntersuchungen.....	27
3.4.1	Einführung.....	27
3.4.2	Verhaltensmodelle.....	27
3.4.2.1	Open Field.....	27
3.4.2.2	Elevated Plus Maze.....	28
3.4.2.3	Black White Box.....	29
3.4.2.4	Morris Water Maze.....	29
<b>III.</b>	<b>Arbeitshypothesen und Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>IV.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
1.	Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions- tomographischen Verfahrens.....	33
1.1	Versuchstiere.....	33
1.2	Elektrisches SE-Modell.....	34
1.3	Anfallsparameter.....	37
1.4	Überwachung spontaner Anfälle.....	38
1.5	Selektion von Respondern und Non-respondern.....	39
1.6	Retrobulbäre Blutentnahme.....	41
1.7	Durchführung und Auswertung der Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	42
1.7.1	PET Scanner und Radiopharmaka.....	42
1.7.2	Ablauf der PET-Untersuchungen.....	42
1.7.3	Rekonstruktion und Analyse der PET-Daten.....	45
1.8	Histologische Gewebeaufbereitung.....	47
1.9	Immunhistochemische Färbemethoden.....	47
1.10	Auswertung und Statistik.....	49
1.11	Versuchsdesign.....	51
2.	Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin.....	52

2.1	Versuchstiere.....	52
2.2	Elektrisches SE-Modell.....	52
2.3	Anfallsparameter.....	52
2.4	Überwachung spontaner Anfälle.....	53
2.5	Verhaltensuntersuchungen.....	53
2.5.1	Open Field.....	53
2.5.2	Elevated Plus Maze.....	54
2.5.3	Black White Box.....	55
2.5.4	Morris Water Maze.....	56
2.6	Histologische Gewebeaufbereitung.....	57
2.7	Immunhistochemische und histochemische Färbemethoden.....	58
2.8	Auswertung und Statistik.....	61
2.9	Versuchsdesign.....	64
<b>V.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
1.	Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions- tomographischen Verfahrens.....	66
1.1	Elektrisches SE-Modell.....	66
1.2	Monitoring von spontanen Anfällen während der Vehikelphase.....	66
1.3	Selektion von Respondern und Non-respondern.....	67
1.4	PET-Untersuchungen.....	68
1.4.1	[ <sup>11</sup> C]Quinidin-Kinetik.....	69
1.4.2	Anreicherung des Tracers [ <sup>14</sup> C]Laniquidar.....	73
1.4.3	Anreicherung des Tracers [ <sup>14</sup> C]Phenytoin.....	76
1.4.4	Anreicherung des Tracers [ <sup>14</sup> C]Quinidin.....	78
1.4.5	Anreicherung des Tracers [ <sup>18</sup> F]Fluorodeoxyglucose (FDG).....	81
1.4.6	Korrelation zwischen SUV und Anfallsreduktion.....	82
1.5	Quantifizierung der Pgp-Expression.....	83
1.6	Korrelation zwischen Anfallsfrequenz und Pgp-markierter Fläche.....	86
2.	Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin.....	87
2.1	Elektrisches SE-Modell.....	87
2.2	Überwachung auf spontane Anfälle.....	87
2.3	Prüfung antiepileptogener Effekte durch Cintrofin.....	88
2.3.1	Verhaltensmodelle.....	88
2.3.2	Immunhistochemie.....	94
<b>VI.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>103</b>
1.	Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions- tomographischen Verfahrens.....	103
2.	Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin.....	113
<b>VII.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>VIII.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>122</b>
<b>IX.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
<b>X.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>159</b>
1.	Geräte.....	159
2.	Lösungen und Substanzen.....	161
	<b>Publikationen.....</b>	<b>167</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>168</b>

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ABCG/BCRP	breast cancer resistance protein
ABCC/MRP	multidrug resistance associated protein
AEDs	antiepileptic drugs (Antiepileptika)
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
ap	anterior posterior
biot.	biotinyliert
BLA	basolaterale Amygdala
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
ca.	circa
CCD	Charge-coupled Device
CCTV	Closed Circuit Television
Cer	Cerebellum
CLC	Cardiotrophin-like Cytokine
CLF	Cytokine-like Factor
cm	Zentimeter
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTR $\alpha$	Ciliary Neurotrophic Factor-Rezeptor- $\alpha$
CP	Caudate Putamen (Striatum)
Cs	Caesium
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis)
CT-1	Cardiotrophin-1
Cy	Carbocyanin
DA	Dalton
DAB	3,3'Diaminobenzidin
dB	Dezibel
DCX	Doublecortin

DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
dv	dorsoventral
ED1	extracellular domain 1
EEG	Elektroenzephalogramm
Erk	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
F	Fluor
Fa.	Firma
FDG	2-Deoxy-2( <sup>18</sup> F)Fluoro-D-Glucose; [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglucose
FGL	FG loop (mimetisches Peptid, welches von dem neuronalen Zell- adhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule, NCAM) abgeleitet wurde)
FWHM	Full width at half maximum (Halbwertsbreite)
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
GCL	granule cell layer (Körnerzellschicht)
GD	Gyrus Dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
gp130	Glykoprotein 130
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H	Hilus
Hipp	Hippocampus
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
IBE	Internationales Büro für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy)
IL	Interleukin
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie (International League against Epilepsy)
i.p.	intraperitoneal
IU	International Unit (Internationale Einheit)
i.v.	intravenös
Jak	Janus-Kinase
K <sub>1</sub>	Transportrate ins Gehirn

K <sub>2</sub>	konstante Ausstromrate pro Minute
Kap.	Kapitel
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
L	Liter
lat	lateral
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFRβ	Leukemia Inhibitory Factor-Rezeptor-β
M	molare Masse
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBq	Megabecquerel
mdr	multidrug resistance
MEK1	MEK1 Protein
MEZ	Mitteuropäische Zeit
Mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mod.	modifiziert
MR	Magnetresonanztomographie
MRPs	Multidrug Resistance Proteine
ms	Millisekunde
MWM	Morris Water Maze
n	Tierzahl, Gruppengröße
N	Teilchenanzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NeuN	neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
OC	occipitaler Cortex
OD	optical density (Optische Dichte)
OSM	Oncostatin-M
OSWLS	ordered-subsets weighted least-squares
p	Signifikanzniveau
PC	parietaler Cortex

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pgp	P-Glykoprotein
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PVC	Polyvinylchlorid
r	Korrelationskoeffizient
RAID	Redundant Array of Independent Discs (Redundante Anordnung unabhängiger Festplatten)
Ras	Proto-Onkogene
ROIs	regions of interest
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SE	Status epilepticus
s	Sekunde
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SGZ	subgranuläre Zone
SH2	Src homology 2
Shp2	non-receptor tyrosine phosphatase (Tyrosin-Phosphatase)
Sos	Son of Sevenless
SSC	Saline-Natriumcitrat
SSSE	self-sustaining status epilepticus (sich selbsterhaltender Status epilepticus)
STAT	signal transducers and activators of transcription
SUV	standardized uptake value
SVZ	subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TQD	Tariquidar
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
verd.	verdünnt
v.s.	versus
$V_T$	volume of distribution (Koeffizient der Verteilung zwischen Blut und Gehirn)
$\mu\text{A}$	Mikroampère
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional

# I. Einleitung

Epilepsien zählen sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (CASCINO 2008). Charakterisiert sind sie durch das wiederholte, spontane Auftreten von Krämpfen zentralen Ursprungs. Die Therapie der Erkrankung erfordert in der Regel eine lebenslange Applikation von Antiepileptika. Trotz der großen Anzahl zur Verfügung stehender Medikamente kann bei mehr als 30% der Patienten durch eine medikamentöse Therapie keine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreicht werden (BRODIE u. SILLS 2011; MOERMAN et al. 2011). Dies ist sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin der Fall. Für das Auftreten pharmakoresistenter Epilepsien werden unterschiedliche Ursachen diskutiert. In diesem Zusammenhang wird eine Hypothese verfolgt, nach der der Überexpression bestimmter Effluxtransporter, sogenannter *Multidrug*-Transporter, im Rahmen der Pharmakoresistenz eine zentrale Bedeutung zukommt (LÖSCHER u. LANGER 2010; POTSCHKA 2010a). Einen solchen *Multidrug*-Transporter stellt P-Glykoprotein (Pgp) dar (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Als Folge eines erhöhten, aktiv auswärtsgerichteten Transports an der Blut-Hirn-Schranke wird die Gehirngängigkeit der Antiepileptika durch Pgp limitiert, so dass keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Gehirnparenchym erreicht wird (POTSCHKA 2010b). Dadurch bleibt eine Pharmakotherapie erfolglos. Durch Inhibition der pathologisch gestörten Expression des Pgps könnte die Aufnahme der Antiepileptika in das Gehirn gesteigert werden. Die Verfügbarkeit einer nicht-invasiven Methode zur Messung der Pgp-Funktion *in vivo* wäre von herausragender klinischer Bedeutung, da dadurch die Identifikation jener Patienten ermöglicht würde, die von einer Behandlung mit Pgp-modulierenden Arzneimitteln profitieren (MAIRINGER et al. 2011). Eine solche nicht-invasive Methode stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar. In den bisher durchgeführten PET-Studien wurden jedoch vorwiegend *Tracer* eingesetzt, die eine sehr geringe Verteilung im Gehirn aufwiesen (LAZAROVA et al. 2008), wodurch die Pgp-Expression nur sehr schwer dargestellt werden konnte. Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines neuen optimierten Radiopharmakons zur Darstellung der Pgp-Funktion in der nuklearmedizinischen Diagnostik sowie die detaillierte Aufklärung der an der Pharmakoresistenz beteiligten Mechanismen. Basierend auf den durchgeführten PET-Untersuchungen werden verschiedene *Tracer* im Hinblick auf ihre Eignung zur Untersuchung von Pgp evaluiert.

Die nicht ausreichende Kontrolle der Anfallsaktivität ist für Epilepsiepatienten mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität (GULPEK et al. 2011) sowie einem erhöhten

Risiko für Begleiterkrankungen, Verletzungen oder plötzliche Todesfälle verbunden. Auch bei Patienten mit erfolgreicher Anfallskontrolle kann die Lebensqualität durch die Nebenwirkungen der Antiepileptika (KWAN u. SPERLING 2009) eingeschränkt werden. Angesichts der individuellen Belastung betroffener Patienten, aber auch der sozioökonomischen Bedeutung der Erkrankung, wären Möglichkeiten einer Prävention der Epilepsieentstehung wünschenswert (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011; SCHMIDT 2011). Sogenannte symptomatische (strukturell metabolische) Epilepsien entstehen als Konsequenz einer initialen Gehirnschädigung (z.B. durch ein Schädelhirntrauma, einen Schlaganfall, eine entzündliche Erkrankung des Gehirns oder Gehirntumoren). Die Generierung eines übererregbaren epileptischen Netzwerkes scheint dabei die Folge multipler molekularer und zellulärer Veränderungen in den Gehirnregionen zu sein (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Durch Modulation dieser Veränderungen in der frühen Phase nach der initialen Gehirnschädigung könnten wesentliche Prozesse der Epilepsieentstehung unterbrochen und die Entstehung bzw. Ausprägung der Epilepsie verhindert werden. In diesem Zusammenhang soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit das therapeutische Potential des CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*)-mimetischen Peptids Cintrofin für die Prävention symptomatischer (strukturell metabolischer) Epilepsien und assoziierter psychiatrischer und kognitiver Störungen experimentell überprüft werden.

## II. Literaturübersicht

### 1. Epilepsien

#### 1.1 Definition und Bedeutung

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League against Epilepsy*, ILAE) und das Internationale Büro für Epilepsie (*International Bureau for Epilepsy*, IBE) definieren Epilepsie als „eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen, welche sich daraus ergeben, gekennzeichnet ist“ (mod. nach FISHER et al. 2005). Epilepsien gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Dies gilt gleichermaßen für die Veterinär- und die Humanmedizin. Bei den Haustieren ist vor allem der Hund von Epilepsien betroffen, seltener die Katze. Schätzungen zufolge treten Epilepsien bei Hunden mit einer vergleichbaren Häufigkeit wie bei Menschen auf (KNOWLES 1998). Epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass etwa 1 bis 2% der Weltbevölkerung an Epilepsie leiden (BROWNE u. HOLMES 2001; CHARYTON et al. 2009). Dies entspricht weltweit einer Anzahl von mehr als 60 Millionen Menschen (NGUGI et al. 2010).

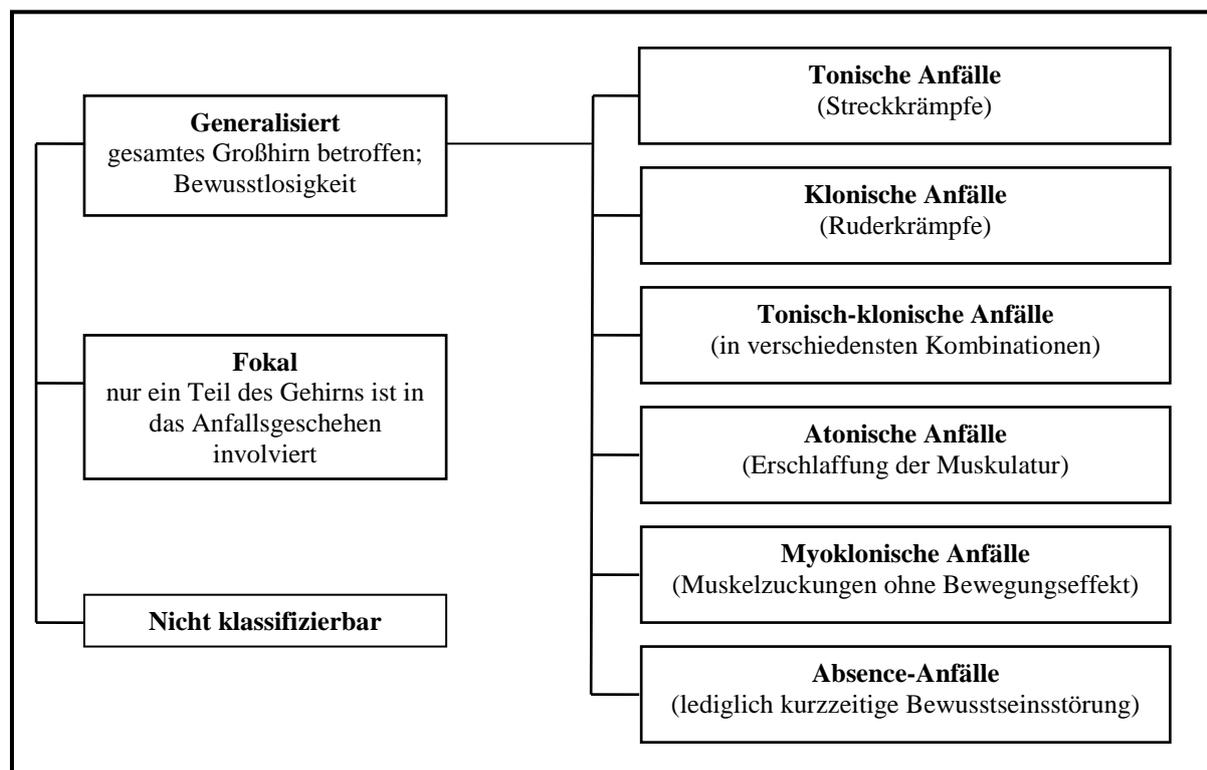
Ein epileptischer Anfall wird als das vorübergehende Auftreten krankhafter Befunde oder Symptome definiert, die sich aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen Aktivität im Gehirn manifestieren (FISHER et al. 2005). Von einem Status epilepticus (SE) spricht man, wenn die Anfallsaktivität zusammen mit einer Bewusstseinstörung oder einem Bewusstseinsverlust über einen längeren Zeitraum hinweg andauert (LOWENSTEIN et al. 1999; CHEN u. WASTERLAIN 2006).

## 1.2 Klassifizierung

Für eine erfolgreiche Therapie ist eine Klassifizierung der Epilepsie von großer Bedeutung (BROWNE u. HOLMES 2001; SHORVON 2011). Dabei werden epileptische Syndrome und epileptische Anfälle anhand der Merkmale Anfallsmuster, Ursache, Alter bei Krankheitsbeginn, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische Befunde (BERG et al. 2010) klassifiziert. Beim Anfallsmuster werden lokalisationsbezogene, sogenannte fokale Anfälle, generalisierte, meist mit Bewusstseinsverlust einhergehende Anfälle und unklassifizierbare Anfälle unterschieden (KWAN u. BRODIE 2002). Fokale Anfälle nehmen ihren Ursprung in einer umschriebenen Gehirnregion, während bei generalisierten Anfällen schon zu Beginn eine epileptische Aktivität in beiden Großhirnhemisphären auftritt (MCNAMARA 1994). Für fokale Anfälle existiert keine allgemein gültige Klassifikation (BERG et al. 2010). Demzufolge sollten diese Anfälle entsprechend ihrer Manifestation beschrieben werden (z.B. dyskognitiv, fokal motorisch) (BERG et al. 2010). Eine Unterteilung der generalisierten Anfälle erfolgt anhand des Vorhanden- oder Nichtvorhandenseins motorischer Funktionsstörungen, die entweder tonisch (Streckkrämpfe), klonisch (Ruderkrämpfe), tonisch-klonisch, atonisch (Erschlaffung der Muskulatur) oder myoklonisch (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt) sein können (ENGEL 2006). Zudem werden „Absence-Anfälle“ unterschieden (BERG et al. 2010), die lediglich durch eine kurzzeitige Bewusstseinsstörung charakterisiert sind. Eine weitere Unterteilung der Epilepsie richtet sich nach deren Ätiologie. Dabei unterscheidet man seit 2010 zwischen strukturell metabolischen und genetischen Epilepsieerkrankungen sowie Epilepsien unbekannter Ursache (BERG et al. 2010). Durch den Begriff „strukturell metabolisch“ soll zum Ausdruck gebracht werden, dass eine separate Erkrankung vorliegt, welche nicht direkt mit der eigentlichen Epilepsieerkrankung in Zusammenhang gebracht werden kann. Genetische Epilepsien sind auf einen genetischen Defekt der Betroffenen zurückzuführen, welcher möglicherweise zusätzlich zu den epileptischen Anfällen weitere Auswirkungen besitzt (BERG et al. 2010). Epilepsien unbekannter Ursache sind vermutlich Ausdruck einer bisher nicht identifizierten organischen Ursache. Zu ihnen zählen beispielsweise die frühkindliche Epilepsieform mit migrierenden fokalen Anfällen und die myoklonische Epilepsieform bei Kleinkindern (ENGEL 2006).

Der Mehrzahl der Epilepsieerkrankungen liegt eine initiale Gehirnschädigung zugrunde. Dies können Traumata, Fieberkrämpfe, Schlaganfälle, Enzephalitiden, perinatale Hypoxien oder

Tumore sein (STEFAN et al. 2006). Der initiale Insult führt über noch nicht detailliert bekannte Mechanismen zur Generierung eines prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes. Dieser Prozess der Epilepsieentstehung wird als Epileptogenese bezeichnet (BLUMENFELD 2011). Die Generierung eines übererregbaren epileptischen Netzwerkes scheint dabei die Folge multipler molekularer und zellulärer Veränderungen in den Gehirnregionen zu sein.



**Abb. 1 Einteilung epileptischer Anfälle anhand des Anfallsmusters**

Aufgrund der anatomischen Lokalisation des epileptischen Fokus werden symptomatische (strukturell metabolische) fokale Epilepsien in Temporallappenepilepsien, Frontal-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsien unterteilt.

### 1.3 Tiermodelle

Tiermodelle haben eine große Bedeutung in der experimentellen Epilepsieforschung, da sie für die experimentelle Prüfung neuer pharmakologischer Strategien und Therapien unentbehrlich sind (EGUIBAR u. CORTES MDEL 2010). An das Tiermodell einer Erkrankung werden drei grundlegende Ansprüche gestellt. Dem Modell und der Erkrankung

sollte der identische Pathomechanismus zugrunde liegen. Zudem sollten die Symptomatik und die Pathogenese im Modell derjenigen der Erkrankung ähnlich und mit ihr vergleichbar sein. Des Weiteren sollte das Tiermodell prädiktive Aussagen hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von Arzneimitteln erlauben. Bei Tiermodellen, die im Rahmen der Epilepsieforschung angewendet werden, können unterschiedliche Modelltypen differenziert werden (Abb. 2). Von den „akuten“ Modellen, die als Anfallsmodelle bezeichnet werden, müssen die „chronischen“ Modelle zur Untersuchung der Epileptogenese unterschieden werden (LÖSCHER 2011). „Akute“ Modelle werden vor allem zur Prüfung neu entwickelter Antiepileptika auf ihre antikonvulsive Wirkung eingesetzt. Ein wichtiges Modell, das in diesem Zusammenhang verwendet wird, ist der „Maximale-Elektroschock-Test“. Grundsätzlich können Tiermodelle mit induzierten und spontan auftretenden Anfällen zur Untersuchung der Mechanismen der Epileptogenese eingesetzt werden. Bei Modellen, in denen eine Induktion der Anfälle stattfindet, lassen sich diese Anfälle entweder elektrisch oder chemisch auslösen (COULTER et al. 2002). Allerdings treten die Anfälle in diesen Modellen nur im Zusammenhang mit einer Anfallsinduktion auf. Bei Tiermodellen mit spontan auftretenden Anfällen wird elektrisch oder chemisch ein initialer Insult gesetzt. Als Folge dieses Insultes wird ein prokonvulsives neuronales Netzwerk generiert. Dies führt dazu, dass die Tiere nach einer Latenzzeit spontane epileptische Anfälle zeigen.

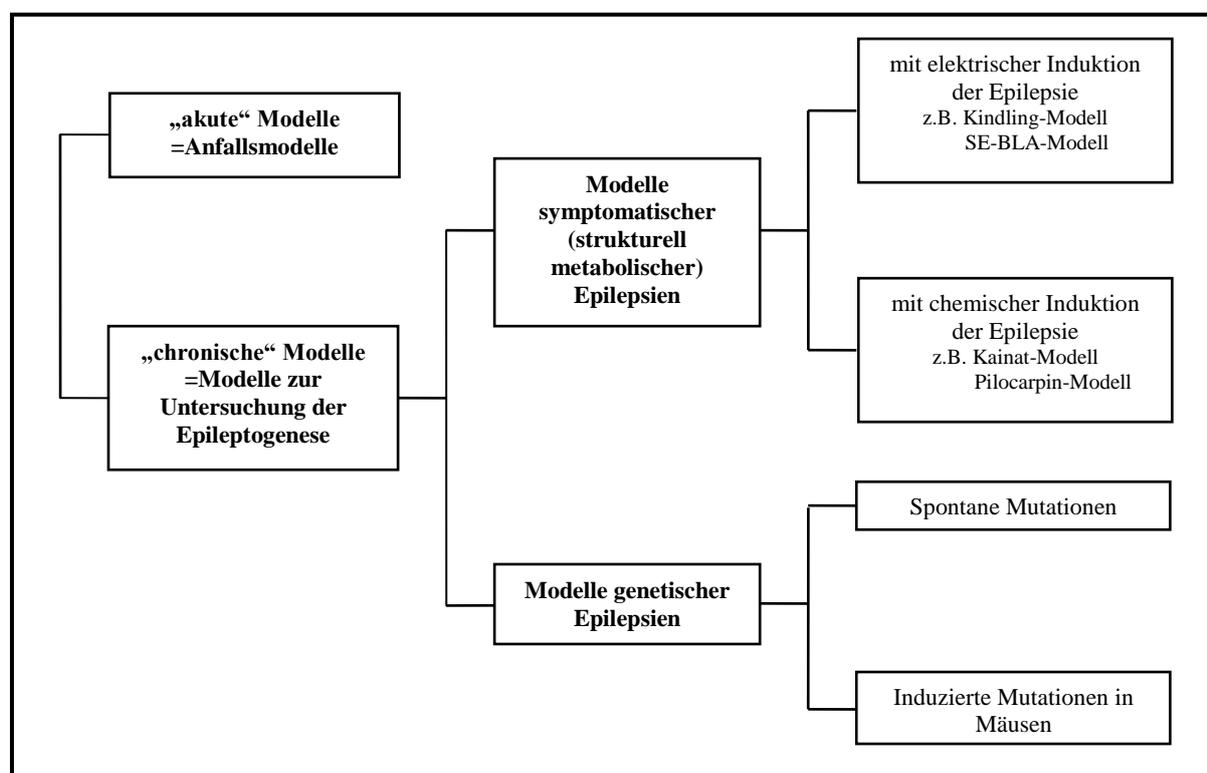


Abb. 2: Schematische Darstellung der Epilepsie-Tiermodelle

Tiermodelle mit spontan auftretenden Anfällen eignen sich daher zur Untersuchung der Epileptogenese bei symptomatisch bedingten Epilepsien. Sie spiegeln die klinische Realität vieler epileptischer Patienten wieder, bei welchen sich häufig nach einem initialen Insult, wie zum Beispiel einem Schädel-Hirn-Trauma, eine Epilepsie entwickelt. Die Mechanismen der Epilepsieentstehung lassen sich mithilfe genetischer Modelle (z.B. epileptische Hunde (LÖSCHER 1997)), chemischer Modelle (z.B. Kainsäure (BEN-ARI 1985) oder Pilocarpin (HONCHAR et al. 1983)) und elektrischer Tiermodelle (z.B. Kindling-Modell (GODDARD et al. 1969) und SE-basolaterale Amygdala (BLA)-Modell (BRANDT et al. 2003)) untersuchen. Hervorzuheben ist das SE-BLA-Modell, das in dieser Arbeit verwendet wurde und im Folgenden näher erklärt wird.

#### *SE-BLA-Modell*

Die Dauerstimulation der BLA stellt ein Tiermodell mit spontan auftretenden Anfällen dar. In diesem elektrischen Modell wird bei den Tieren durch eine 25-minütige Dauerstimulation (700  $\mu$ A) der BLA ein sich selbsterhaltender Status epilepticus (SSSE) induziert (BRANDT et al. 2003). Dabei können drei verschiedene Arten eines SSSE beobachtet werden (fokal, fokal mit einzelnen generalisierten Anfällen, generalisiert; siehe Kap. IV.1.2). In Abhängigkeit von dem verwendeten Rattenstamm, dem Geschlecht der Tiere und der Lokalisation der Elektrode variiert die prozentuale Verteilung der verschiedenen SSSE-Typen. Nur 33% der Ratten mit einem fokalen SSSE entwickeln nachfolgend spontane epileptische Anfälle, während dies bei mehr als 90% der Ratten mit einem SSSE Typ II oder III mit generalisierten Anfällen der Fall ist (BRANDT et al. 2003). Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von spontanen epileptischen Anfällen zu erhöhen muss der generalisierte SSSE mindestens vier Stunden andauern und danach die Krampfaktivität mithilfe von Diazepam unterbrochen werden. Die auftretenden, neurodegenerativen Prozesse sind bei Tieren mit fokalem SSSE im Unterschied zu solchen mit einem generalisierten SSSE weniger ausgeprägt und zudem regional begrenzt. Die neuropathologischen Veränderungen bei Tieren mit einem generalisierten SSSE besitzen Ähnlichkeiten mit denen nach einem chemisch induzierten (Pilocarpin) SE (BRANDT et al. 2003).

## 2. Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions-tomographischen Verfahrens

### 2.1 Pharmakoresistente Epilepsien

#### 2.1.1 Einführung

Die bedeutendste Therapieform der Epilepsie stellt nach wie vor die Pharmakotherapie dar (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002; PITKÄNEN 2010). Dabei erfolgt die Therapie mit antikonvulsiv wirksamen Medikamenten (Antiepileptika) (PITKÄNEN u. KUBOVA 2004) chronisch und häufig lebenslang. Bisher ist eine Epilepsitherapie im Sinne einer Heilung noch nicht möglich (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002).

In der Humanmedizin befinden sich derzeit mehr als 20 verschiedene Antiepileptika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen auf dem Markt. Aufgrund von Unterschieden in der Pharmakokinetik bei Menschen und kleinen Haustieren eignen sich viele der neueren Antiepileptika jedoch nicht für eine Langzeittherapie beim Tier. Daher stellt das Mittel der ersten Wahl bei Hund und Katze nach wie vor Phenobarbital dar (POTSCHKA et al. 2009; THOMAS 2010). Bei ungefähr einem Drittel der zu behandelnden epileptischen Menschen und Tiere führt die medikamentöse Behandlung jedoch trotz optimaler Dosierung und frühzeitigem Behandlungsbeginn zu keiner zufriedenstellenden Anfallskontrolle (SCHWARTZ-PORSCHKE u. JURGENS 1991; REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2000). Diese pharmakoresistente Epilepsieform geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (PIERZCHALA 2010). Bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten führt weder die Anwendung neu entwickelter Antiepileptika mit anderen Wirkungsmechanismen noch die Kombination unterschiedlicher Wirkstoffe zu einem Therapieerfolg. Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League against Epilepsy*, ILAE) definiert Epilepsiepatienten als klinisch pharmakoresistent, wenn mindestens zwei verschiedene Antiepileptika der ersten Wahl (entweder als Monotherapie oder in Kombination) bei ausreichender Therapiedauer und angemessener Dosierung nicht zu einem Therapieerfolg geführt haben (KWAN et al. 2010). Unter einem Therapieerfolg wird dabei laut der ILAE eine vollständige Anfallsfreiheit verstanden (KWAN u. BRODIE 2010). Patienten mit Temporallappenepilepsie leiden mit einer Prävalenz von nahezu 70% am häufigsten unter einer pharmakoresistenten Epilepsie (LEPPIK 1992). Auch ein chirurgischer Eingriff, bei dem der epileptische Fokus reseziert wird, kann bei diesen Patienten häufig nur in Kombination mit einer anhaltenden Pharmakotherapie zu einer Anfallsfreiheit führen

(LÖSCHER u. SCHMIDT 2002). Eine solche Entfernung des epileptischen Fokus ist allerdings nur möglich, wenn dieser gut identifizierbar, eindeutig abgrenzbar und chirurgisch gut erreichbar ist (FOLDVARY et al. 2001). Weitere Strategien, die in der Humanmedizin für die Therapie bei pharmakoresistenter Epilepsie eingesetzt werden, sind eine Vagusnerv-Stimulation (KAWAI 2011), eine ketogene Diät (ITO u. OGUNI 2011), eine transkranielle Magnetstimulation (KWAN u. BRODIE 2006) sowie eine Tiefenhirnstimulation thalamischer Kerngebiete (AKAMATSU u. TSUJI 2011). Allerdings konnten diese Therapieansätze in der Veterinärmedizin bisher noch keine Verwendung finden.

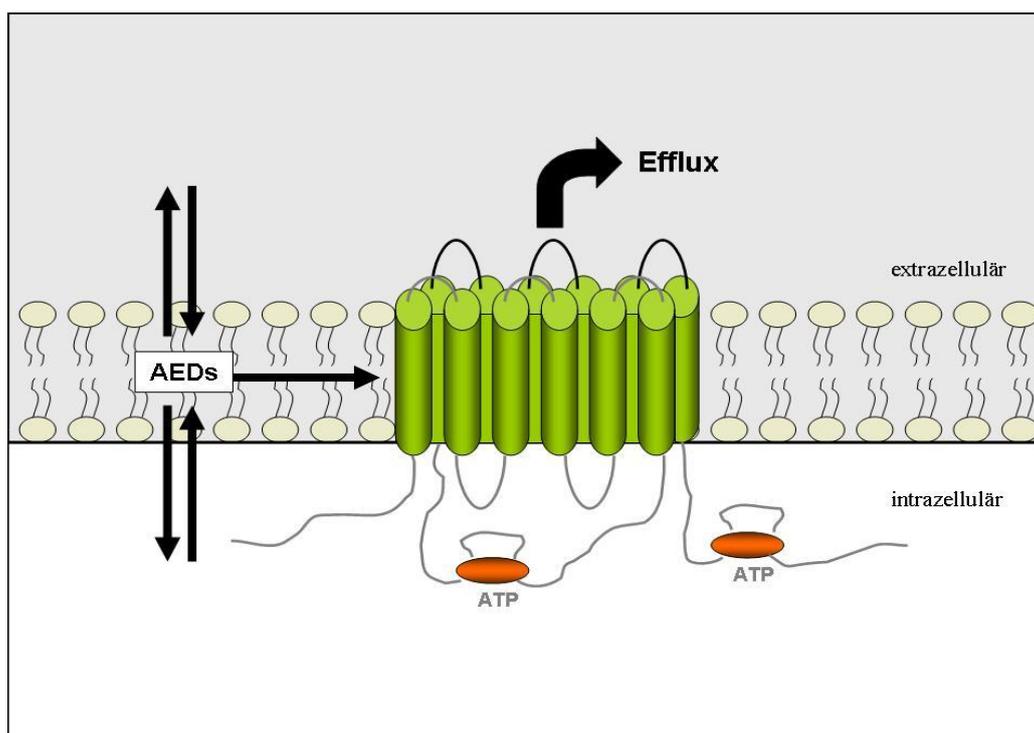
### 2.1.2 Mechanismen der Pharmakoresistenz

Trotz einer verbesserten Kenntnis über die Ätiologie und Pathogenese von Anfällen und Epilepsie sind die Ursachen und Mechanismen der Pharmakoresistenz immer noch weitestgehend unbekannt (LÖSCHER u. SCHMIDT 2002; GROVER et al. 2010). Derzeit wird vermutet, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt (POTSCHKA 2010c), bei dem genetische, krankheitsbedingte und pharmakotherapiebedingte Einflüsse möglicherweise eine Rolle spielen (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2002). Durch die mögliche Beteiligung genetischer Faktoren könnte erklärt werden, weshalb Patienten mit gleicher Epilepsieform hinsichtlich des Ansprechens auf eine Pharmakotherapie starke Unterschiede zeigen (PIERZCHALA 2010; POTSCHKA 2010c). Unter krankheitsbedingten Faktoren versteht man die Anfallsätiologie, die Progression der Erkrankung während der Behandlung mit Antiepileptika, neurodegenerative Veränderungen im epileptischen Fokus und Veränderungen an den Zielstrukturen der Medikamente sowie an den Aufnahmemechanismen der Antiepileptika durch die Blut-Hirn-Schranke (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002). Zu den pharmakotherapiebedingten Faktoren zählt unter anderem die Abnahme der Wirkung von Antiepileptika im Laufe der Therapie als Folge einer möglichen Toleranzentwicklung.

#### 2.1.2.1 Multidrug-Transporter-Hypothese

Im Jahr 1995 lieferte eine Studie von Tishler et al. die Basis für die Formulierung der *Multidrug*-Transporter-Hypothese (TISHLER et al. 1995). Diese Hypothese stellt einen Ansatz zur Erklärung des Phänomens der Pharmakoresistenz dar (LÖSCHER u. LANGER 2010). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre unterstützen die *Multidrug*-Transporter-Hypothese (LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007). *Multidrug*-

Transporter werden von allen Zellen des Körpers exprimiert. Ihre physiologische Funktion besteht darin, die Zellen vor endogenen oder exogenen toxischen Substanzen zu schützen (SCHINKEL u. JONKER 2003), indem sie toxische Fremdstoffe (Xenobiotika) energieabhängig, das heißt unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP), zurück ins Blut transportieren (LEE et al. 2001; PARDRIDGE 2005). Die Mehrheit der *Multidrug*-Transporter gehört zur Familie der „*ATP-binding cassette* (ABC) Superfamilie“ (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a, b). Die Transporter dieser Familie setzen sich aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen und zwei ATP-bindenden Domänen, die im Plasma lokalisiert sind, zusammen (LITMAN et al. 2001; KANNAN et al. 2009). Im Gehirn befinden sich *Multidrug*-Transporter in der luminalen und basolateralen Membran der Endothelzellen der Kapillaren (ROBERTS et al. 2008). Durch die Verminderung der Nettopenetration von Trägersubstanzen und anderen Substraten, die vom Blut aus in das Gehirngewebe eindringen, schützen sie das Gehirnparenchym. Dem Transporter P-Glykoprotein (Abb. 3) wird eine besondere funktionelle Bedeutung unter den *Multidrug*-Transportern zugesprochen (SCHINKEL 1999; FROMM 2004). Daneben tragen jedoch auch andere Transporter wie die Vertreter der „*multidrug resistance associated protein*“ (ABCC/MRP)-Familie oder das „*breast cancer resistance protein-2*“ (ABCG2/BCRP) zum aktiven Efflux an der Blut-Hirn-Schranke bei (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a; MAIRINGER et al. 2011). Es wird davon ausgegangen, dass dieser aktive Efflux, welcher überwiegend auf dem Transporter P-Glykoprotein basiert, für das Phänomen der Pharmakoresistenz verantwortlich ist (POTSCHKA 2010b). Dieses Phänomen tritt jedoch nicht nur bei Epilepsien auf, sondern kann auch im Rahmen der Behandlung von Krebserkrankungen (BREEDVELD et al. 2006), rheumatischen Arthritiden und vielen anderen Krankheiten beobachtet werden. Die Überexpression von *Multidrug*-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke wird dabei als ein Faktor diskutiert, der die Gehirngängigkeit und damit die Effizienz von Antiepileptika herabsetzt (GROVER et al. 2010; POTSCHKA 2010b). Dadurch kann trotz eines hinreichend hohen Wirkstoffgehalts des Antiepileptikums im Blut keine therapeutisch wirksame Konzentration im Bereich des epileptischen Fokus erzielt werden (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des *Multidrug*-Transporters P-Glykoprotein in einer Zellmembran. Pgp fördert ATP-abhängig den Effluxtransport verschiedener Substrate (u.a. Antiepileptika, AEDs). Dabei können die Substrate entweder aus dem Cytoplasma der Zelle oder direkt aus der Zellmembran zum Transporter gelangen. Da die meisten Pgp-Substrate lipophil sind, wird nach aktuellem Erkenntnisstand von der zweiten Möglichkeit ausgegangen (mod. nach LÖSCHER u. POTSCSKA 2005b).

### *Blut-Hirn-Schranke*

Um in das Gehirn zu gelangen, müssen pharmakologische Wirkstoffe die Blut-Hirn-Schranke passieren (TOURNIER et al. 2011). Die Blut-Hirn-Schranke stellt sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus eine der striktesten Barrieren für den Arzneimitteltransport in das Gehirn dar (LÖSCHER u. POTSCSKA 2005b). Dabei wird sie als Hauptweg für die Aufnahme von endogenen und exogenen Liganden in das Gehirnparenchym angesehen. Die Blut-Hirn-Schranke wird durch kapilläre Endothelzellen gebildet (PARDRIDGE 2005; ABBOTT et al. 2010), welche das Lumen der Gehirnkapillaren und die Perizyten begrenzen und von einer Basalmembran umgeben sind. Astrozytäre Fortsätze bedecken ungefähr 90% der Oberfläche der Endothelzellen, wodurch eine Verbindung zu den Nervenzellen hergestellt wird. Die Endothelzellen sind über *tight junctions* miteinander verbunden (TERASAKI u. HOSOYA 1999; CIPOLLA 2009). Durch die *tight junctions* wird ein parazellulärer Substanztransport verhindert (ABBOTT et al. 2010) und eine Trennung des Blutes von Gehirnparenchym und Zerebrospinalflüssigkeit ermöglicht (ABBOTT et al. 2006). Durch einen Mangel an pinozytotischen Transportvesikeln kann ein endo- und transzytotischer

Transport nur sehr eingeschränkt stattfinden (LEE et al. 2001). Des Weiteren bilden die Stoffwechsellenzyme der Endothelzellen eine zusätzliche enzymatische Barriere. Die Gehirngängigkeit einer Substanz hängt von deren Lipidlöslichkeit ab (REDZIC 2011). Je lipidlöslicher ein Pharmakon ist, desto leichter passiert es die Blut-Hirn-Schranke. Für große, hydrophile, polare Substanzen ist die Penetration der Endothelzellmembran nahezu unmöglich. Im Gegensatz dazu können lipophile, unpolare Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht unter 500 Dalton (Da) die Blut-Hirn-Schranke mittels Diffusion oder Carrier-vermitteltem Transport passieren (SPECTOR et al. 2000; PARDRIDGE 2005). Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke wird zusätzlich durch ein System von aktiven Effluxtransportern verstärkt (ABBOTT et al. 2010). Diese verhindern die Akkumulation lipophiler Substanzen wie Xenobiotika, Steroidhormone oder Phospholipide im Gehirnparenchym. Einige Mitglieder der ABC-Superfamilie sind Vertreter dieser Effluxtransporter (ABBOTT et al. 2010). Zu ihnen gehören beispielsweise P-Glykoprotein (Pgp), verschiedene „*Multidrug Resistance* Proteine“ (MRPs) und das „*breast cancer resistance protein*“ (BRCP) (DAUCHY et al. 2008; KAMIIE et al. 2008).

### *P-Glykoprotein*

In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde Pgp im Rahmen der Krebsforschung als erster *Multidrug*-Transporter entdeckt (DANO 1973; JULIANO u. LING 1976). Seitdem zählt es zu den meist studierten *Multidrug*-Transportern (SARKADI et al. 2006; POTSCHKA 2010b). In Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Pgp physiologisch in vielen Organen des Körpers wie Darm, Niere, Leber und Endothelzellen exprimiert wird (FROMM 2000, 2004). Beim Menschen und beim Hund wird Pgp vom *Multidrug-resistance-1* (MDR1)-Gen kodiert, während bei Nagern zwei Pgp-Isoformen existieren, die von den Genen *mdr1a* und *mdr1b* kodiert werden (SCHINKEL 1999). Die Substratspezifität der beiden Pgp-Isoformen ist unterschiedlich, aber dennoch teilweise überlappend (SCHINKEL 1999). An der Blut-Hirn-Schranke konnte eine Pgp-Expression sowohl an der luminalen Membran der kapillären Endothelzellen (SCHINKEL 1999; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b) als auch in den perivaskulären astrozytären Endfüßen (PARDRIDGE et al. 1997; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c) nachgewiesen werden. *Mdr1a*-Pgp findet sich überwiegend in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, während *mdr1b*-Pgp vor allem im Gehirnparenchym vorkommt (DEMEULE et al. 2002). Als Folge von epileptischen Anfällen kann es auch in Neuronen zu einer Pgp-Expression kommen (VOLK et al. 2004). Während bei Epilepsiepatienten eine zusätzliche Expression in Neuronen nachgewiesen werden konnte (DOMBROWSKI et al.

2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003), wurde Pgp im Gehirn gesunder Menschen nach immunhistochemischer Färbung ausschließlich in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke detektiert. Eine Expression in Astrozyten und Neuronen konnte demnach bei gesunden Menschen nicht gezeigt werden (TISHLER et al. 1995; SISODIYA et al. 2002). Die physiologische Schutzfunktion von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke wird bei einigen Hunderassen (Collie, *American Shepard*) deutlich. Diese Hunde besitzen einen genetischen Defekt des MDR1-Gens, wodurch es infolge der mangelnden Ausprägung des *Multidrug*-Transporters zu einer Ivermectin-Überempfindlichkeit mit den Symptomen einer Neurotoxizität kommt (MEALEY et al. 2001; NELSON et al. 2003).

#### *Transporterbasierte Pharmakoresistenz*

Aufgrund seiner breiten Substratspezifität (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c; KANNAN et al. 2009) besitzt Pgp im Zusammenhang mit Pharmakoresistenzen eine große klinische Relevanz. Zu den Substraten dieses *Multidrug*-Transporters zählen neben endogenen Substraten wie Zytokinen, Steroiden und Bilirubin auch viele Arzneistoffe (Tabelle 1). Die vermehrte Expression des MDR1-Gens und anderer *Multidrug*-Transporter-Gene bei pharmakoresistenten Patienten wurde 1995 von Tishler et al. erstmalig beschrieben (TISHLER et al. 1995). Seitdem konnte mithilfe experimenteller Studien in einer Vielzahl von Epilepsiemodellen nachgewiesen werden, dass die Expression von Pgp und anderer *Multidrug*-Transporter durch Anfallsaktivität induziert wird (POTSCHKA 2010b). Durch die Überexpression der *Multidrug*-Transporter kommt es zu einem erhöhten aktiv auswärtsgerichteten Transport der Antiepileptika (Abb. 4). Dadurch kann trotz eines ausreichend hohen Blutplasmaspiegels des Antiepileptikums keine therapeutisch ausreichend wirksame Konzentration im Gehirnparenchym erzielt werden. Die Pharmakotherapie mit wirksamen Antiepileptika bleibt daher in diesen Fällen ohne Erfolg. Es konnte gezeigt werden, dass diese Überexpression vor allem in jenen Regionen stattfindet, die an der Anfallsgeneration und –ausbreitung beteiligt sind (VAN VLIET et al. 2006). Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Überexpression von *Multidrug*-Transportern bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie eine Konsequenz der Epilepsie, der unkontrollierten Anfälle, der chronischen Behandlung mit Antiepileptika oder einer Kombination dieser Faktoren ist (AMBROZIAK et al. 2010; JING et al. 2010). Es wird jedoch angenommen, dass epileptische Anfälle über einen kaskadenartigen Verlauf unterschiedlicher Mechanismen eine vermehrte Expression von *Multidrug*-Transportern



Antiepileptika	<i>in vitro</i> (Zellkultur)		<i>in vivo</i>			Quelle
	Humanes Pgp	Nager Pgp	Induzierte Nagermodelle	Genetische Nagermodelle	Human-patient	
Phenytoin	+	+	+	(+)	?	(POTSCHKA u. LÖSCHER 2001; RIZZI et al. 2002; SILLS et al. 2002; POTSCHKA et al. 2003; CUCULLO et al. 2007; LUNA-TORTOS et al. 2008; RIVERS et al. 2008; ZHANG et al. 2010)
Carbamazepin	-	-	+	(+)	?	(OWEN et al. 2001; POTSCHKA et al. 2001; SILLS et al. 2002; BALTES et al. 2007b; LUNA-TORTOS et al. 2008)
Oxcarbazepin	+	?	+	?	+	(CLINCKERS et al. 2005; MARCHI et al. 2005)
Valproinsäure	-	-	-	?	?	(BALTES et al. 2007a; LUNA-TORTOS et al. 2008; RIVERS et al. 2008)
Levetiracetam	+	+	-	?	?	(POTSCHKA et al. 2004a; BALTES et al. 2007b; LUNA-TORTOS et al. 2008)
Phenobarbital	+	?	+	?	?	(POTSCHKA et al. 2002; CROWE u. TEOH 2006; LUNA-TORTOS et al. 2008; ZHANG et al. 2010)
Lamotrigin	(+)	?	+	?	?	(POTSCHKA et al. 2002; CROWE u. TEOH 2006; LUNA-TORTOS et al. 2008; RIVERS et al. 2008)
Topiramate	+	?	?	+	?	(SILLS et al. 2002; LUNA-TORTOS et al. 2009)

**Tab.1: Antiepileptika, für die Substrateigenschaften im Hinblick auf Pgp diskutiert werden. Neben *in vitro* Daten sind auch *in vivo* Daten dargestellt. + = Nachweis erfolgt; (+) = Datenlage nicht eindeutig; ? = zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Daten vor; - = kein Nachweis (Tabelle mod. nach POTSCHKA 2010c).**

## 2.2 Positronen-Emissions-Tomographie

### 2.2.1 Funktionsprinzip

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wurde in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt (PHELPS et al. 1975) und stellt ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin dar, mit dessen Hilfe Schnittbilder von lebenden Organismen erzeugt werden können. Zahlreiche Untersuchungsmöglichkeiten, die für das Verständnis der Erkrankung und die weitere Behandlung der Epilepsie von entscheidender Bedeutung sind, werden durch die PET ermöglicht (BROOKS 2005). Das Funktionsprinzip beruht dabei auf spezifischen *Tracern*. Diese stellen Moleküle dar, die mit einem Positronen aussendenden Radioisotop markiert sind (Positronenstrahler) (PHELPS 2000). Mit Hilfe dieser *Tracer* können bei der PET funktionelle oder metabolische Veränderungen (CHINCHURE et al. 2010) sichtbar gemacht werden (SHARMA et al. 2002). Bisher konnte bereits nachgewiesen werden, dass mehrere PET-*Tracer* als Pgp-Substrate fungieren (POTSCHKA 2010c). Zum jetzigen Zeitpunkt stellt [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil den für Pgp am besten erforschten PET-*Tracer* dar (LANGER et al. 2007). Als Radioisotope werden beispielsweise Kohlenstoff ( $^{11}\text{C}$ ), Stickstoff ( $^{13}\text{N}$ ), Sauerstoff ( $^{15}\text{O}$ ) und Fluor ( $^{18}\text{F}$ ) eingesetzt. Aufgrund ihrer Halbwertszeit stellen Fluor ( $^{18}\text{F}$ ) und Kohlenstoff ( $^{11}\text{C}$ ) die am häufigsten genutzten Isotope dar (PHELPS 2000). Während  $^{18}\text{F}$  eine Halbwertszeit von ca. 110 min besitzt, beträgt die Halbwertszeit von  $^{11}\text{C}$  nur ca. 20 min. Dies führt dazu, dass insbesondere  $^{11}\text{C}$ -markierte Moleküle direkt am Ort der Herstellung eingesetzt werden müssen. Schon 1982 fanden sich in der Literatur zahlreiche mit Positronen aussendenden Radionukliden markierte Verbindungen (FOWLER et al. 1982) und bis heute kommen noch viele neue markierte Radiopharmaka hinzu. Die Strahlung der inkorporierten Radioisotope (Positronenstrahler) wird mit Hilfe von Ringdetektoren wahrgenommen, wodurch eine Messung der dreidimensionalen Verteilung und der Kinetik der injizierten Substanz ermöglicht wird. Im Humanbereich liegt die Auflösung der PET-Scans bei 4-6 mm, im Versuchstier-PET (microPET) bei unter 1,5 mm (PHELPS 2000). Im Gegensatz zu anderen, beispielsweise histologischen Methoden, die eine höhere Auflösung erlauben, bietet die PET den Vorteil, dass eine Anwendung *in vivo* sowohl am Menschen als auch am Versuchstier möglich ist. Dadurch werden wiederholte Messungen ermöglicht.

### 2.2.2 Klinische Anwendungsgebiete der Positronen-Emissions-Tomographie

Eine große Bedeutung kommt der PET im Bereich Tumordiagnostik (KATO et al. 2009) und Tumorstaging (YU et al. 2011) zu. Hierbei ermöglicht die PET ein präoperatives *Staging*

maligner Tumore sowie die Unterscheidung benigner und maligner Erkrankungen und die Differenzierung zwischen Narbe und vitalem Gewebe oder Tumorgewebe (BLESSING et al. 1995). Zudem wird die PET zur Rezidivkontrolle und in der Therapieverlaufskontrolle bei Tumorpatienten eingesetzt (DAMIAN et al. 1996; SAIF et al. 2010). Des Weiteren wird die PET-Diagnostik zur Messung der Stoffwechselleistungen verschiedener Organe verwendet. Auf dem Gebiet der neurologischen Diagnostik erlaubt die PET eine Messung der Perfusion (Durchblutung) im Gehirn. In der Neurologie wird eine PET-Untersuchung daher zur Diagnose von Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Epilepsie sowie bei einem Trauma, Hirninfarkt und Enzephalitis herangezogen. Auch die präoperative Diagnostik vor der Resektion des epileptischen Fokus stellt eine wichtige Indikation für die PET-Untersuchung dar (CHUGANI u. CHUGANI 2000; MAEHARA 2011). Dabei wird in den meisten Untersuchungen 2-Deoxy-2-(<sup>18</sup>F)Fluoro-D-Glucose (FDG) als Marker für die neuronale Aktivität verwendet (RICHARDSON 2010). PET-Untersuchungen sind allerdings mit einer Strahlenbelastung für den Patienten sowie einem hohen Kostenaufwand verbunden (SAIF et al. 2010). Aus diesem Grund werden sie momentan nur bei konkreten Hinweisen auf Veränderungen an einzelnen Patienten durchgeführt oder zum besseren Verständnis von Epilepsien (HENRY 1996; ELGER u. SCHMIDT 2008). In diesem Zusammenhang bietet die PET unter anderem neue Möglichkeiten zur nicht-invasiven Untersuchung des *Multidrug-Transporters Pgp* (POTSCHKA 2010b).

### **3. Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin**

#### **3.1 Anfallsinduzierte neuronale Plastizität**

##### **3.1.1 Neurogenese**

Neuronale Plastizität stellt die Grundlage für eine regelgerechte Entwicklung und Funktion des ZNS dar. In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahrzehnte konnte gezeigt werden, dass Plastizität auch im adulten Gehirn stattfindet (GAGE 2002; MING u. SONG 2005; GOULD 2007). Demzufolge stellt die Plastizität des menschlichen Gehirns im Normalfall ein lebenslanges Phänomen dar (FANG et al. 2011). Die kontinuierliche lebenslängliche Neubildung von Neuronen wird dabei als Neurogenese bezeichnet. Diese findet insbesondere in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (GD) des Hippocampus (GAGE et al. 1998) und der subventrikulären Zone (SVZ) des anterolateralen Seitenventrikels statt (GAGE

2002; MOMMA et al. 2002; FANG et al. 2011). Aufgrund der besonderen Bedeutung des Hippocampus bei Lern- und Gedächtnisvorgängen (SODERLUND et al. 2011) und dessen pathophysiologischer Bedeutung im epileptischen Geschehen (FANG et al. 2011) soll im Folgenden vor allem auf die hippocampale Neurogenese genauer eingegangen werden. Neuronale Vorläuferzellen proliferieren lebenslang in der SGZ des GD im Hippocampus und wandern anschließend in die darüberliegende Körnerzellschicht, um dort zu reifen Körnerzellen auszudifferenzieren (ALTMAN u. DAS 1965; CAMERON et al. 1993; KUHN et al. 1996). Über ihre Dendriten nehmen die neugebildeten Neurone Kontakt mit der Molekularschicht des GD auf, während die Axone eine Verbindung zu den Pyramidenzellen des Hilus und der Cornu Ammonis<sub>3</sub> (CA<sub>3</sub>, Ammonshorn)-Region herstellen (HASTINGS u. GOULD 1999; MARKAKIS u. GAGE 1999). Dadurch integrieren sich die neugebildeten Neurone zum Teil dauerhaft in das hippocampale, neuronale Netzwerk (VAN PRAAG et al. 2002). Bei Lern- und Gedächtnisprozessen wird der hippocampalen Neurogenese eine grundlegende Bedeutung zugeschrieben (SHORS et al. 2001; SHORS et al. 2002; KEMPERMANN et al. 2004). Die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen wird durch Neurotransmittersysteme, Hormone, Wachstumsfaktoren, Umweltreize, physische Bewegung, Strahlungen und neuropathologische Zustände beeinflusst (LEHMANN et al. 2005). Während der Entstehung einer Epilepsie, der sogenannten Epileptogenese, treten neuropathologische Veränderungen des Nervensystems auf (DALBY u. MODY 2001). So konnte sowohl bei Humanpatienten mit Temporallappenepilepsie (CREPEL et al. 2005) als auch im Zusammenhang mit diversen Tiermodellen der Epilepsieforschung (ENGEL et al. 2011) eine gesteigerte Neuronenbildung beobachtet werden. Dabei scheint es, als ob der anfallsinduzierten Neuronenneubildung (KOKAIA 2011) eine zentrale Bedeutung im Rahmen der Epileptogenese-assoziierten Plastizität zukommt (PARENT 2002; PARENT u. LOWENSTEIN 2002; PARENT et al. 2006). Im Rahmen der Untersuchungen, die diese Annahme stützen, konnte ein atypisches Verhalten der neugebildeten Neurone beobachtet werden. Dieses erkennt man daran, dass einige der neugebildeten Körnerzellen aberrierende, d.h. in die supragranuläre Zone reichende, Axone ausbilden (BUCKMASTER et al. 2002). Dadurch nehmen diese Axone keinen Kontakt zu Pyramidenzellen der CA<sub>3</sub>-Region auf, sondern stellen zurücklaufende Verbindungen mit anderen Körnerzellen des GD dar. Auf diese Weise könnten amplifizierende Feedback-Kreisläufe entstehen, die wesentlich zur Anfallsinitiierung und -ausbreitung beitragen. Zudem drückt sich das atypische Verhalten der neugebildeten Neurone darin aus, dass einige der Vorläuferzellen in den Hilus des Hippocampus einwandern und dort zu sogenannten ektopischen Körnerzellen

ausdifferenzieren (SCHARFMAN et al. 2003; JESSBERGER et al. 2005; PARENT et al. 2006). Während bei sich normal entwickelnden Körnerzellen basale bzw. hilare Dendriten nur transient auftreten, wurde bei ektopischen Körnerzellen wiederholt die Persistenz basaler, in den Hilus ziehender Dendriten beschrieben (DASHTIPOUR et al. 2003; SHAPIRO et al. 2005; FANG et al. 2011). Diese Persistenz der basalen Dendriten konnte bereits bei epileptischen Tieren (PEKCEC u. POTSCHKA 2007) und humanen Epilepsiepatienten (VON CAMPE et al. 1997) nachgewiesen werden. Die persistierenden basalen Dendriten könnten als prokonvulsive, strukturelle Netzwerkveränderungen gedeutet werden, die die Entstehung und Ausbreitung der epileptischen Anfälle unterstützen (PEKCEC u. POTSCHKA 2007). Allerdings konnte die funktionale Rolle der gesteigerten Neurogenese in Bezug auf Epilepsieerkrankungen bisher nicht eindeutig geklärt werden (KOKAIA 2011).

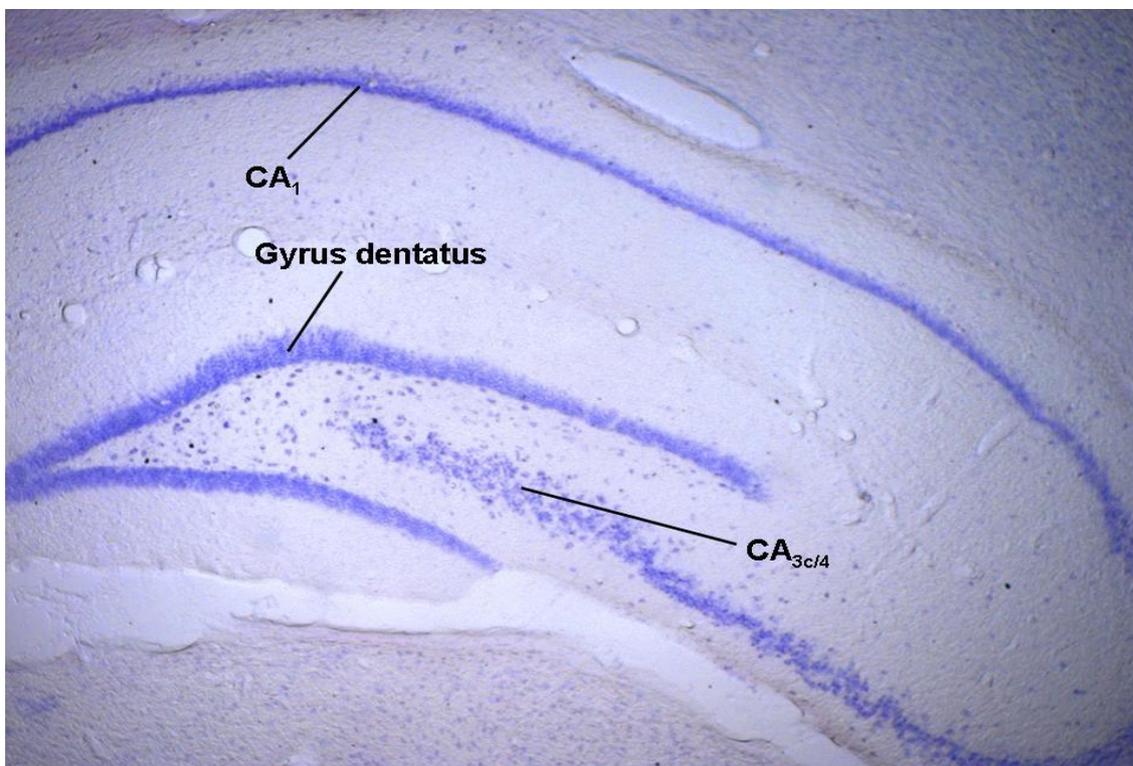
#### 3.1.1.1 Neurogenese und Epilepsie-assoziierte Störungen

Das Auftreten von kognitiven und psychiatrischen Störungen ist bei humanen Epilepsiepatienten deutlich erhöht (DEVINSKY 2003; HERMAN 2004). Einige Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang dieser Erkrankungen und der Dysfunktion der hippocampalen Neurogenese hin (JACOBS et al. 2000; SANTARELLI et al. 2003; MONTARON et al. 2006). Epileptische Anfälle sind mit weit reichenden pathologischen Veränderungen der Neurogenese verbunden (PARENT 2007; PEKCEC u. POTSCHKA 2007). Daher wird vermutet, dass diese anfallsinduzierte Störung der Neurogenese zu einer veränderten Netzwerkintegration der neugebildeten Zellen führt und dadurch funktionelle Ausfälle wie beispielsweise kognitive Defizite bedingt (PARENT 2002). Die neuropathologischen Veränderungen nehmen dabei mit dem Auftreten spontaner wiederkehrender Anfälle immer weiter zu (PEKCEC u. POTSCHKA 2007). Epilepsie-assoziierte kognitive Defizite lassen sich auch tierexperimentell darstellen. Hierfür werden spezifische Lern- und Gedächtnistests eingesetzt (MORRIS 1984).

#### 3.1.2 Neurodegeneration

Im Zusammenhang mit der Epileptogenese stellt die Neurodegeneration die am besten beschriebene Veränderung dar (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt existiert allerdings eine kontroverse Datenlage hinsichtlich der Fragestellung, ob spontan wiederkehrende Anfälle zur Neurodegeneration beitragen (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). In mehreren Studien konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass bestimmte

Anfallstypen Neurodegeneration verursachen (PITKÄNEN u. SUTULA 2002). Der Degeneration der Neuronen können dabei sowohl apoptotische als auch nekrotische Mechanismen zu Grunde liegen (FUJIKAWA et al. 2000b) . Die Pyramidenzellschicht und der Hilus des Gyrus Dentatus sind innerhalb des Hippocampus besonders von der Neurodegeneration betroffen. Betrachtet man die Pyramidenzellschicht, so wird deutlich, dass die CA<sub>1</sub>-Region und die CA<sub>3c</sub>- bzw. CA<sub>4</sub>-Region (Abb. 5) besonders anfällig für eine anfallsinduzierte Neurodegeneration sind. Im Gegensatz dazu scheinen die CA<sub>2</sub>- und die CA<sub>3a</sub>-Region eher unempfindlich auf eine anfallsinduzierte Neurodegeneration zu reagieren (SLOVITER 2005). Die Neurodegeneration beschränkt sich bei Epilepsiepatienten jedoch nicht nur auf hippocampale Gehirnregionen. Ein Verlust an Neuronen wurde ebenso in der Amygdala, dem entorhinalen Cortex (PITKÄNEN et al. 1998; YILMAZER-HANKE et al. 2000; SALMENPERA et al. 2001; PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009) und im piriformen Cortex (FUJIKAWA et al. 2000a) beobachtet. Derzeit wird davon ausgegangen, dass der enorme Verlust von Neuronen mitverantwortlich für eine Störung der hippocampalen Funktion ist und zudem weitere plastische Veränderungen verursacht (SLOVITER 1999; DUDEK et al. 2002).



**Abb. 5: Coronalschnitt durch das Gehirn einer Ratte im Bereich des Hippocampus, wobei die CA<sub>1</sub>- und CA<sub>3c/4</sub>-Region, die vorrangig von einer anfallsinduzierten Neurodegeneration betroffen sind, markiert wurden.**

### 3.2 Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsien

Epilepsiepatienten weisen häufig zusätzlich zu epileptischen Anfällen psychisch-kognitive Begleiterkrankungen auf. Sechs Prozent der Epilepsiepatienten leiden an neuropsychiatrischen Erkrankungen. Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie und/oder refraktärer Epilepsie beträgt der prozentuale Anteil sogar 10-20%. Dabei stellen affektive Störungen die häufigste Erkrankung dar, wobei hier vor allem Depressionen (30%) (GAITATZIS et al. 2004; SANKAR u. MAZARATI 2010; HOPPE u. ELGER 2011), Angststörungen (10-25%), Psychosen (2-7%) und Persönlichkeitsstörungen (1-2%) auftreten (GAITATZIS et al. 2004). Diese neuropsychiatrischen Auffälligkeiten können als Folge der epileptischen Anfälle entstehen oder mit einer zerebralen Grunderkrankung, der Einnahme von Antiepileptika (z.B. Primidon, Phenobarbital) (SMITH et al. 1987) und chirurgischen Eingriffen am epileptischen Fokus zusammenhängen. Sie können jedoch ebenso eine psychosoziale Reaktion darstellen (DEVINSKY 2003). Anhand ihrer zeitlichen Relation zum Auftreten eines Anfalls (Iktus) können Epilepsie-assoziierte psychische Störungen als präiktal, iktal (VIJAYARAGHAVAN et al. 2011), postiktal, interiktal und alternativ klassifiziert werden. Dabei stellen präiktale psychiatrische Symptome sogenannte Prodromi dar, die dem eigentlichen Anfall vorausgehen und Tage bis Stunden dauern können. Das Auftreten der psychischen Störungen wird als iktal bezeichnet, wenn diese Ausdruck der Anfallsaktivität sind. Als postiktal gelten Begleiterkrankungen, die innerhalb von sieben Tagen nach dem Anfall vorkommen. Interiktale Störungen treten unabhängig von dem eigentlichen Anfallsgeschehen auf (DEVINSKY 2003; KANNER 2003). Neben psychiatrischen Komorbiditäten zählen kognitive Störungen zu den häufigsten Epilepsie-assoziierten Begleiterkrankungen (DEVINSKY 2003; BAKER et al. 2011). Dabei nehmen der Anfallstyp (VIJAYARAGHAVAN et al. 2011), die Ätiologie des Anfalls, das Erstmanifestationsalter, die Anfallsfrequenz und -dauer, psychosoziale Faktoren, Nebenwirkungen von Antiepileptika, Pharmakoresistenzen sowie bereits bestehende zerebrale Schäden Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung der kognitiven Störungen (MOTAMEDI u. MEADOR 2003; HUBER et al. 2004).

Obwohl die Symptome neuropsychiatrischer Begleiterkrankungen zumeist denen der idiopathischen Grunderkrankung entsprechen, differiert das Erscheinungsbild Epilepsie-assoziiert neuropsychiatrischer Störungen häufig. Dadurch wird die Diagnosestellung und damit auch eine adäquate Therapie erschwert (DEVINSKY 2003; KANNER 2003). Die

Lebensqualität der Patienten wird durch kognitive Defizite und psychiatrische Komorbiditäten (LEHRNER et al. 1999; JOHNSON et al. 2004) zusätzlich erheblich beeinträchtigt. Dies führt unter anderem dazu, dass Suizid zu einer der häufigsten Todesursachen bei Epilepsiepatienten zählt (GILLIAM u. KANNER 2002). In verschiedenen Studien wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine Depression die Lebensqualität von Epilepsiepatienten stärker beeinträchtigt als die Anzahl der Anfälle oder deren Schweregrad (LEHRNER et al. 1999; KANNER 2003). Allerdings konnten bisher noch keine detaillierten Erkenntnisse über die exakten Zusammenhänge und pathogenen Mechanismen der Assoziation zwischen der Epilepsieerkrankung und psychisch-kognitiven Begleiterkrankungen gewonnen werden (KANNER 2003).

### 3.3 Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien

#### 3.3.1 Einführung

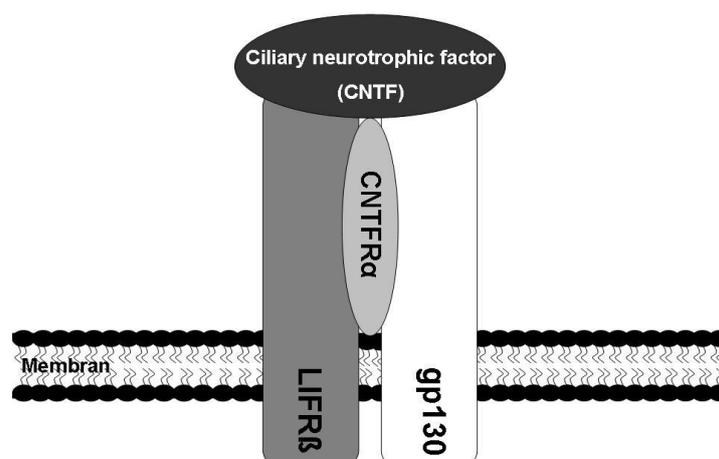
Die Modifikationen, die der Entstehung von Epilepsien zugrunde liegen, werden unter dem Begriff Epileptogenese zusammengefasst (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011) und sind durch entzündliche, neurodegenerative sowie funktionelle neuronale Veränderungen charakterisiert. Da sich der Großteil dieser Veränderungen nach einem initialen Hirninsult erst langsam entwickelt, besteht die Möglichkeit, pharmakologisch in die Prozesse der Epileptogenese einzugreifen. Dadurch kann die Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle, neurodegenerativer Veränderungen, psychiatrischer Komorbiditäten (PITKÄNEN et al. 2011) sowie kognitiver Defizite verhindert oder reduziert werden. Die Protektion neuronaler Zellen vor einer anfallsinduzierten Degeneration stellt eine hoffnungsvolle und bedeutsame Strategie zur Modulation der Epileptogenese sowie zur Behandlung Epilepsie-assoziiierter Komorbiditäten dar (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011). Daher hat die Untersuchung auf dem Markt befindlicher Antiepileptika hinsichtlich ihres neuroprotektiven Potentials (HALONEN et al. 2001; PITKÄNEN 2002; BRANDT et al. 2006b) und die Entwicklung neuer neuroprotektiv wirksamer Antiepileptika in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Des Weiteren wird das neuroprotektive Potential alternativer Behandlungsmöglichkeiten für Epilepsiepatienten untersucht. Zu diesen zählen die Administration von Antioxidantien (GUPTA et al. 2002; WANG et al. 2004; SHIN et al. 2007), eine Hormontherapie mit Östrogenen (VELISKOVA et al. 2000; VELISKOVA et al. 2010) bzw. Progesteron (HOFFMAN et al. 2003; STEVENS u. HARDEN 2011), eine ketogene Diät (NOH et al. 2006; KESSLER et al. 2011) und die Behandlung mit

neurotrophen Faktoren (SIMONATO et al. 2006; SIMONATO u. ZUCCHINI 2010). Einen solchen neurotrophen Faktor stellt der *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) dar. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, dass CNTF eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuronaler Zellen spielt (JANG et al. 2010) und dabei trophische Wirkungen auf parasymphatische, sympathische und sensorische Neurone entfaltet (MONTZ et al. 1985; DITTRICH et al. 1994; SENDTNER et al. 1994). Aus diesem Grund könnte ein Peptid, welches von CNTF abgeleitet wurde, zur Prophylaxe anfallsinduzierter, neuroplastischer Veränderungen geeignet sein.

### *Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)*

Der *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) wurde 1979 entdeckt (ADLER et al. 1979) und nach seiner Fähigkeit benannt, sich entwickelnde Neuronen des embryonalen Ziliarganglions von Hühnern *in vitro* vor dem Zelltod zu bewahren. Im Anschluss daran wurde CNTF auch in vielen anderen Geweben und Tierspezies, wie z.B. Ratte und Kaninchen, nachgewiesen und isoliert (LIN et al. 1989; STOCKLI et al. 1989). Mittlerweile konnte der neurotrophe Effekt von CNTF auch *in vivo* nachgewiesen werden, indem sich nach CNTF-Applikation in Hühnerembryonen eine erhöhte Anzahl von Motoneuronen fand (OPPENHEIM et al. 1991). Der *Ciliary Neurotrophic Factor* wird der Familie der Interleukin-6 (IL-6)-ähnlichen Zytokine zugeordnet (STOCKLI et al. 1989; BAZAN 1991; DOZIO et al. 2005). Die Zytokine der IL-6 Familie werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit (BAZAN 1991) und ihres gemeinsamen Signalweges (GEARING et al. 1992; IP et al. 1992; IP et al. 1993) zu einer Gruppe zusammengefasst. Zu den Vertretern dieser Familie gehören neben CNTF der *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) (GEARING et al. 1987), *Oncostatin-M* (OSM) (ZARLING et al. 1986; MALIK et al. 1989), *Cardiotrophin-1* (CT-1) (PENNICA et al. 1995), *Cardiotrophin-like Cytokine* (CLC), *Cytokine-like Factor* (CLF) (ELSON et al. 2000), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11). Trotz geringerer Homologie hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz besitzen diese Zytokine in ihrer Tertiärstruktur mit vier  $\alpha$ -Helices große Ähnlichkeit (HEINRICH et al. 1998). Im Gegensatz zu den übrigen Vertretern der IL-6 Familie ist CNTF fast ausschließlich im Nervensystem zu finden (HEINRICH et al. 1998). Im peripheren Nervensystem wird CNTF in relativ hohen Konzentrationen vor allem von Schwannzellen exprimiert (STOCKLI et al. 1989). Im zentralen Nervensystem dagegen ist die Expression sehr viel geringer und spezifisch in Astrozyten lokalisiert (STOCKLI et al. 1989; DALLNER et al. 2002). CNTF bindet an Rezeptorkomplexe (Abb. 6), die aus mehreren Untereinheiten bestehen (LIU et al. 2007). Dabei stellen gp130 (HIBI et al. 1990) und der

LIF-Rezeptor- $\beta$  (LIFR $\beta$ ) (GEARING et al. 1991) die transmembranären signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten dar (TAGA u. KISHIMOTO 1992). CNTF benötigt für seine Bindung an den LIFR $\beta$ /gp130-Komplex als dritte Untereinheit ein spezifisches  $\alpha$ -Bindungsprotein (CNTFR $\alpha$ ) (DAVIS et al. 1993). Dieses ist nicht direkt an der Signaltransduktion beteiligt, bildet jedoch mit dem jeweiligen Liganden einen Komplex, der für die Rekrutierung und Aktivierung der signalübertragenden Untereinheiten notwendig ist. CNTFR $\alpha$  ist über eine Glykosylphosphatidylinositol-Bindung in der Membran verankert (DAVIS et al. 1991).



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Rezeptorkomplexes für das Zytokin CNTF. Der Rezeptor besteht aus zwei signaltransduzierenden, transmembranären Untereinheiten (gp130 und LIFR $\beta$ ) und dem Liganden-bindenden CNTFR $\alpha$ .**

Die Signaltransduktion wird durch Tyrosinkinasen eingeleitet. Diese lagern sich an die zytoplasmatischen Domänen von gp130 und LIFR $\beta$  und werden dort durch Heterodimerisierung autophosphoryliert (STAHL u. YANCOPOULOS 1994). Die auf diesem Weg aktivierten Tyrosinkinasen phosphorylieren daraufhin Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich von gp130 und LIFR $\beta$ . Dadurch entstehen Bindungsstellen für Signalmoleküle mit SH2-Domänen (STAHL et al. 1995). Zu diesen gehört unter anderem die Gruppe der STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*), die eine bedeutende Rolle bei der Zytokin-induzierten Signaltransduktion spielen (STAHL u. YANCOPOULOS 1994). Insgesamt sind 6 STAT-Proteine bekannt (STAT1-6), von denen vor allem STAT1 und STAT3 von CNTF aktiviert werden (AKIRA et al. 1994). Nach der Phosphorylierung der STAT-Proteine kommt es zu deren Dimerisierung. Dadurch können Homodimere oder Heterodimere entstehen, die in den Zellkern translozieren. Dort fungieren

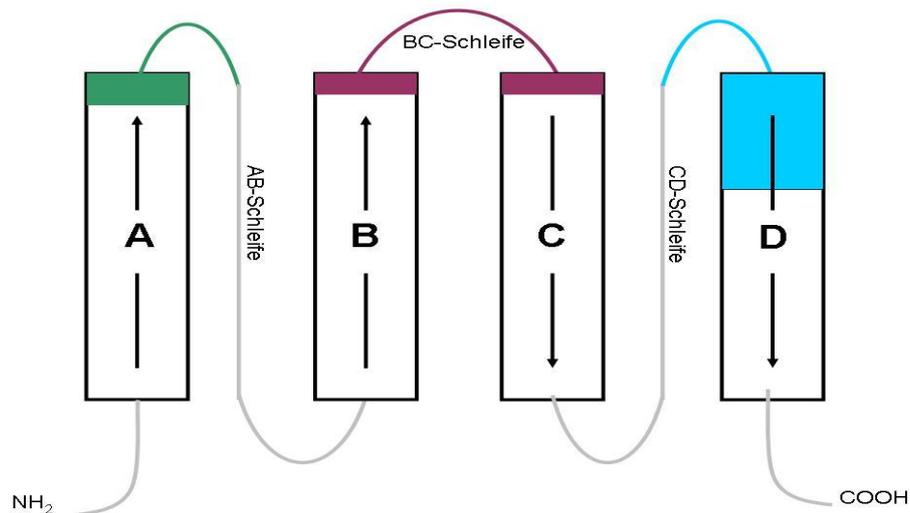
sie als Transkriptionsfaktoren, indem sie an spezifische DNA-Sequenzen binden und die Transkription bestimmter Zielgene induzieren. Dieser Weg der Signaltransduktion wird als Jak/STAT-Weg bezeichnet. Ein wichtiges Zielprotein, das dadurch reguliert wird, ist das astrozytäre Intermediärfilamentprotein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Dieses wird unter anderem bei einer Aktivierung der Astrozyten in erhöhtem Maße exprimiert (LEE et al. 1997). Im Jahr 2010 konnte nachgewiesen werden, dass aktivierten Astrozyten eine protektive Rolle in bestimmten Tiermodellen der Temporallappenepilepsie zukommt (HAAS 2010). Neben dem bereits beschriebenen Weg der Signaltransduktion existieren noch zwei weitere Signalwege, die durch den CNTF-Rezeptorkomplex aktiviert werden. Über den MAP-Kinase-Signalweg kommt es durch Phosphorylierung zur Aktivierung einer Reihe von Proteinen (SHP2, GRB2, Sos, Ras, MEK1). Am Ende dieser Signaltransduktion steht die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase MAPK1 (*Mitogen-activated Protein Kinase 1*, Erk1/Erk2). Diese Signalkaskade ist vor allem für die Regulation von Proteinen des Zellzyklus und der DNA-Synthese verantwortlich. Die aktivierte MAP-Kinase kann jedoch auch in die Phosphorylierung der STAT-Proteine eingreifen. Dadurch wird deutlich, dass diese beiden Signalwege eng miteinander verknüpft sind (KISHIMOTO et al. 1994). Der dritte Signalweg, der durch die Bindung von CNTF an den Rezeptorkomplex reguliert wird, ist die PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Akt-Kaskade (BOULTON et al. 1994; QIU et al. 1998). Über die Bedeutung dieser Signalkaskade ist bisher relativ wenig bekannt. Allerdings wird eine Apoptose-inhibierende Funktion diskutiert. Obwohl CNTF einige neuroprotektive Eigenschaften besitzt, wurde es bisher aufgrund seiner Nebenwirkungen, die unter anderem Anorexie, Hyperalgesie, Krämpfe und Muskelschmerzen umfassen, in der Klinik noch nicht eingesetzt (BLANCHARD et al. 2010).

### 3.3.2 Mimetische Peptide

Peptide bestehen aus einzelnen aneinandergereihten Aminosäuren. Dabei werden Oligopeptide (2-10 Aminosäuren) und Polypeptide (10-100 Aminosäuren) unterschieden. Die Aminosäuresequenz (=Primärstruktur) und die dreidimensionale räumliche Anordnung der Aminosäuren (Sekundär- und Tertiärstruktur) bestimmen die Funktion des Peptids. Mimetische Peptide kopieren nicht die gesamte Aminosäuresequenz eines Peptids, sondern stellen lediglich einen kleinen funktionell bedeutsamen Ausschnitt desselben dar. Die Funktion des Peptids und damit seine uneingeschränkte Wirksamkeit sollen dabei unverändert bleiben, während sich unerwünschte Effekte ausschalten lassen.

### 3.3.2.1 Cintrofin

Cintrofin stellt ein mimetisches Peptid dar, welches von CNTF abgeleitet wurde. In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein bestimmtes Epitop des CNTF (Abb. 7), welches aus drei verschiedenen Regionen besteht (C-terminale A-Helix/ N-terminale AB-Schleife, BC Schleife, C-terminale CD-Schleife/N-terminale D-Helix) wichtig für dessen hohe Bindungsaffinität gegenüber dem LIF-Rezeptor- $\beta$  ist (KALLEN et al. 1999).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des CNTF-Epitops, welches wichtig für die hohe Bindungsaffinität des CNTF gegenüber dem LIF-Rezeptor ist und von dem das mimetische Peptid Cintrofin abgeleitet wurde (mod. nach KALLEN et al. 1999).**

Von diesem Epitop wurde das mimetische Peptid Cintrofin abgeleitet. Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass Cintrofin sowohl an den LIF-Rezeptor als auch an gp130 bindet, die STAT3-, Akt- und Erk-Phosphorylierung in primären Neuronen induziert, neuronale Differenzierung hervorruft und *in vitro* das Überleben der Neurone fördert (RATHJE et al., in press). In bisherigen Studien konnten zudem sowohl präventive als auch kurative Effekte durch den Einsatz mimetischer Peptide erzielt werden (KLEMENTIEV et al. 2007; PANKRATOVA et al. 2010). Zu diesen mimetischen Peptiden zählen unter anderem FGL (KLEMENTIEV et al. 2007), Epotris (PANKRATOVA et al. 2010; ZELLINGER et al. 2011b) und Plannexin (ZELLINGER et al. 2011a).

## 3.4 Verhaltensuntersuchungen

### 3.4.1 Einführung

Im Rahmen mehrerer Studien konnte bereits gezeigt werden, dass in Tiermodellen experimentell induzierter Epilepsie Verhaltensstörungen sowie Lern- und Gedächtnisdefizite auftreten. Dabei gelten das Alter der Tiere bei Anfallsbeginn, die Krampfstärke und die Frequenz der Anfälle als Einflussfaktoren (STAFSTROM 2006). Da das verwendete Tiermodell eines Verhaltenstests häufig jedoch kein Korrelat zu menschlichem neurophysiologischem Verhalten darstellt, sollte eine Extrapolation der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen vorsichtig vorgenommen werden (STAFSTROM 2006).

### 3.4.2 Verhaltensmodelle

#### 3.4.2.1 Open Field

Das *Open Field* (Offenfeld) wurde 1934 erstmals beschrieben (HALL 1934). Somit gehört es zu den ältesten Methoden der tierexperimentellen Verhaltensforschung. Gewöhnlich wird dieser Test zur Bestimmung von Lokomotion und angstähnlichem Verhalten eingesetzt (CRABBE 1986; LANDGRAF u. WIGGER 2002; KESSLER et al. 2007). Aufgrund der Möglichkeit zur schnellen und einfachen Messung von klar definierten Verhaltensweisen wird das *Open Field* sehr häufig eingesetzt (WALSH u. CUMMINS 1976). Die Untersuchungen des Verhaltens finden dabei in einer allseits von Wänden umgebenen Arena statt (PRUT u. BELZUNG 2003). Mittlerweile existieren verschiedene Abwandlungen des Versuchsaufbaus hinsichtlich Größe, Form (zirkulär bis rechteckig), Beleuchtung (schwach bis hell erleuchtet oder unter Rotlicht) und Anreicherungen (Anbieten von Objekten oder Futter) (PRUT u. BELZUNG 2003). Die Versuchsdauer kann dabei beträchtlich variieren. Meist dauert ein Durchlauf jedoch fünf bis zehn Minuten (PRUT u. BELZUNG 2003; GASTENS et al. 2008; JONES et al. 2009). Während dieser Zeitspanne können verschiedenste Verhaltensparameter, wie horizontale Fortbewegung oder vertikale Aktion und Pflegeverhalten aufgezeichnet werden (PRUT u. BELZUNG 2003). Das Prinzip beruht bei diesem Test auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Nagetiere das Betreten von ihnen unbekanntem und hell erleuchteten Freiflächen, die ihnen keine Rückzugsmöglichkeit bieten, eher vermeiden (PRUT u. BELZUNG 2003). Bei erstmaligem Einsetzen in das Offenfeld ist das Verhalten von Nagetieren daher einerseits vom Erkundungsdrang (Explorationsverhalten) und andererseits von der Angst vor der unbekanntem Umgebung geprägt. Durch eine zentrale oder

periphere Platzierung der Tiere im Offenfeld wird eine erzwungene Konfrontation herbeigeführt (PRUT u. BELZUNG 2003). In einer solchen Situation ziehen Nagetiere spontan die Peripherie der Mitte vor und bewegen sich vorzugsweise nahe den Wänden fort (Thigmotaxis) (PRUT u. BELZUNG 2003). Bisher konnte gezeigt werden, dass sich Ratten, bei denen durch einen elektrisch induzierten SE eine chronische Epilepsie verursacht wurde, im Offenfeld hyperaktiv verhalten (BRANDT et al. 2006b).

#### 3.4.2.2 Elevated Plus Maze

Der *Elevated Plus Maze* Test wurde 1984 als Modell für die Untersuchung angstinduzierten Verhaltens eingeführt (HANDLEY u. MITHANI 1984). Seitdem ist er ein bedeutender und häufig eingesetzter Test für angstassoziiertes Verhalten (HANDLEY u. MITHANI 1984). Die Verhaltensuntersuchungen finden dabei mithilfe einer Apparatur statt, die aus zwei offenen und zwei an den Seiten durch Begrenzungswände geschlossenen Armen besteht (HANDLEY u. MITHANI 1984). Diese Arme sind in Form eines „+“ angeordnet (HANDLEY u. MITHANI 1984). Das Prinzip dieses Tests beruht auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Nagetiere einerseits ungeschützte, helle sowie erhöhte Flächen ohne Rückzugsmöglichkeiten meiden (MONTGOMERY 1955), um potentiellen Fressfeinden zu entgehen, andererseits jedoch sehr neugierig sind und neue Räume erkunden wollen (HENNIGER et al. 2000). Tiere mit gesteigertem angstassoziiertem Verhalten halten sich bei diesem Test vorwiegend in den geschlossenen Armen auf und meiden die offenen Arme, da in diesen keine Möglichkeit zur Thigmotaxis besteht. Demzufolge kann dort keine Abtastung der Umgebung durch die Vibrissen der Tiere stattfinden (RODGERS u. DALVI 1997). Die Aufenthaltsdauer auf den aversiven offenen Armen ist einer der wichtigsten Parameter für die Risikobereitschaft der Tiere. Diese Risikobereitschaft lässt sich pharmakologisch mithilfe von anxiolytisch oder anxiogen wirkenden Substanzen beeinflussen (HANDLEY u. MITHANI 1984). Nach einem elektrisch induzierten SE verhielten sich chronisch epileptische Ratten im *Elevated Plus Maze* in den bisherigen Studien hyperaktiv (BRANDT et al. 2006b). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass diese Tiere sich länger auf den aversiven offenen Armen aufhalten als Kontrolltiere (BRANDT et al. 2006b).

### 3.4.2.3 Black White Box

Die *Black White Box* wurde im Jahr 1980 erstmals beschrieben (CRAWLEY u. GOODWIN 1980). Sie ist ein wichtiger Test zur Erfassung von angstassoziiertem Spontanverhalten. Wie der *Elevated Plus Maze* Test, beruht auch sie auf der Konfliktsituation, in der sich eine Ratte in einem unbekanntem Umfeld befindet (COSTALL et al. 1989). Die Verhaltensuntersuchungen finden dabei in einer Apparatur statt, die aus einem größeren weißen und einem kleineren schwarzen Kompartiment besteht. Diese Kompartimente sind durch eine Öffnung miteinander verbunden. Da Ratten zu den nachtaktiven Tieren zählen, halten sie sich bevorzugt in der schwarzen Hälfte der *Black White Box* auf. In den bisherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Verabreichung von anxiolytisch wirkenden Pharmaka zu einer vermehrten Exploration im weißen Kompartiment der *Black White Box* führt (CHAOULOFF et al. 1997).

### 3.4.2.4 Morris Water Maze

Das *Morris Water Maze* wurde 1982 etabliert (MORRIS et al. 1982) und dient dazu, räumliches Orientierungsvermögen sowie Lern- und Gedächtnisleistung zu überprüfen. Mit Hilfe dieses Tests lassen sich Lern- und Gedächtnisdefizite von Defiziten der Sensorik, Motorik und Motivation unterscheiden (MCNAMARA u. SKELTON 1993). Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die Tiere innerhalb eines wassergefüllten Beckens von wechselnden Startpunkten aus eine versteckte Plattform aufsuchen müssen. Bei dieser durch die Aversivität des Wassers motivierten Suche (HODGES 1996) spielen sowohl assoziative wie auch räumlich orientierte Lernprozesse eine Rolle. Die räumliche Orientierung wird durch Hinweisreize (*Cues*) ermöglicht, welche die Tiere nutzen, um eine Art „kognitive Landkarte“ ihres Umfeldes zu formen (HODGES 1996). Der Lernerfolg zeigt sich im Verlauf einer mehrtägigen Trainingsphase durch ein zunehmend schnelleres Auffinden der Plattform. Mithilfe von Läsionsmodellen des Hippocampus und anderer Gehirnregionen sowie anhand pharmakologischer Studien lassen sich im *Morris Water Maze* Einflüsse auf die Suchstrategie der Tiere feststellen (MORRIS et al. 1982; WHISHAW u. TOMIE 1987; LOGUE et al. 1997). Epileptische Tiere zeigen im *Morris Water Maze* ein gestörtes räumliches Lern- und Gedächtnisvermögen, wobei Tiere unterschiedlichen Alters, verschiedener Spezies und Stämme davon betroffen sind (STAFSTROM 2006). Nach einem elektrisch induzierten SE fiel es den Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren schwerer, die Plattform aufzufinden

(BRANDT et al. 2006b). Dies wurde mit einer möglichen Kontextstörung in Verbindung gebracht (BRANDT et al. 2006b).

### III. Arbeitshypothesen und Zielsetzung

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurden mögliche neue Strategien sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe von Epilepsien experimentell überprüft. Im ersten Teilprojekt wurde die Funktion des *Multidrug*-Transporters P-Glykoprotein mithilfe einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) genauer untersucht. Im Rahmen des zweiten Teilprojekts wurde das Potential des Peptidmimetikums Cintrofin für die Prävention symptomatischer (strukturell metabolischer) Epilepsien und assoziierter psychiatrischer und kognitiver Störungen evaluiert.

1. Aufgrund der großen Anzahl pharmakoresistenter Epilepsiepatienten kommt der Entwicklung neuer Therapiestrategien auf diesem Gebiet eine große Bedeutung zu. Einen neuen Ansatzpunkt stellt dabei der *Multidrug*-Transporter P-Glykoprotein (Pgp) dar, der sich an der Blut-Hirn-Schranke befindet. Dort vermittelt er den Abtransport vieler körperfremder Stoffe. Diesem *Multidrug*-Transporter wird im Zusammenhang mit dem Auftreten pharmakoresistenter Epilepsien eine wichtige Rolle zugeordnet. Die detaillierte Erforschung von Pgp und seinem Mechanismus könnte folglich eine Möglichkeit zur Überwindung der Pharmakoresistenz darstellen. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines neuen Radiopharmakons zur Darstellung der Pgp-Funktion in der nuklearmedizinischen Diagnostik sowie die Aufklärung an der Pharmakoresistenz beteiligter Mechanismen. Auf diesen Untersuchungen basierend wird der Gebrauch neuer Radiopharmaka bei Therapien pharmakoresistenter Epilepsiepatienten validiert und neue therapeutische Strategien für resistente Epilepsiepatienten entwickelt.

2. In diversen Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, dass CNTF eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuronaler Zellen spielt und dabei trophische Wirkungen auf parasymphatische, sympathische und sensorische Neurone entfaltet (MONTZ et al. 1985; DITTRICH et al. 1994; SENDTNER et al. 1994). Aus diesem Grund könnte ein CNTF-mimetisches Peptid zur Prophylaxe anfallsinduzierter, neuroplastischer Veränderungen geeignet sein. Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob das CNTF-mimetische Peptid Cintrofin die Ausprägung epileptischer Anfälle beeinflusst. Des Weiteren soll durch verschiedene Verhaltensuntersuchungen sowie einen Lern- und Gedächtnistest überprüft werden, ob Cintrofin die Ausprägung Epilepsie-assoziiierter Verhaltensänderungen und kognitiver Defizite verhindern oder abschwächen kann. Durch umfassende

immunhistologische Untersuchungen wird abschließend untersucht, inwieweit Effekte von Cintrofin auf die Epilepsieentstehung und auf Epilepsie-assoziierte Verhaltensänderungen auf die Beeinflussung molekularer und zellulärer Prozesse zurückzuführen sind. Die im Rahmen des Projektes zu erhebenden Daten versprechen eine Basis für die Entwicklung innovativer Strategien und translational weiterzuentwickelnder Konzepte für die Prävention symptomatischer Epilepsien. Die neuronalen Veränderungen während des Entstehungsprozesses der Epilepsie sollen durch das Peptidmimetikum Cintrofin dahingehend modifiziert werden, dass die Epilepsie-assoziierten Störungen verhindert oder abgemildert werden.

## IV. Material und Methoden

### 1. Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions-tomographischen Verfahrens

#### 1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen der P-Glykoprotein (Pgp)-Funktion in pharmakoresistenten und pharmakosensitiven epileptischen Ratten mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wurden im Rahmen einer Tierversuchs-Anzeige (*Ethics Committee for Animal Experiments of Leiden University*, Aktenzeichen UDEC09223) durchgeführt. Für die Versuche im elektrischen Status epilepticus (SE)-Modell mit elektrischer Stimulation der basolateralen Amygdala wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) mit einem Gewicht von 200-224 g verwendet.

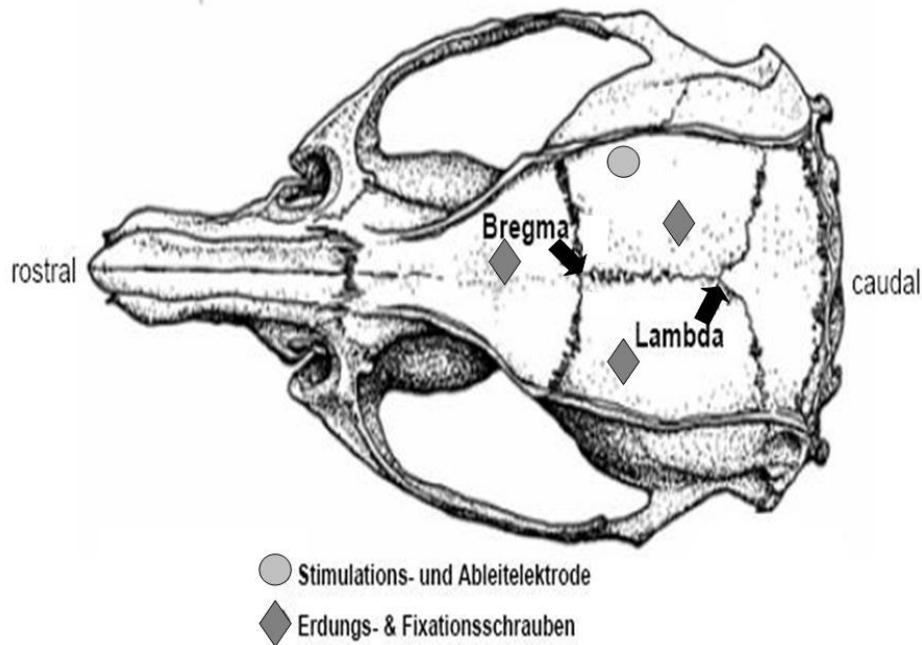
Die Tiere wurden einzeln in „Makrolonkäfigen Typ III hoch“ gehalten. Als Einstreu der Käfige diente Weichholzgranulat (Grade 5; Altromin). Die Tiere erhielten Ssniff Rattenfutter (Ssniff R/M Haltung, Spezialdiäten GmbH) und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Das Umsetzen der Ratten in saubere Käfige erfolgte einmal pro Woche, wobei darauf geachtet wurde, dass das Umsetzen stets ein bis zwei Tage vor den einzelnen Teilversuchen stattfand, um eine Beunruhigung der Tiere direkt vor dem Experiment zu vermeiden. Die Tiere wurden bei einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (Licht an 7:00; Licht aus 19:00 MEZ) gehalten. Die Umgebungstemperatur im Tierraum betrug 20-24°C, die Luftfeuchtigkeit 50-60%. Nach ihrer Ankunft hatten die Ratten bis Versuchsbeginn mindestens vier Tage Ruhe, um sich an die neue Umgebung zu habituierten. An mindestens drei Tagen vor dem geplanten Versuch wurden alle Tiere durch Handling (Anwendung von Fixationsmethoden) an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Der Beginn der Versuche lag stets zwischen 7:00 und 9:00 MEZ, da so circadiane Einflüsse möglichst gering gehalten werden können (STEWART et al. 2001).

## 1.2 Elektrisches SE-Modell

### *Elektrodenimplantation*

Zur Implantation der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) wurde eine stereotaktische Operationstechnik angewendet. Vor Beginn der Operation wurde den Ratten das Narkotikum Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml/kg 0,9%iger NaCl-Lösung) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Um eine perioperative Analgesie gewährleisten zu können, wurde den Ratten sowohl 30 min vor der Operation als auch 24 Stunden im Anschluss daran 1 mg/kg Meloxicam (Metacam® Injektionslösung, Boehringer Ingelheim) subkutan appliziert. Vitagel Augengel (Vitagel®, Bausch & Lomb, Berlin) wurde in beide Augen der Ratten eingebracht, um deren Austrocknung während der Operation zu verhindern. Als Lokalanästhetikum wurde Bupivacain (Bupivacain 0,5%, JENAPHARM®) verwendet, das in einer Menge von circa 0,8 ml subkutan an der Schädeloberfläche appliziert wurde.

Um die Elektrode exakt positionieren zu können, wurden die narkotisierten Ratten anschließend in einen stereotaktischen Apparat (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) eingespannt. Der stereotaktische Atlas von PAXINOS und WATSON (2005), der die Lage der Hirnstrukturen in Bezug auf Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) wiedergibt, diente während der Operation zur Orientierung, um eine punktgenaue Implantation zu erreichen. Dem stereotaktischen Atlas ist zu entnehmen, dass Lambda (caudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) und Bregma auf der gleichen Höhe liegen müssen, wenn eine exakte Positionierung der Elektrode erreicht werden soll (Abb. 8). Dies wurde dadurch gewährleistet, dass die Oberkieferhalterung auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie eingestellt wurde. Im Vorfeld der Operation wurden Lokalisationsversuche durchgeführt, auf welchen die anschließende Implantation der Stimulationselektrode in die basolaterale Amygdala (BLA) basierte. Die Implantation der Elektrode erfolgte im Bereich der rechten Hemisphäre anteriorposterior (ap) +2,2, lateral (lat) +4,8 und dorsoventral (dv) +8,6 (PAXINOS 2005). Zur Befestigung der Elektrode wurden zwei Fixationsschrauben in der Schädeldecke befestigt, von denen eine rostral und eine caudal der implantierten Tiefenelektrode angebracht wurde. Zusätzlich wurde gegenüberliegend der Elektrode eine indifferente Erdungselektrode mittels einer Schraube am Schädelknochen der Ratte befestigt (Abb. 8).



**Abb. 8: Aufsicht auf den Rattenschädel mit Darstellung der Lokalisation der Stimulations- bzw. Ableitelektrode und der Fixationsschrauben. Modifiziert nach PAXINOS und WATSON (2005).**

Die Erdung bestand aus einem teflonisolierten Draht, der die Verbindung zwischen einer Schädelschraube und einer Messingbuchse herstellte. Zur dauerhaften und stabilen Befestigung der Elektrode und der Fixationsschrauben am Schädelknochen wurde kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur<sup>®</sup>; Heraeus Kulzer, Hanau) verwendet. Dieser Kunststoff wurde in zwei Schichten aufgetragen, wobei die erste Schicht Paladur, die direkten Kontakt zum Schädelknochen hatte, mit 2,1% Gentamicinsulfat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) gemischt wurde. Dadurch sollten mögliche Wundinfektionen vermieden werden. Zusätzlich wurde den Tieren 1 mg/kg Marbocyl (Marbocyl<sup>®</sup> FD1%, Vétquinol) zweimal täglich (morgens und abends) am Tag vor der Operation, am Tag der Operation und an den sechs auf die Operation folgenden Tagen subkutan appliziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den beiden täglichen Antibiose-Applikationen stets sechs Stunden lagen. Auf die Operation folgte eine sechswöchige Regenerationsphase.

*SE-BLA-Modell*

Bei diesem Epilepsiemodell wird durch eine 25-minütige Stimulation der basolateralen Amygdala elektrisch ein sich selbsterhaltender Status epilepticus (SSSE) in naiven Ratten induziert. Vor Beginn der Stimulation wurde das Körpergewicht der Tiere mithilfe einer Waage ermittelt. Im darauffolgenden Schritt wurde der Steckeraufsatz auf dem Kopf der Ratte über ein zweiadriges abgeschirmtes Kabel mit der Aufzeichnungseinheit verbunden. Dadurch konnte vor der Stimulation das Ruhe-Elektroenzephalogramm (EEG) jeder Ratte aufgezeichnet werden, um so mögliche Normabweichungen zu erfassen. Danach folgte die Verbindung der Tiere mit der Stimulationseinheit (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator A365, World Precision Instruments, Berlin). Dies geschah ebenfalls über ein zweiadriges abgeschirmtes Kabel. Die Stimulation erfolgte kontinuierlich über 25 min. Dabei wurden pro Sekunde zwei Einzelpulsserien (100 ms Dauer mit 1 ms dauernden, alterierend positiv-negativ geladenen Rechteckimpulsen) mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Stromstärke von 700  $\mu$ A erzeugt. Über die gesamte Stimulationszeit hinweg wurden die Tiere beobachtet und die Anfallsschwere nach der in Tabelle 2 aufgeführten Skala bewertet.

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

**Tab. 2: Skala der Krampfstadien (RACINE 1975)**

Am Ende der 25-minütigen Stimulation wurde der Steckeraufsatz auf dem Kopf der Ratte erneut mit der Aufzeichnungseinheit verbunden und für einige Minuten ein EEG aufgezeichnet. Dadurch sollte kontrolliert werden, ob sich die Ratte im SSSE (selbsterhaltender Status epilepticus) befindet. Ein SSSE ging mit einer charakteristischen EEG-Veränderung (mindestens 3 Hz mit doppelter Amplitudenhöhe im Vergleich zu Ausschlägen im Ruhe-EEG) und anhaltender, motorischer Krampfaktivität einher. Anschließend wurden die Ratten über 215 min hinweg kontinuierlich beobachtet. Dabei wurden die Schwere der isolierten Anfälle und der Typ des SSSE dokumentiert. Der Status epilepticus wurde 240 min nach Stimulationsbeginn mit 10 mg/kg Diazepam i.p. abgebrochen. Falls die einmalige Applikation von Diazepam nicht ausreichte, um den Status epilepticus zu unterbrechen, erfolgte eine zweite Applikation von Diazepam in der gleichen Dosierung. Tiere, bei denen durch die 25-minütige Stimulation kein SSSE induziert werden konnte, wurden von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

Bei den Ratten, bei denen durch die Stimulation ein SSSE ausgelöst werden konnte, wurden drei unterschiedliche Typen von SSSE unterschieden (BRANDT et al. 2003). Dabei erfolgte die Einteilung des SSSE in fokalen SSSE, fokalen SSSE mit einzelnen generalisierten Anfällen und generalisierten SSSE. Ein fokaler SSSE ist gekennzeichnet durch das kontinuierliche und ausschließliche Auftreten fokaler Anfallsaktivität (Stadium I-III). Bei einem fokalen SSSE mit einzelnen generalisierten Anfällen werden die fokalen Anfälle immer wieder von einzelnen generalisierten Anfällen (Stadium IV und V) unterbrochen. Ein generalisierter SSSE ist gekennzeichnet durch konstante generalisierte Anfälle (Stadium IV-V). Dabei kann die kontinuierliche Anfallsaktivität von Anfällen des Stadiums VI begleitet werden.

### 1.3 Anfallsparameter

Die Bewertung der Anfallsstadien erfolgte basierend auf einer von BARAN et al. (1995) modifizierten Skala (Tabelle 2) von RACINE (1975). Die Beurteilung der Krampfschwere und Krampfdauer der epileptischen Anfälle erfolgte während der akuten Induktion eines SE.

## 1.4 Überwachung spontaner Anfälle

Die Überwachung spontaner Anfallsaktivität begann 12 Wochen nach Ende der BLA-Stimulation und dauerte 20 Tage lang. Für die Überwachung der spontan auftretenden Anfälle wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine bereits vorhandene Überwachungseinheit mit 16 Überwachungsplätzen verwendet. Die systematische Anfallsüberwachung erfolgte mithilfe einer Elektroenzephalogramm (EEG)-Ableitung und zusätzlichem Videomonitoring. Tiere, die ihre Elektrode verloren hatten, konnten dabei ausschließlich videoüberwacht werden. Das Verhalten der Tiere konnte somit kontinuierlich 24 Stunden/Tag und sieben Tage die Woche aufgezeichnet werden. Zusätzlich wurden die Anfälle, die durch das Handling der Tiere auftraten, klassifiziert und notiert.

### *EEG-Aufzeichnung*

Mithilfe der EEG-Daten konnte der Anfallszeitpunkt ermittelt werden, wobei die Anfälle anschließend mithilfe der Videoaufnahmen klassifiziert wurden. Zur Aufzeichnung des EEGs wurden 16 Ein-Kanal-Verstärker (Animal Bio Amp, ADInstruments Ltd, Hastings, UK), zwei Analog-Digitalwandler (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd) und ein Personalcomputer mit entsprechender Software (Chart5 für Windows) verwendet. Mit diesem System konnten die Signale von 16 Ratten parallel verarbeitet und aufgezeichnet werden. Die Abtastrate betrug dabei 200 Hz. Die Einstellung des „low pass Filter“ betrug 60 Hz, die des „high pass Filter“ 0,1 Hz. Zur Filterung des 50 Hz Frequenzbereiches (Frequenz des Netzstroms) wurde ein Notch-Filter verwendet.

Die Kabel, die zur Ableitung der EEGs verwendet wurden, mussten selbst hergestellt werden, da im Handel keine Kabel erhältlich waren, die den Tieren ausreichend Bewegungsfreiraum gewährleisten konnten und zudem eine störungsfreie Aufnahme ermöglichten. Dabei handelte es sich um zweiadrige, abgeschirmte, ummantelte Kabel, in die ein Telefonenzwirler eingebaut wurde. Die Abschirmung der Kabel wurde mithilfe einer Krokodilklemme am Verstärker geerdet, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Die aufgezeichneten EEGs jedes Tieres wurden anschließend mithilfe des Programms „Chart5“ visuell analysiert.

### *Video-Aufzeichnung*

Für die Video-Aufzeichnungen wurden vier CCD-Kameramodule für Schwarz-Weiß-Aufnahmen (Conrad Electronic GmbH, Hannover) verwendet, die sich durch ihre Empfindlichkeit im Infrarotbereich auszeichneten.

Mithilfe einer Kamera konnten vier Ratten aufgezeichnet werden. Da vier Kameras zur Verfügung standen, konnten so insgesamt 16 Ratten zur selben Zeit überwacht werden. Die Kameras waren mit einem Computer verbunden, der das Datenmaterial auf einer RAID (*Redundant Array of Independent Discs*) speicherte. Um das Verhalten jeder Ratte optimal aufnehmen zu können, wurden Glasaquarien als Käfige verwendet. Jedes Aquarium war 60 cm x 40 cm x 40 cm groß. Um sicherzustellen, dass die Ratten sich jederzeit im Blickwinkel der Kamera aufhalten, wurde jedes Aquarium halbiert und stellte somit Raum für zwei Ratten zur Verfügung.

Die Aufzeichnung des Verhaltens der Tiere auf Video erfolgte parallel zu den EEG-Ableitungen. Bei im EEG auftretenden Spikes mit hoher Amplitude wurden anhand der Video-Aufzeichnung das Verhalten und die motorische Aktivität klassifiziert. Dadurch konnten Krampfschwere, -dauer und genauer Zeitpunkt des Krampfes beurteilt und notiert werden. Wenn die EEG-Ableitungen einzelner Tiere gestört waren, wurden nur die Video-Aufzeichnungen ausgewertet.

Die Videoaufnahmen wurden mithilfe des Programms Digi-Protect Searcher 6.275 beta software (ABUS Security-Tech, Affing, Germany) analysiert.

## 1.5 Selektion von Respondern und Non-respondern

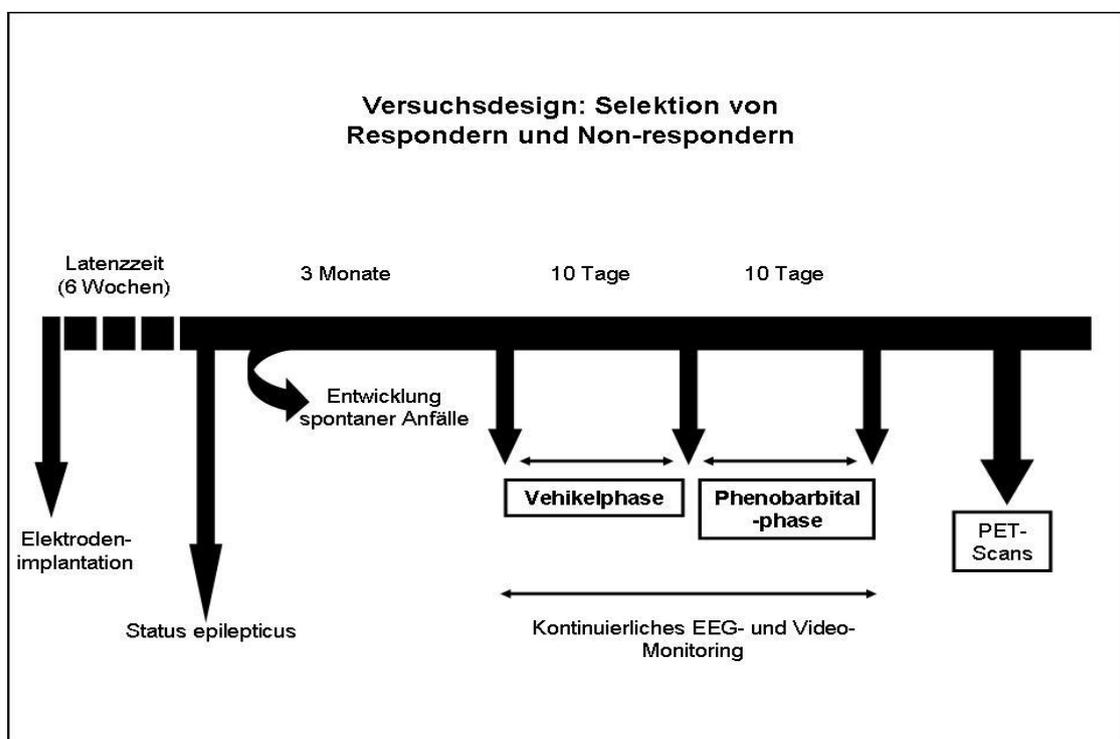
Die Selektion der Ratten erfolgte während der 20-tägigen kontinuierlichen EEG- und Video-Überwachung (Abb. 9).

Zunächst erfolgte eine zehntägige Vehikelphase. Dabei wurde 16 SE-Tieren mit spontan wiederkehrenden Anfällen und 12 Kontrolltieren zehn Tage lang zweimal täglich (morgens um 8 Uhr und abends um 18 Uhr) 3 ml/kg 0,9%ige isotonische Natriumchlorid-Lösung (B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Germany) i.p. appliziert.

Im Anschluss an diese zehn Tage folgte die ebenfalls zehntägige Phenobarbitalphase, bei der die 16 SE-Tiere mit spontan wiederkehrenden Anfällen und die 12 Kontrolltiere am ersten Tag um 8 Uhr morgens eine einmalige i.p. Bolus-Applikation von 25 mg/kg Phenobarbital (Sigma, Steinheim, Germany) erhielten. Zehn Stunden später erfolgte eine weitere Injektion

mit einer Dosierung von 15 mg/kg i.p. In den darauffolgenden neun Tagen wurde den insgesamt 28 Ratten zweimal täglich (morgens um 8 Uhr und abends um 18 Uhr) Phenobarbital in einer Dosierung von 15 mg/kg appliziert. Phenobarbital wurde dabei vor der Applikation in 0,9%iger isotonischer Natriumchlorid-Lösung (B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Germany) gelöst und in einem Applikationsvolumen von 3 ml/kg injiziert. Während der Phenobarbital- und der Vehikelpphase wurden die Ratten auf nachteilige Effekte der Injektionen, wie zum Beispiel Ataxie und Sedation, überwacht.

Bei drei Kontrolltieren und drei SE-Tieren kam es im Verlauf des Versuches zu einer rapiden Verschlechterung des Allgemeinbefindens, so dass diese Tiere euthanasiert werden mussten. Im Anschluss an das EEG- und Video-Monitoring wurden die Anfälle der Tiere ausgewertet. Durch den Vergleich der Anfallsfrequenz in der Vehikelpphase gegenüber der Phenobarbitalphase konnten die Ratten daraufhin in *Responder* und *Non-responder* unterteilt werden. Dazu wurde im Rahmen dieser Studie die Definition der Internationalen Liga gegen Epilepsie herangezogen (KWAN et al. 2010). Demzufolge wurden alle Tiere, bei denen die Applikation von Phenobarbital zu einer 100%-igen Anfallsreduktion geführt hatte, als *Responder* bezeichnet. Der Begriff *Non-responder* bezeichnete dagegen Tiere, die trotz der Behandlung mit Phenobarbital weiterhin Anfälle zeigten.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Selektion von *Respondern* und *Non-respondern*

## 1.6 Retrobulbäre Blutentnahme

Die retrobulbäre Blutentnahme erfolgte bei den 13 SE-Tieren mit spontan wiederkehrenden Anfällen insgesamt zweimal. Die erste Blutentnahme wurde am achten Tag der Phenobarbitalphase durchgeführt, die zweite Blutentnahme am fünften Tag nach Ende des EEG- und Video-Monitorings.

Die retrobulbären Blutentnahmen erfolgten unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isofluran CP<sup>®</sup>, cp-pharma, Burgdorf, Germany). Dabei wurde die Inhalationsnarkose mit einer 4%igen Isofluran-Konzentration und einem Sauerstoff-Fluss von 400 ml/min eingeleitet und anschließend mit einem Sauerstoff-Fluss von 200 ml/min aufrechterhalten. Diese Art der Narkose gewährt eine 60-sekündige chirurgische Toleranz (Schmerzausschaltung) nach Abbruch der Inhalationsnarkose. Zusätzlich erfolgte circa zwei Minuten vor der retrobulbären Blutentnahme eine Lokalanästhesie mit Tetracainhydrochlorid-Augentropfen (Ophthocain N, Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin, Germany). Dabei erfolgte die erste Blutentnahme am rechten und die zweite Blutentnahme am linken Auge.

Im Anschluss an die Blutentnahmen wurde die Phenobarbital-Konzentration im Plasma bestimmt. Dies geschah mithilfe eines Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit UV-Detektion. Für diese Art der Analytik wurden pro Blutentnahme mindestens 0,4 ml Blut pro Ratte benötigt. Nach der retrobulbären Entnahme des Blutes wurden alle 13 Blutproben 15 min lang bei 4°C mit 3000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Dadurch konnten pro Blutprobe 50 µl Plasma gewonnen werden. Zu diesen 50 µl Plasma wurden 24 µl Pentobarbitallösung (Interner Standard) in einer Konzentration von 50 µg/ml Wasser hinzugegeben. Anschließend wurden 26 µl Wasser und 300 µl eiskaltes Ethanol hinzugefügt, wobei Ethanol als Proteinfällungsmittel diente. Mithilfe eines Reagenzglasschüttlers wurden die zugegeben Substanzen mit dem Plasma vermischt. Danach wurden die Proben fünf Minuten lang mithilfe eines Ultraschallbads behandelt, welches zur Lösung des Phenobarbitals von den Proteinen beitragen sollte. Nach diesem Lösevorgang wurden die Proben zehn Minuten lang bei -20°C in einem Gefrierschrank aufbewahrt. Dadurch wurde eine vollständige Proteinfällung erreicht. Danach wurden die Proben erneut auf den Reagenzglasschüttler gestellt, um das Phenobarbital vollständig von den Proteinen zu lösen. Durch eine anschließende 15-minütige Zentrifugation der Proben bei 4°C mit 14000 rpm setzten sich die Proteine ab, so dass ein Überstand zurückblieb, der frei von Proteinen war und das Phenobarbital enthielt. Dieser Überstand wurde anschließend im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt. Die dadurch

entstandenen Proben wurden erneut auf den Reagenzglasschüttler verbracht und anschließend in das HPLC-System injiziert.

## 1.7 Durchführung und Auswertung der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

### 1.7.1 PET Scanner und Radiopharmaka

Die PET-Untersuchungen wurden in Kooperation mit einer holländischen Forschergruppe (*Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research*) durchgeführt (*Ethics Committee for Animal Experiments of Leiden University*, Aktenzeichen UDEC09223). Dabei wurde ein PET Scanner der Firma Siemens (HRRT, CTI/Siemens, Knoxville, TN, USA) verwendet. Die Bildsequenz betrug 6x10, 1x20, 3x30, 2x60, 2x150, 3x300 und 1x600 Sekunden.

Vor Beginn der Emissionsmessung wurden Transmissions-Scans durchgeführt, die eine Korrektur der Abschwächung emittierter Strahlen in der Schnittebene ermöglichten. Dadurch konnte eine höhere Sensitivität erreicht werden. Bei den Transmissions-Scans wurde eine 740 MBq 2-dimensionale (2D)  $^{137}\text{Cs}$  (662 keV)-Punktquelle verwendet (VAN VELDEN et al. 2008). Der anschließende Emissions-Scan wurde 30 Sekunden vor der *Tracer*-Injektion gestartet.

Die verwendeten Radiopharmaka (*Tracer*) für diese PET-Untersuchungen waren  $[^{11}\text{C}]\text{Quinidin}$ ,  $[^{11}\text{C}]\text{Laniquidar}$ ,  $[^{11}\text{C}]\text{Phenytoin}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorodeoxyglucose}$  (FDG). Die *Tracer* wurden in der Einrichtung vor Ort (*Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research*) synthetisiert. Die angewandte Dosis betrug bei allen vier *Tracern* 15 MBq pro Tier.

### 1.7.2 Ablauf der PET-Untersuchungen

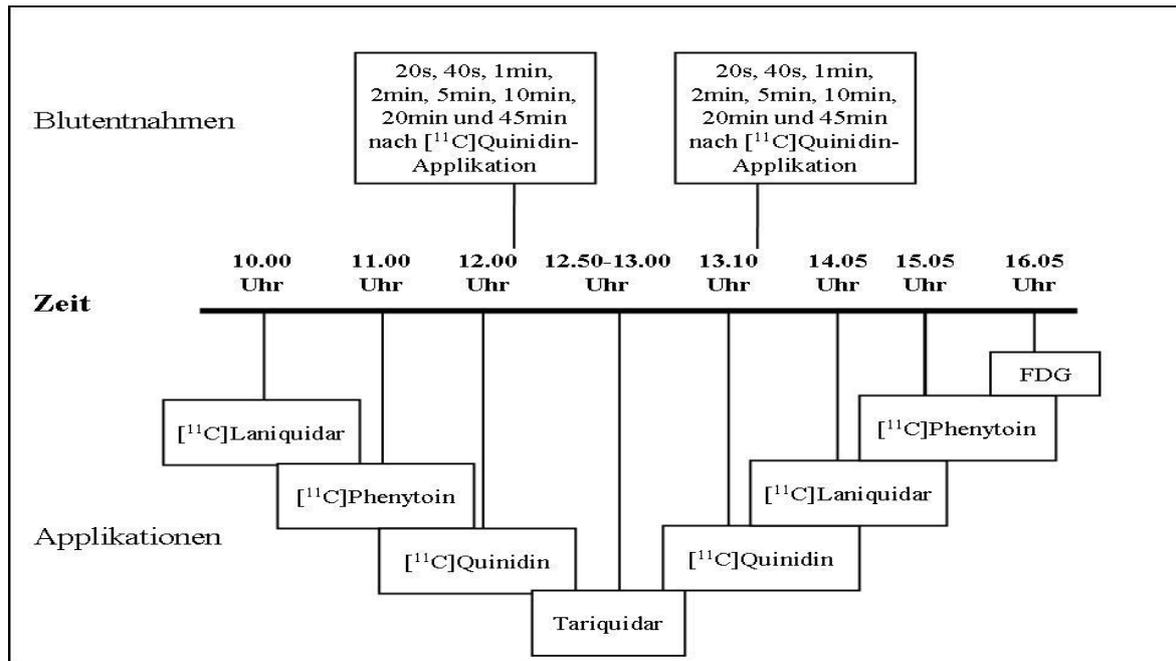
Insgesamt wurde die PET-Studie bei 22 Tieren im Zeitraum vom 29.11.2010 bis 20.12.2010 durchgeführt, wobei immer zwei Ratten parallel untersucht wurden. Die Aufnahmen fanden in Kooperation mit der bereits erwähnten holländischen Forschergruppe (*Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research*) in Amsterdam statt, wobei die PET-Untersuchungen ein bis vier Wochen nach der Ankunft der Tiere erfolgten.

Um die PET-Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Tiere anästhesiert. Dabei erfolgte die Einleitung der Narkose mithilfe einer Plexiglas-Box, in die 4%iges Isofluran

(Pharmachemie BV, Haarlem, Niederlande) in 1 L/min Sauerstoff eingeleitet wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose mittels einer Maske, über die 2%iges Isofluran in 1L/min Sauerstoff zugeführt wurde. Dabei konnte die Isofluran-Konzentration während des gesamten Experiments abhängig von der Narkosetiefe angepasst werden. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere auf ein Heizkissen gelegt, um ihre Körpertemperatur bei 37°C aufrechterhalten zu können. Sowohl in die Vena femoralis als auch in die Arteria femoralis wurden vor Beginn der PET-Untersuchungen Katheter eingeführt. Der Katheter, der in die Arterie eingeführt wurde, bestand aus einem 4,5 cm (innerer Durchmesser = 0,25 mm; äußerer Durchmesser = 0,61 mm) langen Polyethylen-Schlauch, der mit einem 18 cm langen Polyethylen-Schlauch (innerer Durchmesser = 0,58 mm; äußerer Durchmesser = 0,96 mm) verschweißt war. Der venöse Katheter bestand aus einem 23 cm langen Polyethylen-Schlauch (innerer Durchmesser = 0,58 mm; äußerer Durchmesser = 0,96 mm), der 3 mm von der Spitze entfernt einen Silikonring aufwies. 3 mm dieses Katheters wurden in die Vena femoralis eingeführt. Sowohl der arterielle als auch der venöse Katheter wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, welche 25 IU/ml Heparin (*Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Holland*) enthielt. Mithilfe des venösen Katheters erfolgte die Applikation der Radiopharmaka, während der arterielle Katheter zur Entnahme der Blutproben diente. Zusätzlich wurde ein Katheter in die Schwanzvene eingeführt. Dieser diente als alternative Möglichkeit für die Applikation der *Tracer*.

Nachdem die drei Katheter eingeführt worden waren, wurden die Köpfe der Tiere mithilfe einer speziell angefertigten Kopfhaltung im PET Scanner fixiert. Atmung, Körpertemperatur, Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz der Tiere wurden während der gesamten PET-Untersuchung kontinuierlich überwacht. Die Injektion des Radiopharmakons [<sup>11</sup>C]Laniquidar erfolgte um zehn Uhr morgens, die des [<sup>11</sup>C]Phenytoin um elf Uhr morgens und die des [<sup>11</sup>C]Quinidin um 12 Uhr mittags. Im Anschluss an die Applikationen der *Tracer* folgte jeweils ein 45-minütiger PET-Scan. Um 12.50 Uhr wurde der Pgp-Hemmstoff Tariquidar (API Services Inc, Westford, MA, USA) als zehnminütige Infusion von 15 mg/kg in 5%iger Glucose in Kochsalzlösung über den venösen Katheter appliziert. 20 min nach Beginn der Tariquidar-Infusion erfolgte die zweite Injektion des *Tracers* [<sup>11</sup>C]Quinidin, um 14.05 Uhr die zweite Applikation des [<sup>11</sup>C]Laniquidar und um 15.05 Uhr die zweite Injektion des [<sup>11</sup>C]Phenytoin. Im Anschluss an diese Applikationen folgte wiederum jeweils ein 45-minütiger PET-Scan. Um 16.05 Uhr wurde [<sup>18</sup>F]-FDG injiziert und danach 60 min gescannt (Abb. 10).

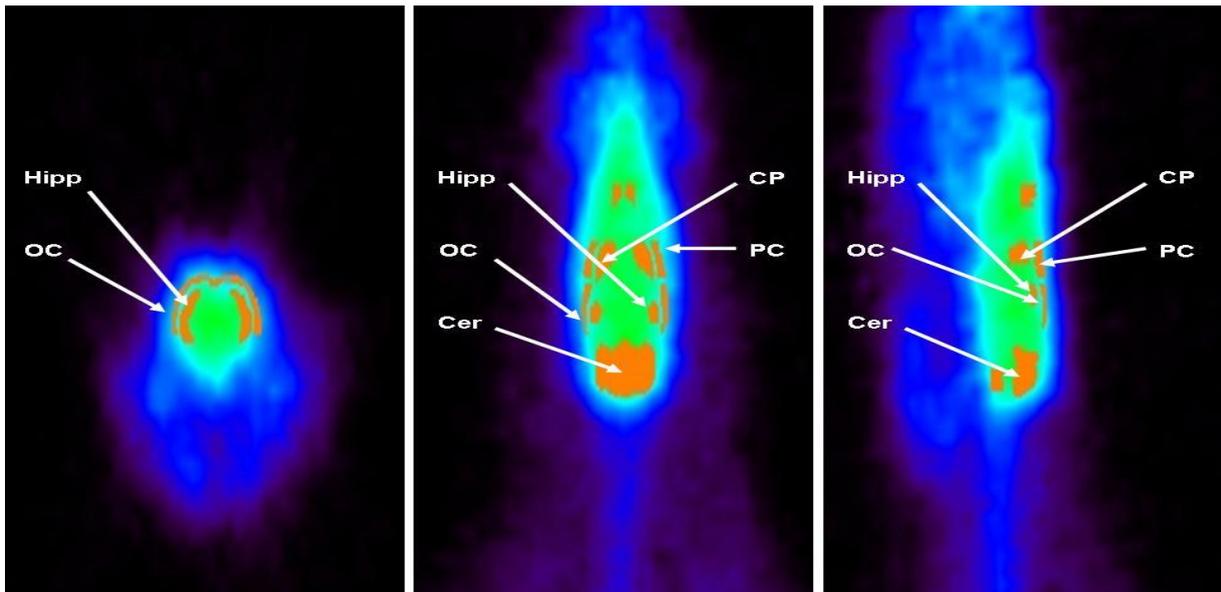
Während den Scans erfolgten pro Tier insgesamt 16 Blutentnahmen, bei denen jeweils 100 µl Blut mithilfe des zuvor eingeführten Katheters aus der Arteria femoralis entnommen wurden. Die ersten acht Blutentnahmen erfolgten 20 s, 40 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min und 45 min nach der ersten [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin-Applikation. Die restlichen acht Blutproben wurden während dem [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin-Scan entnommen, der im Anschluss an die Tariquidar-Applikation stattfand. Dabei erfolgten die Blutentnahmen 20 s, 40 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min und 45 min nach der zweiten [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin-Injektion. In einem Tropfen der Blutprobe wurde mittels eines *Gamma Counters* (1282 Compugamma, LKB Wallac, Turku, Finnland) die Radioaktivität gemessen. Die restliche Menge an Blut wurde mithilfe eines heparinisierten 1,5 ml-Reaktionsgefäßes (Eppendorf-Cup) aufgefangen und anschließend zentrifugiert, um das Plasma zu erhalten. Das Plasma wurde daraufhin ebenfalls in den *Gamma Counter* verbracht. Dadurch konnte die Radioaktivität im Blut und im Plasma parallel zu den PET-Scans ermittelt werden. Da während der Scans aufgrund der langen Narkosezeiten Tiere starben und aufgrund der überaus schwierigen *Tracer*-Synthese teilweise nicht alle Tiere gescannt werden konnten, variierte die Anzahl der Tiere bei den einzelnen Auswertungen. In Bezug auf den [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar-Scan konnten fünf Kontrolltiere, vier *Responder* und vier *Non-responder* ausgewertet werden. Während des [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin-Scans umfassten die Gruppen lediglich drei Kontrolltiere, einen *Responder* und drei *Non-responder*. Beim [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin-Scan konnten acht Kontrolltiere, fünf *Responder* und vier *Non-responder* ausgewertet werden. Der abschließende FDG-Scan umfasste fünf Kontrolltiere, drei *Responder* und vier *Non-responder*. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Blutplasma wurden vier Kontrolltiere, vier *Responder* und vier *Non-responder* ausgewertet.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Applikationen und Blutentnahmen während der PET-Untersuchungen**

### 1.7.3 Rekonstruktion und Analyse der PET-Daten

Im Anschluss an die Korrekturen in Bezug auf radioaktiven Zerfall, Streuung und Randomisierung wurden die einzelnen PET-Scans rekonstruiert, wobei eine iterative „*3D ordered-subsets weighted least-squares (3D-OSWLS)*“-Methode angewendet wurde (VAN VELDEN et al. 2009). Die Auflösung der Punktquelle variierte im Bereich des Sichtfeldes in der transaxialen Richtung von ca. 2,3 bis 3,2 mm (FWHM) und in der axialen Richtung von 2,5 bis 3,4 mm (DE JONG et al. 2007). Für die Analyse der PET-Daten wurde die Software Amide 0.8.22 (LOENING u. GAMBHIR 2003) verwendet. Durch die Anwendung eines Magnetresonanztomographie (MR)-basierten Rattengehirn-Atlas (BUI TER et al., bislang unveröffentlichte Daten) konnten anhand der  $[^{18}\text{F}]$ -FDG-PET-Bilder sechs „*regions of interest*“ (ROIs) bestimmt werden. Dabei wurde der MR-Atlas visuell mit der Gesamtzahl der Bilder innerhalb eines Zeitrahmens von 30 bis 60 min abgeglichen. Anschließend wurden die ROIs auf die Zeitrahmen aller Scans projiziert, wodurch man Zeit-Aktivitäts-Kurven für jeden Scan und jedes Tier erhielt. Dabei stellten Hippocampus, occipitaler Cortex, parietaler Cortex, linkes und rechtes *Putamen Caudate* (Striatum) und Cerebellum die ROIs dar. Abbildung 11 zeigt die repräsentative Darstellung der ROIs am Beispiel einer Ratte.



**Abb. 11:** Repräsentative Darstellung der „regions of interest“ (ROIs) am Beispiel einer Ratte. Hipp = Hippocampus; OC = occipitaler Cortex; Cer = Cerebellum; CP = Putamen Caudate (Striatum); PC = parietaler Cortex.

Die Zeit-Aktivitäts-Kurven wurden anschließend im Hinblick auf die injizierte Aktivität und das Tiergewicht korrigiert, um die „standardized uptake values“ (SUVs) im Verlauf der Zeit zu erhalten.

$$SUV = \frac{\text{Radioaktivität pro Gewebegewicht}}{\text{Injizierte Radioaktivität pro Körpergewicht}}$$

Die Daten der Scans wurden mithilfe der graphischen Analyse nach Logan (LOGAN et al. 1990) ausgewertet. Dabei wurde der Plasma-Eingangswert verwendet, um eine Bewertung des  $K_1$ -Parameters (Transportrate ins Gehirn in ml/g/min) und des „volume of distribution“ ( $V_T$ ; Koeffizient der Verteilung zwischen Blut und Gehirn;  $V_T = K_1 / K_2$ ;  $K_2$  = konstante Ausstromrate pro Minute) zu erhalten. Die Werte der SUVs,  $K_1$  und  $V_T$  wurden vor und nach Tariquidar-Applikation ermittelt und anschließend miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die SUVs des [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-Scans im Verlauf der Zeit zwischen den Tiergruppen miteinander verglichen. Der  $K_1$ -Parameter und  $V_T$  konnten bei insgesamt sechs Kontrolltieren, fünf *Respondern* und vier *Non-respondern* bestimmt werden.

## 1.8 Histologische Gewebeaufbereitung

### *Dekapitation*

Im Anschluss an die PET-Untersuchungen wurden die anästhesierten Ratten mithilfe einer Nager-Guillotine dekapitiert. Nachdem Kopfhaut und Nackenmuskulatur der Tiere entfernt worden waren, wurde der Schädelknochen mittels Knochenzange unter Schonung des unfixierten Gehirngewebes eröffnet. Im Anschluss an die Durchtrennung der Gehirnnerven wurden die Gehirne mithilfe einer Pinzette entnommen und unverzüglich in Zylinder aus Aluminium überführt, die mit Einbettmedium (Tissue Tec Medium, Leica Microsystems GmbH, Nussloch) gefüllt waren. Nachdem die Gehirne vollständig mit dem Einbettmedium bedeckt worden waren, wurden die Aluminiumzylinder zum Tiefgefrieren für einige Minuten in gekühltes 2-Methyl-butan gehalten, welches zuvor mittels flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von ca.  $-80^{\circ}\text{C}$  gebracht worden war. Bis zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die tief gefrorenen Gehirne bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### *Herstellung der Gefrierschnitte*

Die Anfertigung der  $14\ \mu\text{m}$  coronalen Gehirnschnitte erfolgte an einem Kryostaten (HM560M, Microm International GmbH, Walldorf). Die Objekttemperatur beim Schneiden betrug etwa  $-17^{\circ}\text{C}$ , die Messertemperatur ca.  $-16^{\circ}\text{C}$ . Die Gehirnschnitte wurden mithilfe von Objektträgern (Histobond<sup>®</sup>, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) aufgenommen und direkt im Anschluss an das Schneiden tiefgefroren. Alle Schnitte wurden anschließend bis zur immunhistochemischen Färbung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 1.9 Immunhistochemische Färbemethoden

Mit der Methode der Immunhistochemie soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob zwischen *Respondern*, *Non-respondern* und Kontrolltieren eine Veränderung der Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp nachgewiesen werden kann.

### *Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein*

Der Expressionsnachweis von Pgp erfolgte anhand eines immunhistologischen Standardprotokolls, wobei die Schnittebenen  $-2,3$ ,  $-3,8$  und  $-5,8$  mm relativ zu Bregma (PAXINOS 2005) verwendet wurden. Die Pgp-Expression wurde mithilfe eines

monoklonalen Mausantikörpers (1:50, Calbiochem, USA) nachgewiesen. Um die methodisch bedingte Varianz der Farbtintensität möglichst gering zu halten, wurden alle zu vergleichenden Gehirnschnitte gleichzeitig und mit denselben Lösungen gefärbt. Nach einer anfänglichen sechsstündigen Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden diese zehn Minuten lang in Acetonlösung fixiert. Im Anschluss daran erfolgte eine 14-stündige Trocknung bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal sorgfältig in 0,05 M TBS (pH 7,6) gewaschen. Die Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde durch eine nachfolgende 30-minütige Inkubation mit 0,5%igem  $H_2O_2$  erzielt. Nach erneutem sorgfältigem Spülen der Schnitte mit TBS erfolgte schließlich ein Immunfärbekammer („Cover Plates“)-vermitteltes Einspannen der Objektträger in eine Immunhistoapparatur (Shandon Sequenza<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Darin wurden die Schnitte wiederum mit TBS gespült und anschließend für 120 min in einer Blocklösung (2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100 und 5% Kaninchenserum) inkubiert. Dieser Schritt diente der Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Unmittelbar nach diesem „Blocken“ wurden die Schnitte ungefähr für die Dauer von 12 h bei 4°C in das primäre Antiserum (AK C219, 1:50 in *Carrier solution*) verbracht. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte erneut mit TBS gespült und anschließend 90 min lang in Biotin-gekoppeltem sekundärem Antiserum (Kaninchen-anti Maus, 1:200, DAKO, in *Carrier solution*) inkubiert. Durch nachfolgendes mehrmaliges Spülen mit TBS wurde ungebundener sekundärer Antikörper entfernt. Zur Verstärkung der Farbreaktion erfolgte zuletzt eine 60-minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP, 1:375, SouthernBiotech, USA). Ein erneutes Spülen mit TBS beseitigte überschüssige Meerrettich-Peroxidase. Als Vorbereitung für den sich anschließenden Färbeschritt wurden die Schnitte vorsichtig aus den Immunfärbekammern herausgenommen, in eine Gondel verbracht und in einer Glas-Küvette erneut mit TBS gespült. Die Sichtbarmachung der Antikörper erfolgte schließlich mithilfe einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Dafür wurden die Gehirnschnitte in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung verbracht (DAB Kit SK-4100, Vector Laboratories). Nach 10 min wurde diese Reaktion durch mehrmaliges Spülen der Schnitte mit TBS beendet. Im Anschluss an eine Spülung mit deionisiertem Wasser wurden die Schnitte über Nacht an der Luft getrocknet und am nächsten Tag unter Verwendung von Eindeckmedium (Entellan, Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt.

## 1.10 Auswertung und Statistik

### *Auswertungen*

Sowohl die immunhistochemischen Auswertungen als auch die Analyse der PET-Daten wurden vom Experimentator verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die immunhistochemische Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach PAXINOS und WATSON (2005) definiert.

### *Quantifizierung der Pgp-Expression*

Die quantitative Erfassung der Pgp-Expression erfolgte durch die Analyse der immunhistochemisch markierten Fläche und deren optischer Dichte (OD). Dazu wurde ein bereits etabliertes Computer-gestütztes Auswertungssystem (VOLK et al. 2004) verwendet, bei welchem die Pgp-markierte Fläche und deren OD erfasst wurden. Dieses Auswertungssystem setzte sich aus einem Olympus BH2-Mikroskop mit einem 40er Plan Neofluar-Objektiv (Zeiss, Deutschland), einer digitalen Farbkamera (*single chip charge coupled device*, CCD, AxioCam, Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einem AMD Athlon™ Computer mit 64er-Rechenprozessor, welcher mit einer „*image capture interface card*“ (AxioCam MRc Interface Rev. A, Göttingen) bestückt war, zusammen. Die Auswertung der Gehirnschnitte erfolgte mithilfe der Bildanalysesoftware KS400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision). Die eingelesenen Bilder hatten dabei eine Größe von 1388 x 1040 Pixel. Die Kalibrierung der Längenmessung wurde mittels eines geeichten Mikrometers durchgeführt. Vor jeder Messung wurde die Kamera mindestens eine Stunde lang aufgewärmt, da deren Temperatur von entscheidender Bedeutung für das Signal-Rausch-Verhältnis und somit für den gesamten Prozess der Messung ist. Der Aufbau des verwendeten Auswertungssystems ähnelt dem von Rieux et al. im Jahr 2002 beschriebenen System zur Auswertung des Proteins FOS in Gehirnschnitten (RIEUX et al. 2002). Der Unterschied zu diesem System, in dem Grauwerte erfasst und in OD umgerechnet wurden, besteht jedoch darin, dass in der vorliegenden Studie die OD direkt gemessen wurde. Dies wurde durch eine Kalibrierung des Systems mit einem OD-Standard (*Calibrated Step Tablet No.507ST101*, Eastman Kodak Company, USA) ermöglicht. Mittels dieses Standards konnte die Beleuchtungsstärke des Mikroskops überprüft und somit konstant gehalten werden. Die eingelesenen Bilder wurden auf optische Distorsionen korrigiert („*Shading correction*“). Dadurch konnten Ungleichheiten in der Helligkeit der Aufnahmen ausgeglichen werden. Damit diese Korrektur durchgeführt werden konnte, wurde ein Bild aus einem freien Bereich des Objektträgers (Hellfeld-

Hintergrund) eingelesen und anschließend von den für die Messung eingelesenen Bildern abgezogen. Für die deutliche Unterscheidung des positiven Pgp-Signals vom Hintergrundsignal musste vor jeder Messreihe ein Schwellenwert definiert werden. Durch diesen speziell auf die jeweilige Färbung bezogenen Schwellenwert wurden lokale Hintergrundsignalabweichungen, die als positives Pgp-Signal gewertet werden könnten, vermieden. Zu Beginn einer jeden Messung wurde der Schwellenwert im Bereich der zu messenden Region an mindestens drei Schnitten von verschiedenen Tieren und von durchschnittlicher Färbungsintensität separat bestimmt. Im Anschluss daran wurde der errechnete Mittelwert dieser einzelnen Messungen als Schwellenwert definiert und während der gesamten Messreihe einer Region konstant beibehalten. Lediglich jene Pixel, die eine OD über dem jeweils definierten Schwellenwert aufwiesen, wurden in die Auswertung miteinbezogen. Zur Hintergrundkorrektur der OD-Messung wurde jener Bereich als Hintergrund definiert, der unterhalb des Schwellenwerts lag. Die mittlere OD des Hintergrunds wurde schließlich von der mittleren OD des Pgp-positiven Signals abgezogen, um eine Hintergrund korrigierte OD des Pgp-positiven Signals zu erhalten. Die Pgp-Expression wurde bei jeder zu messenden Gehirnregion bilateral und jeweils für die Schnittebenen -2,3, -3,8 und -5,8 mm relativ zu Bregma (PAXINOS 2005) erfasst. Die gemessenen Gehirnregionen waren die CA<sub>1</sub>- und CA<sub>3</sub>-Regionen des Hippocampus, der piriforme Cortex, der parietale Cortex, die Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (GD) und der Hilus des GD. Je nach Größe der Region wurden drei bis zehn Messfelder ausgewertet. Im Anschluss daran wurde die gemessene Fläche des positiven Pgp-Signals relativ zur Gesamtgröße des Messfelds angegeben (*area*). Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der drei zuvor erfassten bilateralen Schnittebenen herangezogen. Die immunhistochemische Quantifizierung der Pgp-Expression umfasste insgesamt sieben Kontrolltiere, fünf *Responder* und vier *Non-responder*.

### *Statistik*

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angabe der Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*, Mittelwertsfehler, Standardfehler). Zunächst wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft, ob sich die vorliegenden Daten entsprechend einer Normalverteilung nach Gauß verhielten. Falls eine Gauß'sche Normalverteilung vorlag, wurde der ungepaarte Student's t-test für den statistischen Vergleich zweier Stichproben angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten wurde ein Mann-Whitney U-Test verwendet. Das Signifikanzniveau

wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Um den Einfluss von Tariquidar zu evaluieren, wurde einseitig getestet, da der Hemmstoff die Daten lediglich in eine Richtung beeinflussen kann. Alle weiteren statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Die Korrelation zwischen den SUV-Werten und der Anfallsreduktion durch Phenobarbital sowie die Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz während der Vehikelphase und der Pgp-markierten Fläche wurden mithilfe eines Pearson Korrelationstests überprüft.

### 1.11 Versuchsdesign

Weiblichen Sprague Dawley Ratten wurde eine Stimulations- und Ableitungselektrode in die rechte basolaterale Amygdala implantiert (Kap. IV.1.2). Im Anschluss an die Elektrodenimplantation wurden die Ratten in zwei Tiergruppen eingeteilt. Bei den Ratten der Gruppe 1 (n=39) erfolgte eine elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala, während die Tiere der Gruppe 2 (n=31) lediglich einer Schein-Stimulation unterzogen wurden. Dadurch dienten die Tiere der Gruppe 2 als Kontrollgruppe.

Drei Monate nach der Stimulation begann die Überwachung spontaner Anfälle mittels Video- und EEG-Monitoring, die insgesamt 20 Tage dauerte (Abb. 9). Die Zeit des Monitorings wurde in eine Vehikelphase und eine Phenobarbitalphase unterteilt, die beide jeweils zehn Tage dauerten. Während der Vehikelphase wurde den Ratten zweimal täglich isotonische Natriumchlorid-Lösung i.p. appliziert. In der darauffolgenden Phenobarbitalphase wurde den Tieren zweimal täglich Phenobarbital i.p. injiziert. Am 18. Tag des Monitorings und fünf Tage nach Ende der Überwachung erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme bei allen Tieren. Im Anschluss an die zweite retrobulbäre Blutentnahme wurden die Tiere nach Holland transferiert. Dort wurde die Positronen-Emissions-Tomographie in Kooperation mit einer holländischen Forschergruppe (*Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research*) durchgeführt (Abb. 10). Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden die Tiere dekapitiert und ihre Gehirne für immunhistochemische Untersuchungen entnommen.

## 2. Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuche zur Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-40-07) an weiblichen Sprague Dawley Ratten des Versuchstierzüchters Harlan Winkelmann, Borcheln, durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in „Makrolonkäfigen Typ III hoch“ gehalten. Im Weiteren erfolgte die Haltung der Ratten analog zu der bereits beschriebenen Rattenhaltung (Kap. IV.1.1). Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wogen die Tiere 200-224 g. Zur Vermeidung circadianer Einflüsse wurden die Versuche stets zwischen 7:00 und 9:00 MEZ begonnen.

### 2.2 Elektrisches SE-Modell

#### *Elektrodenimplantation*

Die Implantation der Elektrode erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Elektrodenimplantation (Kap. IV.1.2). Als Lokalanästhetikum wurde ebenfalls Bupivacain (Bupivacain 0,5%, JENAPHARM) verwendet, das in einer Menge von ca. 0,8 ml subkutan an der Schädeloberfläche appliziert wurde.

#### *SE-BLA-Modell*

Die Stimulation der basolateralen Amygdala erfolgte analog zu dem bereits beschriebenen SE-BLA-Modell (Kap. IV.1.2).

### 2.3 Anfallsparameter

Die Bewertung der Anfallsstadien erfolgte basierend auf der bereits beschriebenen von BARAN et al. (1995) modifizierten Skala (Tabelle 1) von RACINE (1975). Die Beurteilung der Krampfschwere und der Krampfdauer der epileptischen Anfälle erfolgte während der akuten Induktion eines SE.

## 2.4 Überwachung spontaner Anfälle

Die Überwachung spontaner Anfallsaktivität begann acht Wochen nach Ende der BLA-Stimulation und erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Überwachung spontaner Anfälle mithilfe einer EEG-Ableitung und zusätzlichem Videomonitoring (Kap. IV.1.4). Tiere, die ihre Elektrode verloren hatten, konnten dabei ausschließlich per Video überwacht werden. Insgesamt dauerte die Überwachung der spontan auftretenden Anfälle bei allen Tieren zwei Wochen. Aufgrund des limitierten Platzangebotes konnten lediglich 16 der stimulierten Tiere kontinuierlich überwacht werden. Zusätzlich verbrachten jedoch 20 Sham-Tiere und vier weitere stimulierte Tiere ebenfalls zwei Wochen in den Aquarien, damit für die anschließenden Verhaltensuntersuchungen eine gleiche Behandlung aller Tiere gewährleistet werden konnte.

## 2.5 Verhaltensuntersuchungen

### 2.5.1 Open Field

Das *Open Field* (Offenfeld) gehört zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Methoden der tierexperimentellen Verhaltensforschung und dient der Beurteilung von Lokomotion, Ängstlichkeit und Exploration. Das Prinzip beruht bei diesem Test auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Nager das Betreten von ihnen unbekanntem und hell erleuchteten Freiflächen, die ihnen keine Rückzugsmöglichkeit bieten, eher vermeiden (PRUT u. BELZUNG 2003). Bei erstmaligem Einsetzen in das Offenfeld ist das Verhalten von Nagetieren daher einerseits vom Erkundungsdrang (Explorationsverhalten) und andererseits von der Angst vor der unbekanntem Umgebung geprägt. Die Bewertung der Lokomotion kann durch Messung der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke erfolgen. Um die vertikale Motorik, das heißt das Aufrichteverhalten der Tiere, zu beurteilen, werden die *Rearings* (=Aufrichten der Tiere auf die Hinterbeine) gezählt. Das *Grooming* (=Putzverhalten) der Tiere während des Versuchs wird ebenfalls notiert.

In diesem Versuchsaufbau bestand das *Open Field* aus einer schwarzen runden Kunststoffgrundfläche, deren Durchmesser 85 cm betrug und die von einer 39 cm hohen Wand umgeben war. Die Grundfläche des nach oben offenen Kunststoffbehälters wurde mithilfe der Software EthoVision (Noldus, Niederlande) virtuell in vier Quadranten unterteilt. Das *Open Field* wurde mit einer 40 Watt starken Glühbirne ausgeleuchtet. Während des

gesamten Experiments lief ein Generator, der weißes Rauschen (60 dB) produzierte und dadurch auditive Störreize maskierte. Über dem *Open Field* wurde eine Kamera angebracht (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China), die die Verhaltensweisen und Ortsänderungen in zeitlicher Reihenfolge registrierte. Ein Versuchsdurchlauf dauerte zehn Minuten. Die Tiere wurden dabei einzeln in die Mitte des Feldes gesetzt und verblieben für zehn Minuten im *Open Field*. Beim Verbringen der Tiere in die Apparatur wurde darauf geachtet, dass die Blickrichtung für jedes Tier gleich war.

Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurde die Apparatur mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt, um die Duftmarken des Vorgängertieres zu entfernen.

Im Anschluss an den Versuch wurden für jedes Tier die zurückgelegte Gesamtstrecke (cm), die Durchschnittsgeschwindigkeit der Bewegung (cm/s), die Aufenthaltsdauer in den Zonen und die Anzahl des Aufrichtens berechnet.

### 2.5.2 Elevated Plus Maze

Das *Elevated Plus Maze* ist eine der am weitesten verbreiteten Methoden zur Messung von angstassoziiertem Verhalten. Das Prinzip beruht dabei auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Nagetiere offene Flächen ohne Rückzugsmöglichkeiten meiden (MONTGOMERY 1955), um potentiellen Fressfeinden zu entgehen. Um die sogenannte vertikale Motorik, das heißt das Aufrichteverhalten der Tiere, zu beurteilen, wurden die *Rearings* (=Aufrichten der Tiere auf die Hinterbeine) gezählt. Das *Grooming* (=Putzverhalten) und die *Head Dips* (=Herabschauen der Tiere von den offenen Armen) der Tiere während des Versuchs wurden ebenfalls notiert.

Die Apparatur, welche aus PVC hergestellt wurde, beinhaltete zwei offene und zwei an den Seiten durch Begrenzungswände geschlossene Arme, die in Form eines „+“ angeordnet waren. In diesem Versuchsaufbau betrug die Fläche jedes Armes 50 cm x 14 cm und die Seitenwände der beiden geschlossenen Arme waren 32 cm hoch. Das *Elevated Plus Maze* stand auf Füßen etwa 50 cm über dem Boden und wurde mit einer 40 Watt starken Glühbirne ausgeleuchtet. Während des gesamten Experiments lief ein Generator, der weißes Rauschen (60 dB) produzierte und dadurch auditive Störreize maskierte. Mithilfe der Software EthoVision (Noldus, Niederlande) wurden die Arme des *Elevated Plus Maze* in äußere und innere Zonen unterteilt. Über dem *Elevated Plus Maze* wurde eine Kamera angebracht (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China), die die Verhaltensweisen und Ortsänderungen in zeitlicher Reihenfolge registrierte. Ein Versuchsdurchlauf dauerte fünf Minuten. Die Tiere wurden dabei einzeln mit Blick auf einen der offenen Arme in den Kreuzungsbereich der vier

Arme gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Tiere zu Beginn des Versuchs in denselben offenen Arm blickten.

Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurde die Apparatur mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt, um die Duftmarken des Vorgängertieres zu entfernen.

Im Anschluss an den Versuch wurden für jedes Tier die zurückgelegte Gesamtstrecke (cm), die Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s), die Dauer der Aufenthalte in den offenen und geschlossenen Armen (s), die Häufigkeit der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme, die Anzahl des Aufrichtens und die Anzahl der *Head Dips* berechnet.

### 2.5.3 Black White Box

Die *Black White Box* wird als Test auf angstassoziiertes Verhalten eingesetzt. Da sich die Ratte als nachtaktives Tier bevorzugt im Dunkeln aufhält, wird genau diese Tendenz anhand der *Black White Box* gemessen. Die Apparatur bestand aus zwei oben offenen Boxen, von denen eine weiß und die andere schwarz war. Die beiden Hälften waren nur durch einen offenen Durchgang miteinander verbunden. Die Grundfläche der weißen Hälfte maß 39 cm x 40 cm, die der schwarzen Hälfte 20 cm x 39 cm. Die Wände, die die beiden Hälften und den Durchgang umgaben, waren 29 cm hoch. Die Grundfläche des Durchgangs maß 10 cm x 10 cm. Die Boxen und der Durchgang wurden aus PVC hergestellt. In diesem Versuchsaufbau wurde die *Black White Box* mit einer 40 Watt starken Glühbirne ausgeleuchtet. Die Beleuchtungsstärke betrug in der schwarzen Hälfte 40 lux und in der weißen Hälfte 50 lux. Während des gesamten Experiments lief ein Generator, der weißes Rauschen (60 dB) produzierte und dadurch auditive Störreize maskierte. Über der *Black White Box* wurde eine Kamera angebracht (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China), die die Verhaltensweisen und Ortsänderungen in zeitlicher Reihenfolge registrierte. Ein Versuchsdurchlauf dauerte fünf Minuten. Die Tiere wurden dabei einzeln in die weiße Hälfte der *Black White Box* gesetzt. Beim Verbringen der Tiere in die Apparatur wurde darauf geachtet, dass die Blickrichtung für jedes Tier gleich war.

Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurde die Apparatur mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt, um die Duftmarken des Vorgängertieres zu entfernen.

Im Anschluss an den Versuch wurden für jedes Tier die Anzahl der Übertritte zwischen den Hälften der *Black White Box*, die Latenzzeit bis zum ersten Übertritt (s) und die Dauer der Aufenthalte in den beiden Hälften (s) berechnet.

#### 2.5.4 Morris Water Maze

Bei dem *Morris Water Maze* Test handelt es sich um einen Lerntest, mit dem neben Lernen und Gedächtnis auch analytisches Vermögen, Verhaltensstrategien und räumliches Vorstellungsvermögen erfasst und beurteilt werden können. Das *Morris Water Maze* stellt einen räumlichen Navigationstest dar, bei dem das Tier schwimmend eine nicht sichtbare Plattform finden muss, um aus dem Wasser zu gelangen. Die Apparatur bestand aus einem runden, 60 cm tiefen Becken mit einem Durchmesser von 145 cm. Dieses Becken war bis zu einer Höhe von ungefähr 30 cm mit warmem Wasser (Temperatur zwischen 19 und 22°C) gefüllt. Der Beckenrand und die Grundfläche waren aus schwarzem Polyäthylen gefertigt. An der Zimmerwand waren aus der Perspektive der schwimmenden Tiere gut zu erkennende Symbole (Quadrat, Dreieck, Kreis) oberhalb des Beckenrandes angebracht. Diese sollten dem Tier die Orientierung im Raum erleichtern. In diesem Versuchsaufbau wurde das *Morris Water Maze* mit einer 40 Watt starken Glühbirne ausgeleuchtet. Während des gesamten Experiments lief ein Generator, der weißes Rauschen (60 dB) produzierte und dadurch auditive Störreize maskierte. Zentriert über dem Schwimmbecken wurde eine Videokamera angebracht (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China), die mit einem Computer verbunden war. Mit Hilfe der Software EthoVision (Noldus, Niederlande) wurde die Grundfläche des Beckens virtuell in vier gleichgroße Quadranten unterteilt. Die Plattform, die sich knapp unter der Wasseroberfläche befand, maß ungefähr 10 x 10 cm. Da das Becken mit trübem Wasser gefüllt war, war die Plattform für die schwimmenden Tiere nicht sichtbar.

Der Versuchsablauf ließ sich in drei Phasen unterteilen, die als Habituation, *place learning* (Akquisitionsphase, *spatial learning*) und *spatial probe* (Extinktionsdurchgang) bezeichnet wurden. Der Habitationsdurchgang fand ohne Plattform statt. Dabei wurde unter anderem sichergestellt, dass die Tiere über ein angemessenes Schwimmvermögen verfügen. Die Tiere sollten das *Morris Water Maze* in diesem Durchgang erkunden, damit sie mit dem für sie neuartigen Medium vertraut wurden und so der Einfluss von Stressfaktoren auf die Leistung in den Versuchsdurchgängen begrenzt wurde. Schließlich konnte im Habitationsdurchgang auch die initiale Schwimmgeschwindigkeit der Tiere bestimmt werden. Während der Akquisitionsphase sollten die Tiere die Ortsposition der unsichtbaren Plattform erlernen. Dazu wurden fünf Tage lang Sitzungen mit je vier Durchgängen durchgeführt. Dabei wurden die Ratten bei jedem Durchgang in einen anderen Quadranten des *Morris Water Maze* gesetzt. Zuletzt schloss sich die *spatial probe* an, bei der die Erinnerungsleistung für die in der Akquisitionsphase erworbenen räumlichen Inhalte ermessens wurde. Hierzu wurde die Plattform, die sich zuvor im Zentrum des vierten Quadranten befand, entfernt.

Beim Verbringen der Tiere in das Becken wurde stets darauf geachtet, dass die Blickrichtung für jedes Tier gleich war. Ein Versuchsdurchlauf dauerte für jede Ratte höchstens eine Minute. Falls die Tiere die Plattform nach dieser Zeit nicht gefunden hatten, wurden sie aus dem Wasser geholt und für zehn Sekunden auf die Plattform gesetzt.

Das Schwimmbecken wurde nach jedem Versuchsdurchgang von schwimmenden Fäkalien befreit. Das Wasser wurde zudem jeden Tag abgelassen.

Im Anschluss an den Versuch wurden für jedes Tier die zurückgelegte Gesamtstrecke (cm), die Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s), die Anzahl des Auffindens der Plattform, die Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform (s) und die Dauer der Aufenthalte in den einzelnen Quadranten (s) berechnet. Da parallel zu der *spatial probe* ein Tier der Gruppe SE/Cintrofin aufgrund schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden musste, wurde dieses aus allen Auswertungen, die das *Morris Water Maze* betrafen, herausgenommen.

## 2.6 Histologische Gewebeaufbereitung

### *Perfusion*

Bei der Perfusionsfixierung wird das natürliche Gefäßsystem des Körpers für eine schnelle Fixierung des Gewebes verwendet.

Dafür wurden die Ratten zunächst mit 500 mg/kg Pentobarbital (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) i.p. euthanasiert. Anschließend wurde eine Knopfkanüle vom linken Herzventrikel aus in die Aorta geschoben. Das rechte Herzohr wurde aufgeschnitten, um den Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung zu erlauben. Der gleichbleibende Perfusionsdruck wurde mithilfe einer geeigneten Perfusionspumpe aufrecht erhalten. Dieser Druck entsprach circa dem Blutdruck des Tieres. Bevor das Fixans verwendet wurde, wurde der Blutkreislauf der Ratte mit 0,01 M phosphatgepufferter 0,9%iger Kochsalzlösung (pH-Wert 7,6) gespült. Zur Fixierung des Gewebes wurde ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) mit einer Temperatur von 4°C verwendet.

Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und in 4%igen Paraformaldehyd überführt. Dort verblieben sie bei einer Temperatur von 4°C 24 Stunden lang. Dadurch wurde eine zusätzliche Fixation ermöglicht. Anschließend wurden die Gehirne in eine 30%ige Saccharoselösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) verbracht. In dieser Saccharoselösung verblieben die Gehirne für mindestens drei Tage. Dadurch konnte ein

ausreichender Gefrierschutz gewährleistet werden. Die Protokolle zur Herstellung der Pufferlösungen und des Fixans sind in Kapitel X.2 aufgeführt.

#### *Herstellung der Gefrierschnitte*

Die Anfertigung der coronalen Gehirnschnitte erfolgte an einem Kryostaten (HM560M, Microm International GmbH, Walldorf). Hierzu wurde das durch die Perfusion fixierte Gehirn auf einem Schlittengefriermikrotom (Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560M, Microm GmbH, Walldorf) aufgefroren. Mithilfe des Kryostaten wurden 40 µm dicke coronale Serien angefertigt. Die Objekttemperatur beim Schneiden betrug etwa -25°C, die Messertemperatur ca. -22°C. Die Gehirnschnitte wurden zunächst in 0,1 M Phosphatpuffer aufbewahrt und anschließend in Gefriermedium überführt. Im Anschluss an eine 24-stündige Lagerung bei -20°C wurden die Schnittserien bei -80°C aufbewahrt.

## 2.7 Immunhistochemische und histochemische Färbemethoden

Mithilfe der Methoden der immunhistochemischen und histochemischen Färbungen können verschiedene anfallsinduziert hervorgerufene Veränderungen auf neuronaler Ebene dargestellt werden. Hierzu gehören neben der Neubildung von Neuronen auch neurodegenerative Prozesse. Das Ausmaß anfallsinduziert stattfindender Veränderungen wurde im Rahmen dieser Arbeit für unterschiedliche Gehirnregionen erfasst.

#### *Nissl-Färbung*

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbemethoden wurde die erste Serie der Gehirnschnitte mittels der Nissl-Methode gefärbt. Hierzu wurde der Farbstoff Thionin verwendet. Die Nissl-Färbung eignet sich besonders gut zur Darstellung der Zellkörper von Neuronen (Somata). Im Vergleich zu Gliazellen besitzen Neurone eine große Menge an Nisslschollen (Stapel endoplasmatischen Retikulums), die durch die Nissl-Farbstoffe selektiv angefärbt werden. Dadurch wird eine Differenzierung von Neuronen und Gliazellen ermöglicht.

### *Immunhistochemische Nachweismethoden*

Der Nachweis neuronaler Vorläuferzellen, ausdifferenzierter, postmitotischer Neurone und des Proliferationsmarkers Bromdesoxyuridin (BrdU), einem Thymidin-Analogon, erfolgte mithilfe von poly- und monoklonalen Antikörpern. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen B-Lymphozyten und binden an mehreren Epitopen (Bindungsstellen) der Proteine. Dies hat den Nachteil zur Folge, dass ihre Spezifität zum Teil geringer ist als die der monoklonalen Antikörper. Monoklonale Antikörper stammen aus B-Zellklonen. Der Vorteil von polyklonalen Antikörpern ist jedoch, dass bei Maskierung oder Zerstörung eines Epitops der Nachweis des Proteins weiterhin möglich ist.

### *Standardprotokoll DCX und ED1*

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden im „Free-floating“-Verfahren durchgeführt. Die 40 µm dicken Gehirnschnitte wurden dabei nach folgendem Standardprotokoll gefärbt. Zu Beginn wurden die Schnitte sorgfältig dreimal fünf Minuten lang in 0,05 M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung gewaschen (TBS, pH-Wert 7,6). Da es durch die Paraformaldehyd-Fixierung des Gewebes zu einer Beeinträchtigung der Immunreaktivität kommen kann, musste eine Antigen-Demaskierung vorgenommen werden. Dies geschah durch die Verbringung der Schnitte in Natrium-Citratpuffer (pH-Wert 9). Dort verblieben die Gehirnschnitte 30 min lang bei 80°C. Nach anschließendem erneut dreimal fünfminütigen Waschen mit TBS wurde die endogene Peroxidaseaktivität mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zerstört. Im Anschluss daran wurden die Schnitte erneut dreimal fünf Minuten lang in TBS gewaschen. Danach erfolgte eine 70-minütige Inkubation der Gehirnschnitte in einer Blocklösung (2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100 und 5% Serum der Tierart, aus der der sekundäre Antikörper stammt). Dies diente der Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Direkt nach diesem *Blocking*-Schritt wurden die Schnitte für ungefähr 12 h bei 4°C in das primäre Antiserum verbracht. Am nächsten Tag erfolgte zuerst eine erneute sorgfältige Spülung mit TBS. Dabei wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten lang gewaschen. Anschließend wurden die Gehirnschnitte 60 min lang mit dem biotinmarkierten sekundären Antiserum inkubiert. Durch die darauffolgende dreimal fünfminütige Spülung mit TBS wurden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Als letzter Schritt erfolgte eine 60-minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (1:5000, DAKO), die die Inkubation beendete. Durch ein abschließendes dreimal fünfminütiges Spülen mit TBS wurde überschüssige Meerrettich-Peroxidase beseitigt. Die Sichtbarmachung der Antikörper erfolgte mittels einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Hierzu wurden die

Gehirnschnitte in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung verbracht (pro Gehirn 4 ml Tris/Ni-Lösung, 1 mg in 100 µl Aqua dest. gelöstes DAB und 1 µl 32%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nach 90 s wurde diese Reaktion durch dreimal fünfminütiges Spülen mit TBS beendet. Die Schnitte wurden anschließend auf entfettete Objektträger aufgezogen, getrocknet, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 angegeben.

#### *Standardprotokoll BrdU/NeuN*

Das Waschen der Schnitte erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Standardprotokoll. Anschließend fand eine zweistündige Inkubation bei 65°C in Formamid/SSC statt. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie zehn Minuten lang in zweifachem SSC gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C in 2 N HCl. Danach wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten lang in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) verbracht. Nachdem die Schnitte anschließend erneut gewaschen worden waren folgte eine 60-minütige Inkubation in Blocklösung. Direkt nach diesem *Blocking*-Schritt wurden die Schnitte für ungefähr 12 h bei 4°C in anti-BrdU und anti-NeuN verbracht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut gewaschen. Ab diesem Waschvorgang mussten alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt werden. Die Schnitte wurden 60 min lang mit den sekundären Antikörpern inkubiert und anschließend gewaschen. Als nächster Schritt erfolgte eine 60-minütige Behandlung mit Streptavidin Cy2 (1:2000, Jackson ImmunoResearch, USA). Nach einem abschließenden Waschen der Schnitte wurden diese anschließend auf entfettete Objektträger aufgezogen, getrocknet, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 angegeben.

<b>primärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>	<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
polyklonaler Ziege-anti-DCX	Santa Cruz	1:300	polyklonaler biot. Esel-anti-Ziege	Jackson Immuno Research	1:500
monoklonaler Maus-anti-CD68	AbD serotec	1:300	polyklonaler biot. Kaninchen-anti-Maus	Dako	1:500
monoklonaler Ratte-anti-BrdU	AbD serotec	1:30	Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte	AbD serotec	1:1000
monoklonaler Maus-anti-NeuN	Millipore	1:500	Biot. Esel-anti-Maus	Jackson Immuno Research	1:500

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

## 2.8 Auswertung und Statistik

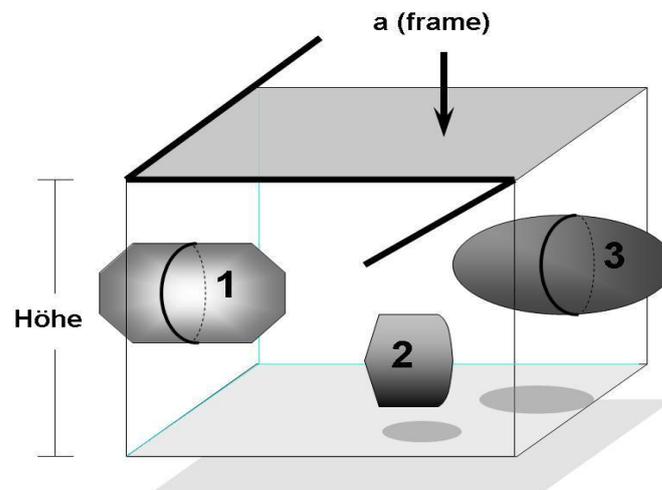
### *Auswertungen*

Alle immunhistochemischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach PAXINOS und WATSON (2005) definiert.

### *Bestimmung der Anzahl thioningefärbter Neurone mittels „optical fractionator“ Methode*

Die Quantifizierung thioningefärbter Neurone erfolgte mithilfe der computergestützten Bildanalyse-Software StereoInvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Das hierfür erforderliche System bestand aus einem Leica DMLB-Mikroskop (Leica, Bensheim) mit einer Plan-Neofluar Linse (Leica, Bensheim), einer digitalen Farbkamera (*single chip charge coupled device*, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64er-Rechenprozessor. Die Zählung der Zellen erfolgte stereologisch mithilfe der sogenannten „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Diese stereologische Zählmethode eignet sich dafür, die absolute Zahl an Neuronen in diversen Gehirnbereichen unbeeinflusst von deren Größe, Form und Orientierung oder einer

eventuellen Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes abzuschätzen. Bei der „*optical fractionator*“ Methode werden aus der Gesamtheit der Zellen Proben genommen, deren Zellzahl exemplarisch gezählt wird. Im Anschluss daran wird die gezählte Zellzahl auf das gesamte Areal extrapoliert. Die Besonderheit dieser Methode besteht darin, dass die zu zählende Probe dreidimensional ist, und daher eine Aussage über die Zellzahl pro Volumeneinheit erlaubt. Diese dreidimensionale Probe, innerhalb derer nach festgelegten Regeln quantifiziert wird, wird als „*optical disector*“ bezeichnet (Abb. 12).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung eines „*optical disector*“. Die dicken, schwarzen Linien, welche die Fläche *a (frame)* begrenzen, werden als Ausschlusslinien („*exclusion lines*“) bezeichnet. Diese schließen ein Zählen von Zellen, die diese berühren, aus. Für die abgebildeten Zellen 1, 2 und 3 bedeutet dies: Zelle 1 wird nicht gezählt, da sie von einer „*exclusion line*“ durchschnitten wird. Zelle 2 liegt vollständig im Kubus und wird deshalb eindeutig gezählt. Zelle 3 liegt zwar nicht vollständig im *frame*, wird aber von keiner „*exclusion line*“ berührt und deshalb ebenfalls gezählt (mod. nach VOLLMANN-HONSDORF 2001).

Die Auszählung der Zellzahl erfolgte in Anlehnung an das optimierte und effiziente „*optical fractionator*“ Zählschema (WEST et al. 1991). Das Ziel war es, bei der Quantifizierung der Zellzahl einen möglichst ausgedehnten Bereich des relevanten Gehirngbietes auszuwerten. Daher wurden pro Tier und Seite jeweils sechs Schnitte von gleichmäßigen Intervallen ausgezählt.

*Bestimmung der Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen mittels „optical fractionator“  
Methode*

Die Quantifizierung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen erfolgte ebenfalls mithilfe der computergestützten Bildanalysesoftware StereoInvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Das hierfür erforderliche System entsprach dem bereits beschriebenen. Die Zählung der Zellen erfolgte stereologisch mithilfe der bereits erwähnten „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Zudem wurden morphologische Veränderungen der Dendriten dieser Zellen erfasst. Aufgrund einer mangelhaften Anfärbbarkeit musste ein Tier der Gruppe SE/Cintrofin aus allen Auswertungen, die die DCX-Färbung betrafen, herausgenommen werden.

*Score-System der Neurodegeneration und Mikroglia im Hippocampus*

Neurodegenerative Veränderungen und Mikroglia-Aktivierung im Bereich des Cornu Ammonis (Ammonshorn, CA) wurden mithilfe eines *Score*-Systems erfasst. Hierbei wurden CA<sub>1</sub>-, CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c/4</sub>-Region differenziert voneinander bewertet.

<b>1</b>	keine offensichtlichen Läsionen
<b>2</b>	eventuelle Läsionen (<20% der Neuronen)
<b>3</b>	Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen
<b>4</b>	Läsionen mit Einbezug von >50% der Neuronen

*Bestimmung der Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen*

Die Quantifizierung der BrdU/NeuN-positiven Zellen erfolgte im Gyrus Dentatus (GD) für sechs verschiedene Schnittebenen relativ zu Bregma: -2,1 mm, -2,7 mm, -3,3 mm, -4,0 mm, -4,3 mm und -4,8 mm. Das Fluoreszenzsignal der doppelmarkierten Schnitte wurde mit einem konfokalen Mikroskop nachgewiesen (Leica TCS SP2, Bensheim). Die Bilder wurden bei 630facher Vergrößerung eingelesen.

*Statistik*

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler). Zunächst wurde bei den Daten, die durch das Monitoring der Tiere gewonnen worden waren, eine *1-way ANOVA* angewandt. Alle weiteren Daten, die während den Verhaltensuntersuchungen zustande gekommen waren, wurden mittels einer *2-way ANOVA* analysiert. Für den Vergleich von zwei Stichproben bei Vorliegen parametrischer

Daten wurde der *Student's t-test* angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten (z.B. alle über ein *Score-System* ermittelten Daten) wurde ein Mann-Whitney U-Test verwendet. Für den Vergleich von vier oder mehr Stichproben wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse gerechnet. Bei nicht parametrischen Daten wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Prinzipiell wurden alle statistischen Berechnungen zweiseitig durchgeführt. Lediglich wenn aufgrund bekannter Literatur oder eigener Daten eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

## 2.9 Versuchsdesign

Weiblichen Sprague Dawley Ratten wurde eine Stimulations- und Ableitungselektrode in die rechte basolaterale Amygdala implantiert (Kap. IV.2.2). Im Anschluss an die Elektrodenimplantation wurden die Ratten in vier Tiergruppen eingeteilt. Bei den Ratten der Gruppen 2 (n=17) und 4 (n=17) erfolgte eine elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala, während die Tiere der Gruppen 1 (n=13) und 3 (n=13) lediglich einer Schein-Stimulation unterzogen wurden. Dadurch dienten die Tiere der Gruppen 1 und 3 als Kontrollgruppe. Ratten der Gruppen 3 und 4 wurden 4 h, 28 h, 52 h, 76 h und 100 h nach der Induktion des Status epilepticus beziehungsweise der Schein-Statusinduktion mit dem mimetischen Peptid Cintrofin (GL Biochem Ltd., Shanghai, China) behandelt. Die Aminosäuresequenz des Cintrofin wurde vom menschlichen CNTF abgeleitet (148-DGGLFEKKLWGLKV-161; UniProtKB entry P26441). Die Injektion des mimetischen Peptids Cintrofin erfolgte intraperitoneal (3 ml/kg). Zeitgleich wurde den Tieren der Gruppen 1 und 2 ein geeignetes Kontrollpeptid (*reversed peptide*; GL Biochem Ltd., Shanghai, China) intraperitoneal appliziert (3 ml/kg). Dieses umfasste dieselben Aminosäuren wie Cintrofin, jedoch in umgekehrter Reihenfolge. Sowohl Cintrofin als auch das *reversed peptide* wurden als Dendrimere synthetisiert, die aus vier Monomeren bestanden und an ein Lysin-Rückgrat gekoppelt waren. Bei allen Ratten erfolgte ab dem fünften Tag nach der Stimulation fünf Tage lang die intraperitoneale Applikation des Proliferationsmarkers Bromdesoxyuridine (BrdU; 3 ml/kg). Die BrdU-Lösung wurde jeden Tag zweimal injiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen den beiden Applikationen stets acht Stunden lagen. Acht Wochen nach der Stimulation begann die Überwachung spontaner Anfälle mittels Video- und EEG-Monitoring, welche insgesamt zwei Wochen dauerte. Eine Woche nach Ende des Monitorings

begannen die Verhaltensuntersuchungen mittels *Open Field*, *Elevated Plus Maze*, *Black White Box* und *Morris Water Maze*. Im Anschluss an diese Versuche wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert. Abbildung 13 gibt den zeitlichen Verlauf des Versuches wieder.

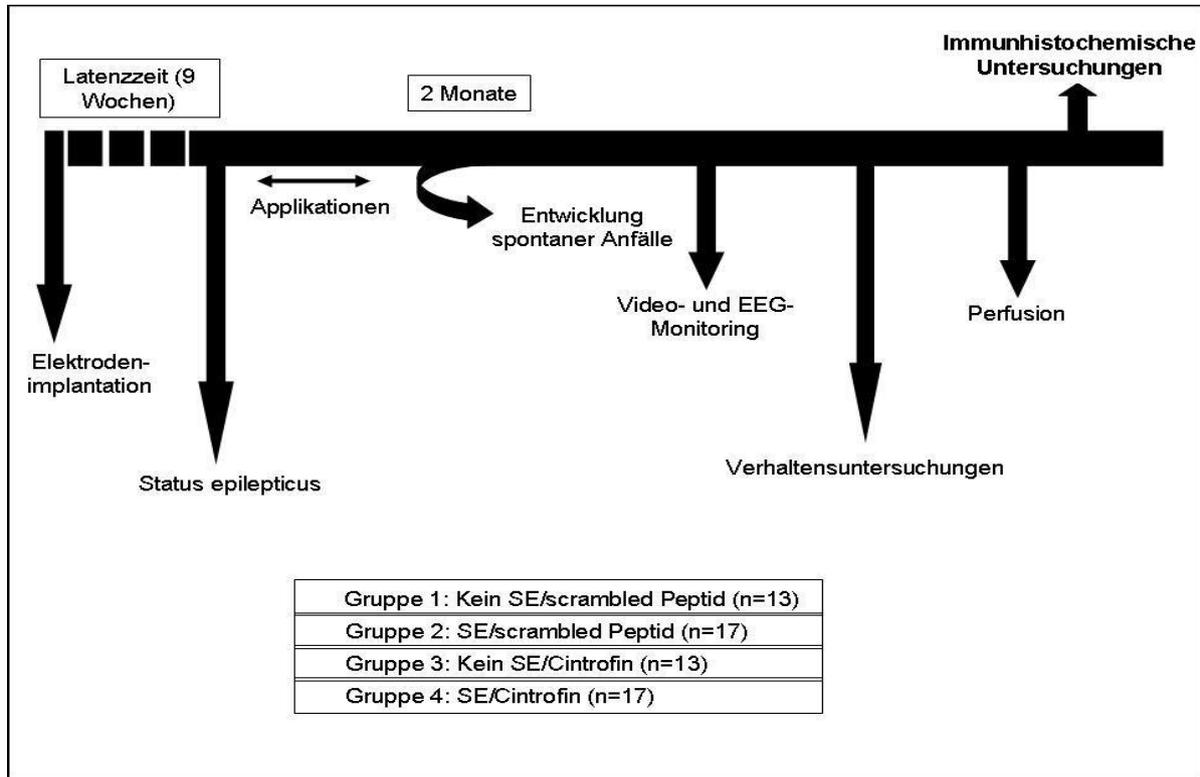


Abb. 13: Elektrisches SE-Modell: Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf

## V. Ergebnisse

### 1. Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions-tomographischen Verfahrens

Das Ziel dieser Studie war es, verschiedene *Tracer* im Hinblick auf ihre Eignung zur Darstellung von P-Glykoprotein (Pgp) zu evaluieren und dabei die Beteiligung dieses *Multidrug*-Transporters an Prozessen der Pharmakoresistenz detaillierter zu erforschen.

#### 1.1 Elektrisches SE-Modell

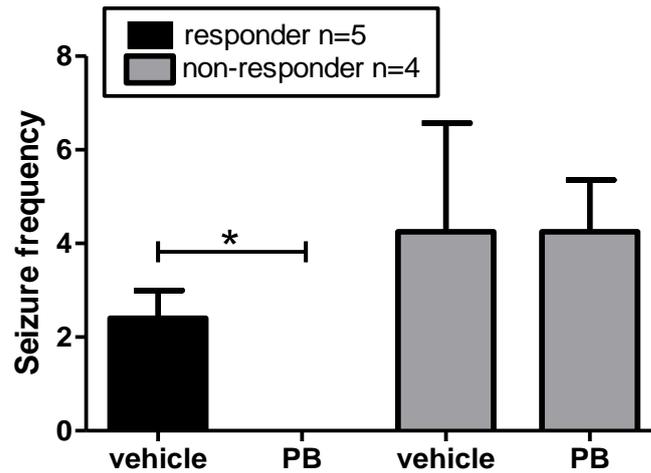
Die Dauerstimulation wurde entsprechend der Beschreibung in Kap. IV.1.2 durchgeführt. Dabei wurde der sich selbsterhaltende Status epilepticus (SSSE) nach vier Stunden durch eine Diazepam-Applikation (10 mg/kg i.p.) abgebrochen. Bei Bedarf wurde Diazepam wiederholt appliziert, bis der SSSE beendet war. Von den insgesamt 39 stimulierten Tieren entwickelten 64% (n=25) einen rein generalisierten SSSE (Typ 3). 26% (n=10) zeigten fokale und generalisierte Anfälle (Typ 2). 10% der Tiere (n=4) mussten nach Statusinduktion aufgrund eines schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden.

#### 1.2 Monitoring von spontanen Anfällen während der Vehikelphase

Nach einer mehrwöchigen Latenzphase entwickelte die Mehrheit der Tiere als Folge des SSSE spontane epileptische Anfälle. Zwölf Wochen nach Statusinduktion wurden die Ratten während der Vehikelphase zehn Tage lang systematisch hinsichtlich des Auftretens von Anfällen überwacht (Kap. IV.1.4). Durch die Unterteilung der Tiere in mehrere Gruppen konnten insgesamt 16 stimulierte Tiere und 12 Kontrolltiere überwacht werden. Während der Vehikelphase wurden die Häufigkeit und die Krampfdauer der aufgezeichneten Anfälle erfasst und anschließend ausgewertet. Die beobachteten, spontan wiederkehrenden Anfälle waren überwiegend generalisiert. Innerhalb der Vehikelphase zeigten acht der 16 stimulierten Tiere spontane Anfälle. Die durchschnittliche Anfallsfrequenz lag für diese acht Tiere bei 0,4 Anfällen pro Tag. Die individuellen Daten wiesen dabei jedoch eine große Variation auf (0,1-1 Anfall pro Tag).

### 1.3 Selektion von Respondern und Non-respondern

Im Anschluss an die Vehikelphase erfolgte eine zehntägige Behandlung mit Phenobarbital, welche bei fünf der stimulierten Tiere zu einer kompletten Anfallskontrolle führte. Diese fünf Tiere wurden als *Responder* definiert. Bei vier Tieren konnte durch die Phenobarbital-Applikationen keine vollständige Anfallskontrolle erreicht werden, weshalb diese als *Non-responder* bezeichnet wurden. Bei zwei dieser vier Tiere kam es zu einer Reduktion der Anfälle um 17% und um 70%. Zwei weitere Tiere, die der Gruppe der *Non-responder* zugeordnet wurden, zeigten unter Phenobarbital-Behandlung eine Steigerung der Anfälle um 700% und um 200%. Vier Ratten zeigten weder in der Vehikel-, noch in der Phenobarbitalphase spontane Anfälle, so dass diese Tiere aus der Selektion ausgeschlossen wurden. Im Vergleich zur Vehikelphase konnte bei den *Respondern* eine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz während der Phenobarbitalphase festgestellt werden. Bei den *Non-respondern* unterschied sich die Anfallsfrequenz in der Phenobarbitalphase nicht von der in der Vehikelphase (Abb. 14). Wie in früheren Studien bereits beschrieben wurde (VOLK u. LÖSCHER 2005; BRANDT et al. 2006a; VOLK et al. 2006), tendierte die Tiergruppe der *Non-responder* dazu, bereits während der Kontrollphase mehr Anfälle zu zeigen als die der *Responder*. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.



**Abb. 14:** Effekte von Phenobarbital (PB) auf die Entwicklung spontaner Anfälle bei *Respondern* und *Non-respondern* (Mittelwert  $\pm$  SEM). Im Anschluss an die zehntägige Vehikelphase erfolgte eine ebenfalls zehntägige Behandlung mit Phenobarbital. Dabei wurden sowohl während der Vehikel- als auch während der Phenobarbitalphase alle spontanen Anfälle kontinuierlich aufgezeichnet. Die Abbildung stellt die durchschnittliche Anzahl der Anfälle (Mittelwert  $\pm$  SEM) bei *Respondern* und *Non-respondern* während der Phenobarbitalphase im Vergleich zur Vehikelphase dar. Im Vergleich zur Vehikelphase konnte bei *Respondern* eine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz während der Phenobarbitalphase festgestellt werden, während die Anfallsfrequenz der *Non-responder* nahezu unverändert blieb (*Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4). *Vehicle* = Vehikelphase; *PB* = Phenobarbitalphase.

Die Analyse des Plasmas ergab bei allen Tieren eine Phenobarbital-Konzentration innerhalb des therapeutischen Bereichs (10-60  $\mu\text{g/ml}$ ). Am achten Tag der Phenobarbitalphase wurde bei den fünf *Responder*-Tieren eine durchschnittliche Phenobarbital-Konzentration von 47,88  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen, wogegen diese bei den vier *Non-respondern* 38,07  $\mu\text{g/ml}$  betrug. Die Nebenwirkungen, die durch die Phenobarbital-Applikation verursacht wurden (Ataxie und Sedation), waren in beiden Tiergruppen vergleichbar. Des Weiteren konnten durch die EEG-Auswertung keine Unterschiede in der Anfallsschwere der *Responder* und *Non-responder* nachgewiesen werden.

#### 1.4 PET-Untersuchungen

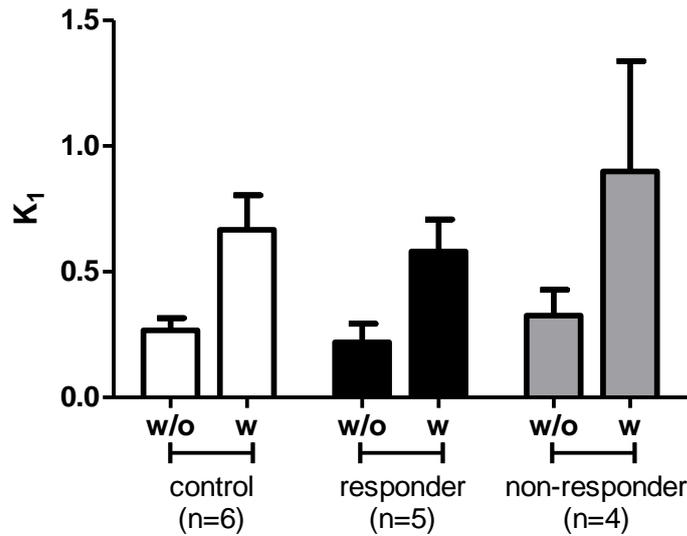
Die PET-Untersuchungen begannen bei den einzelnen Tieren jeweils vier bis sieben Wochen nach Ende des Video- und EEG-Monitorings und wurden in Kooperation mit der holländischen Forschergruppe „*Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research*“ durchgeführt. Um den Stress der Tiere während dieser Versuche zu minimieren, fanden die PET-Untersuchungen erst ein bis vier Wochen nach der Ankunft der Tiere in Amsterdam statt, wobei die *Tracer* [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar, [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin, [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxyglucose (FDG) verwendet wurden.

#### 1.4.1 [<sup>11</sup>C]Quinidin-Kinetik

Für die Darstellung der [<sup>11</sup>C]Quinidin-Kinetik musste den Tieren mehrmals Blut entnommen werden. Aufgrund des limitierten Blutvolumens konnte daher im Rahmen der Studie lediglich die Kinetik dieses *Tracers* genauer untersucht werden.

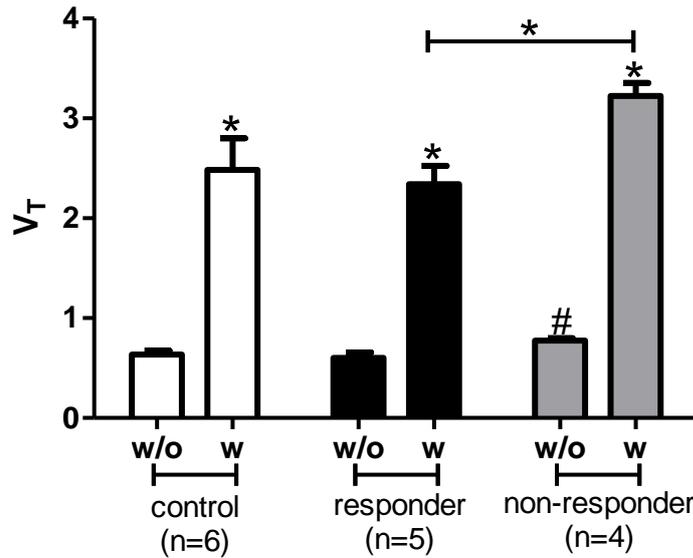
Die Kinetik des *Tracers* [<sup>11</sup>C]Quinidin wurde durch Analyse der Geschwindigkeitskonstanten  $K_1$  (ml/g/min), des „*volume of distribution*“ ( $V_T$ ) und der Plasma-SUVs (SUV = „*standardized uptake value*“) dargestellt. Die SUV im Plasma dient als Angabe der im Plasma vorherrschenden Radioaktivität,  $K_1$  beschreibt den Einstrom des *Tracers* über die Blut-Hirn-Schranke (MURAKAMI et al. 2005) und  $V_T$  stellt einen Koeffizienten der Verteilung des *Tracers* zwischen Blut und Gehirn dar. Um die Kinetik des *Tracers* [<sup>11</sup>C]Quinidin darstellen zu können, wurden sowohl die Plasma-SUV-Werte als auch die  $V_T$ - und  $K_1$ -Werte vor und nach Tariquidar-Applikation jeweils miteinander verglichen.

Im Hinblick auf  $K_1$  unterschieden sich die drei Tiergruppen *Responder*, *Non-responder* und Kontrolltiere vor der Tariquidar-Applikation nicht signifikant. Bei den Kontrolltieren betrug  $K_1$  vor der Tariquidar-Applikation  $0,27 \pm 0,05$  ml/g/min, bei den *Respondern*  $0,22 \pm 0,07$  ml/g/min und bei den *Non-respondern*  $0,33 \pm 0,10$  ml/g/min. Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den *Respondern* und *Non-respondern* kam es durch die Tariquidar-Applikation insgesamt zu einer Erhöhung der  $K_1$ -Werte (Abb. 15). In der Gruppe der Kontrolltiere wurde der  $K_1$ -Wert durch die Tariquidar-Applikation um 100-200% erhöht und in der Tiergruppe der *Responder* um 100-500%. Lediglich in der Tiergruppe der *Non-responder* kam es bei einem Tier zu einer Verminderung des  $K_1$ -Wertes um 40%. Bei den restlichen Tieren dieser Gruppe erhöhte sich  $K_1$  um 150-500%. Der Anstieg des  $K_1$ -Wertes war allerdings in keiner der Tiergruppen signifikant. Die Tiere, die zuvor als *Non-responder* definiert worden waren, schienen sowohl vor als auch nach der Tariquidar-Applikation im Vergleich zu den *Respondern* und den Kontrolltieren insgesamt einen höheren  $K_1$ -Wert aufzuweisen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.



**Abb. 15.:** Effekte der Tariquidar-Applikation auf den  $K_1$ -Parameter des Tracers  $[^{11}C]Quinidin$  (Mittelwert  $\pm$  SEM). Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den *Respondern* und *Non-respondern* kam es durch die Tariquidar-Applikation zu einer Erhöhung der  $K_1$ -Werte. Allerdings führte dieser Anstieg in keiner der Tiergruppen zu einem signifikanten Unterschied (Kontrolltiere: n=6; *Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4). w/o = *without* Tariquidar; w = *with* Tariquidar.

Im Hinblick auf  $V_T$  unterschied sich die Gruppe der *Non-responder* bereits vor der Tariquidar-Applikation signifikant von denen der Kontrolltiere und der *Responder*. Bei den Kontrolltieren betrug  $V_T$  vor der Tariquidar-Applikation  $0,63 \pm 0,04$  ml/g/min, bei den *Respondern*  $0,60 \pm 0,06$  ml/g/min und bei den *Non-respondern*  $0,78 \pm 0,03$  ml/g/min. Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den *Respondern* und *Non-respondern* kam es durch die Tariquidar-Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der  $V_T$ -Werte (Abb. 16). In der Gruppe der Kontrolltiere wurde der  $V_T$ -Wert durch die Tariquidar-Applikation um 200-450% erhöht, in der Tiergruppe der *Responder* um 217-420% und in der Tiergruppe der *Non-responder* um 288-350%. Die Tiere der *Non-responder*-Gruppe wiesen nach der Tariquidar-Applikation im Vergleich zu den *Respondern* einen signifikant erhöhten  $V_T$ -Wert auf.



**Abb. 16:** Effekte der Tariquidar-Applikation auf den  $V_T$ -Parameter des Tracers  $[^{11}C]Quinidin$  (Mittelwert  $\pm$  SEM). Bereits vor der Tariquidar-Applikation wiesen die *Non-responder* im Vergleich zu *Respondern* und Kontrolltieren einen signifikant erhöhten  $V_T$ -Wert auf. Durch die Tariquidar-Applikation kam es sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den *Respondern* und *Non-respondern* zu einem signifikanten Anstieg des  $V_T$ -Wertes. Dabei wies die Tiergruppe der *Non-responder* im Vergleich zu der Tiergruppe der *Responder* auch nach der Tariquidar-Applikation einen signifikant erhöhten  $V_T$ -Wert auf (Kontrolltiere: n=6; *Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4). w/o = *without* Tariquidar; w = *with* Tariquidar; \* = signifikant zu der jeweiligen Gruppe w/o; # = signifikant zu Kontrolltieren w/o und *Respondern* w/o.

Bei der Analyse der Plasma-SUVs stellte sich heraus, dass alle Tiere eine ähnliche Pharmakokinetik des Blutplasmas aufwiesen. Weder vor noch nach der Tariquidar-Applikation unterschieden sich die Tiergruppen der Kontrolltiere, der *Responder* und der *Non-responder* im Hinblick auf die Plasma-SUVs signifikant voneinander (Abb. 17). Sowohl die Plasmaprofile des Tracers  $[^{11}C]Quinidin$  vor Tariquidar-Applikation als auch jene nach Tariquidar-Applikation zeigten, dass die Radioaktivität im Plasma zu Beginn beider Scans bei allen Tieren kontinuierlich abnahm. Gegen Ende der Scans war jedoch bei allen Tieren erneut ein Anstieg der Plasma-SUVs zu verzeichnen. Die Tariquidar-Applikation führte innerhalb der ersten Minuten des darauffolgenden  $[^{11}C]Quinidin$ -Scans zu einer schnelleren Elimination des Tracers aus dem Plasma. Zu späteren Zeitpunkten konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Plasmaprofile vor und nach Tariquidar-Applikation festgestellt werden.

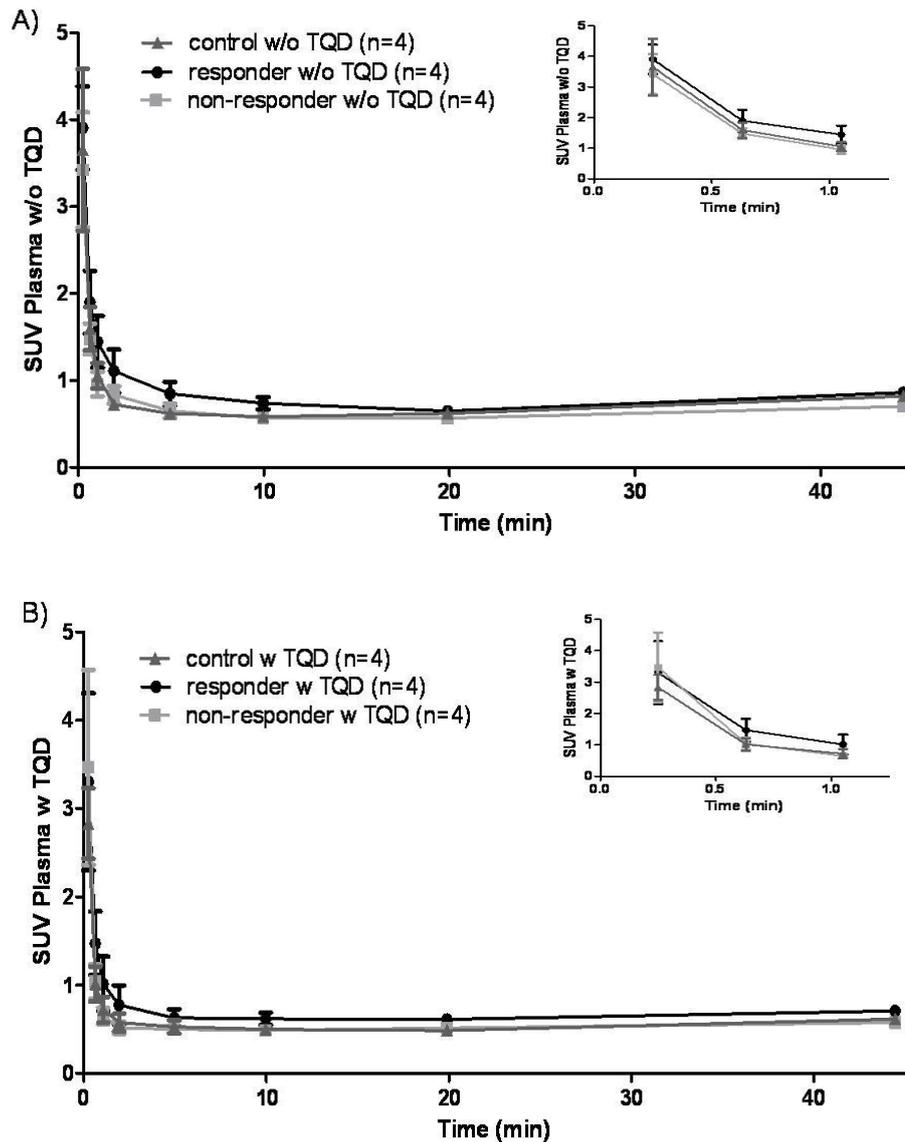


Abb. 17: Plasmaprofil des Tracers  $[^{11}\text{C}]\text{Quinidin}$  vor (A) und nach (B) Tariquidar-Applikation, wobei die ersten drei Zeitpunkte jeweils in dem dazugehörigen kleineren Ausschnitt dargestellt sind (Mittelwert  $\pm$  SEM). Sowohl vor als auch nach Tariquidar-Applikation stieg die Radioaktivität im Plasma gegen Ende der Scans erneut an. Die Tariquidar-Applikation führte im Vergleich zu den Werten vor Tariquidar-Applikation innerhalb der ersten Minuten zu einer schnelleren Elimination des Tracers aus dem Plasma. Zu späteren Zeitpunkten konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Plasmaprofile vor und nach Tariquidar-Applikation festgestellt werden (Kontrolltiere:  $n=4$ ; Responder:  $n=4$ ; Non-responder:  $n=4$ ). w/o TQD = *without* Tariquidar; w TQD = *with* Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“.

#### 1.4.2 Anreicherung des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar

Um die Anreicherung des *Tracers* [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar vor und nach der Tariquidar-Applikation darstellen zu können, wurden die SUV-Werte während beiden [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar-Scans bestimmt (Abb. 18). Die Verteilung des *Tracers* im Gehirn betrug während des Scans vor Tariquidar-Applikation bei allen Tieren durchschnittlich unter 0,5 g/ml. Sowohl zum Zeitpunkt 1,33 min als auch zum Zeitpunkt 2,25 min konnte während dieses Scans ein signifikanter Unterschied der SUVs der *Non-responder* im Vergleich zu den Kontrolltieren und den *Respondern* festgestellt werden (Abb. 19). Zu allen anderen Zeitpunkten unterschieden sich die SUV-Werte der Kontrolltiere, *Responder* und *Non-responder* jedoch nicht signifikant. Durch die Tariquidar-Applikation stieg die Verteilung des *Tracers* im Gehirn durchschnittlich auf das ca. 4- bis 6,7-fache an. Dabei wiesen zum Zeitpunkt 0,08 min lediglich die Gruppen der *Responder* und der Kontrolltiere eine signifikante Erhöhung der SUV im Vergleich zum durchschnittlichen Ausgangswert vor der Tariquidar-Applikation auf. Ab Zeitpunkt 0,25 min konnte jedoch bis zum Ende des Scans sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der SUV festgestellt werden. Dabei unterschieden sich die SUV-Werte der *Responder* und *Non-responder* nach der Tariquidar-Applikation zu keinem Zeitpunkt signifikant. Während des [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar-Scans nach Tariquidar-Applikation konnte jedoch zu den Zeitpunkten 1,33 min und 1,75 min eine signifikante Erhöhung der SUV-Werte der *Non-responder* im Vergleich zu den SUV-Werten der Kontrolltiere festgestellt werden.

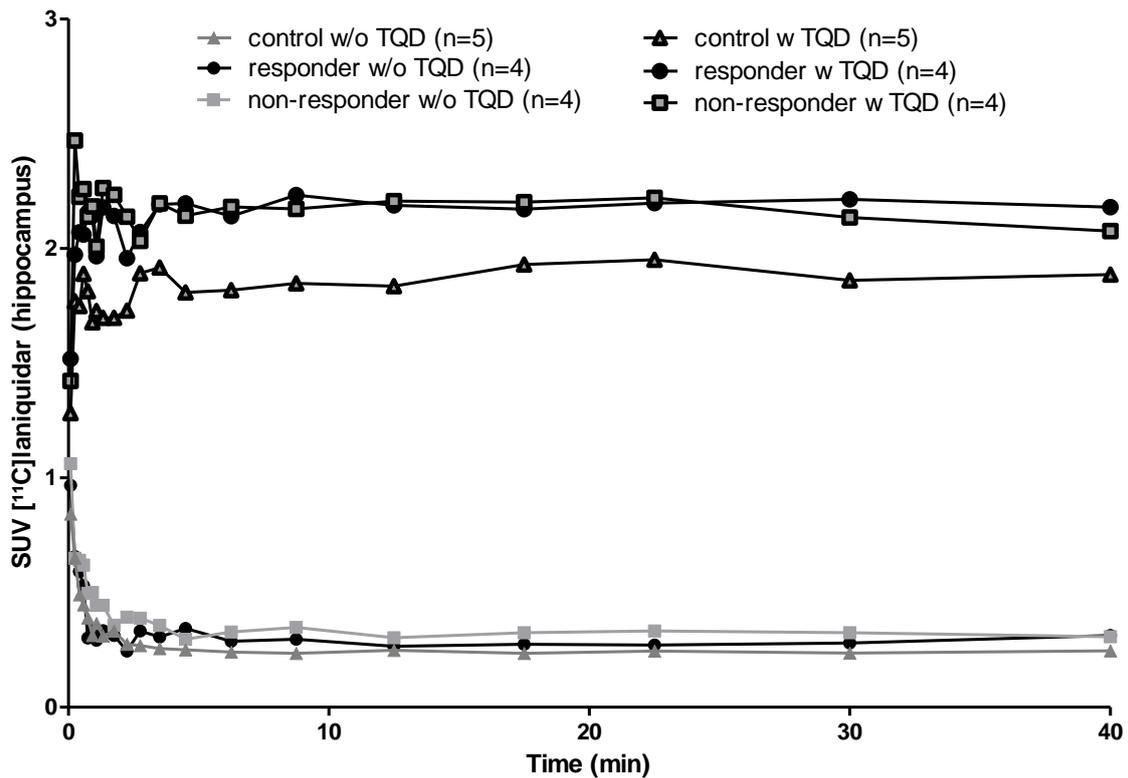


Abb. 18:  $[^{14}\text{C}]$ Laniquidar-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, vor und nach Tariquidar-Applikation (Mittelwert  $\pm$  SEM). Vor Tariquidar-Applikation betrug die  $[^{14}\text{C}]$ Laniquidar-Konzentration im Gehirn durchschnittlich unter 0,5 g/ml. Durch die Tariquidar-Applikation stieg die Verteilung des Tracers im Gehirn auf das circa 4- bis 6,7-fache an. Zum Zeitpunkt 0,08 min wiesen lediglich die Gruppen der Responder und der Kontrolltiere eine signifikante Erhöhung der SUV im Vergleich zum durchschnittlichen Ausgangswert vor der Tariquidar-Applikation auf. Ab Zeitpunkt 0,25 min konnte jedoch bis zum Ende des Scans sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tiergruppen der Responder und Non-responder zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der SUV festgestellt werden. (Kontrolltiere: n=5; Responder: n=4; Non-responder: n=4); w/o TQD = without Tariquidar; w TQD = with Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“.

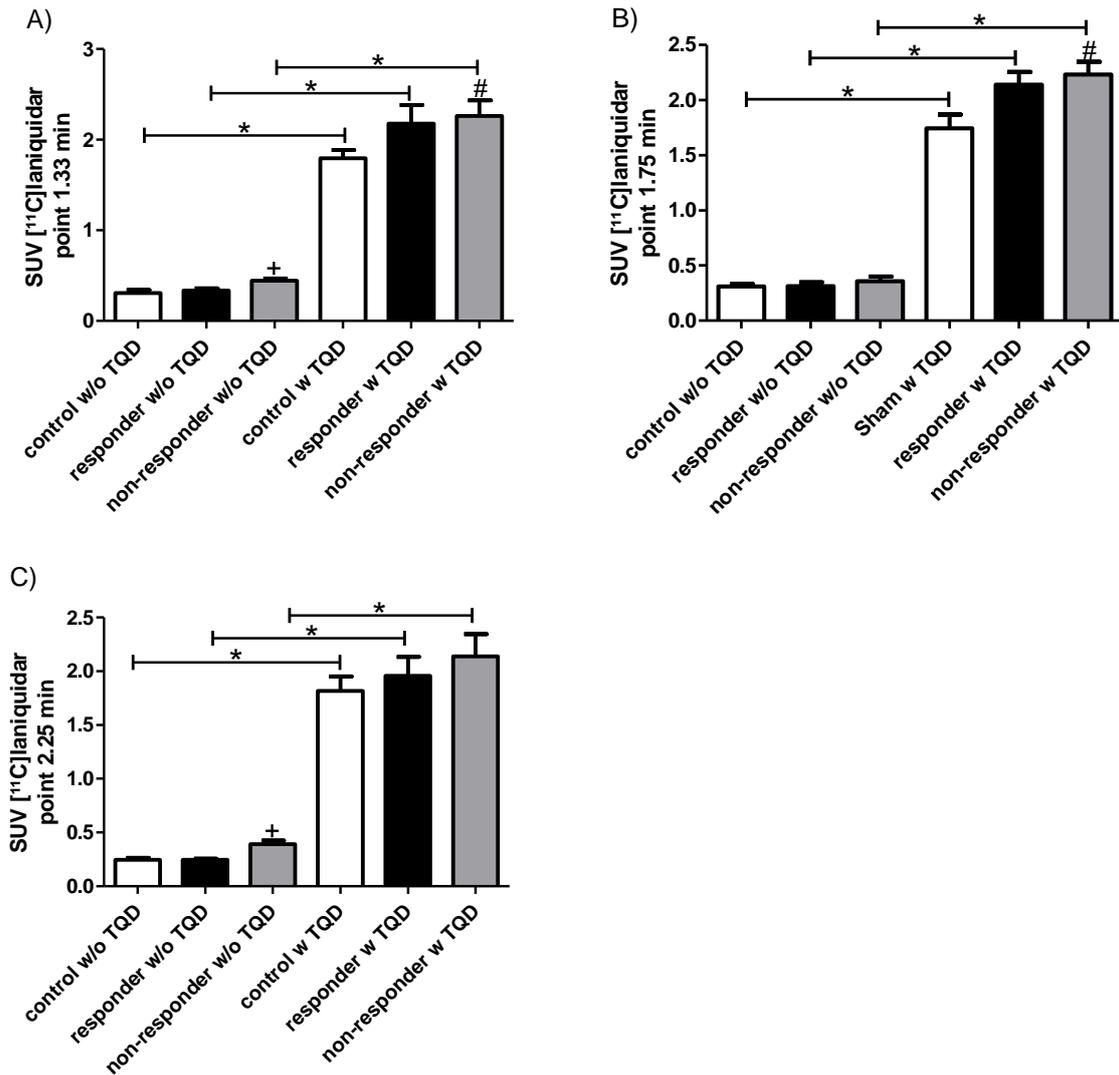
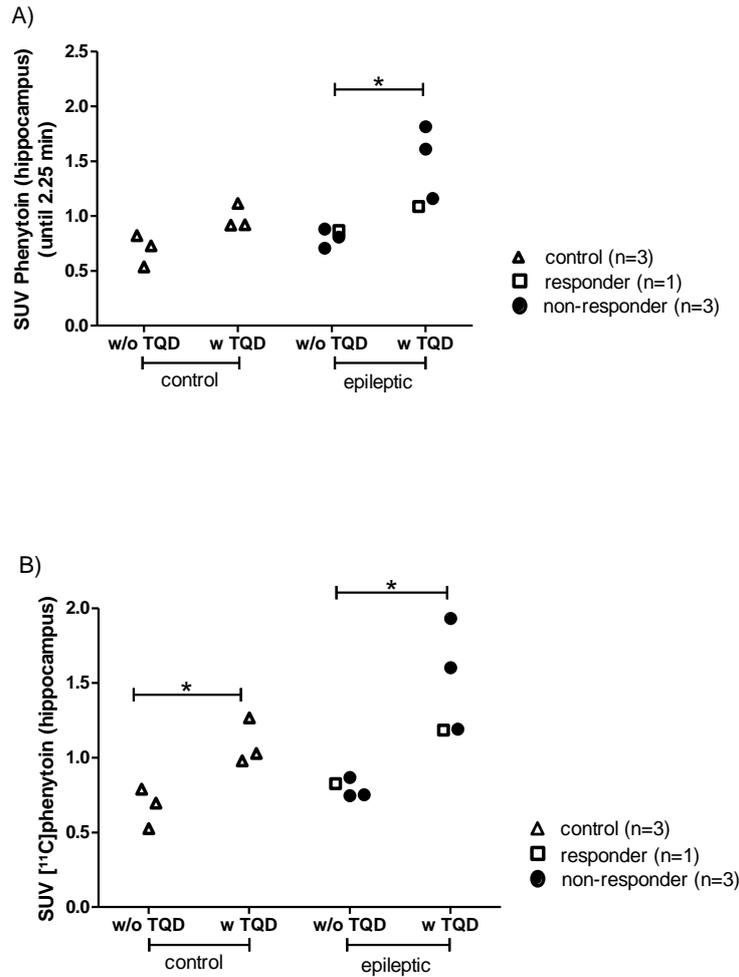


Abb. 19: [<sup>11</sup>C]Laniquidar-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, vor und nach Tariquidar-Applikation zu den Zeitpunkten 1,33 min (A), 1,75 min (B) und 2,25 min (C) (Mittelwert ± SEM). Zu allen drei Zeitpunkten konnte sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* eine signifikante Erhöhung der SUV-Werte nach Tariquidar-Applikation festgestellt werden. Zudem unterschied sich die Tiergruppe der *Non-responder* vor Tariquidar-Applikation zu den Zeitpunkten 1,33 min und 2,25 min signifikant von den Gruppen der Kontrolltiere und der *Responder*. Des Weiteren konnte nach Tariquidar-Applikation zu den Zeitpunkten 1,33 min und 1,75 min eine signifikante Erhöhung der SUV-Werte der *Non-responder* im Vergleich zu den SUV-Werten der Kontrolltiere nach Tariquidar-Applikation festgestellt werden. (Kontrolltiere: n=5; *Responder*: n=4; *Non-responder*: n=4); w/o TQD = *without* Tariquidar; w TQD = *with* Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“; # = signifikant zu Kontrolltieren w TQD; + = signifikant zu Kontrolltieren w/o TQD und *Respondern* w/o TQD.

### 1.4.3 Anreicherung des Tracers [<sup>11</sup>C]Phenytoin

Um die Anreicherung des Tracers [<sup>11</sup>C]Phenytoin vor und nach der Tariquidar-Applikation darstellen zu können, wurden die SUV-Werte während beiden [<sup>11</sup>C]Phenytoin-Scans bestimmt (Abb. 20). Aufgrund der äußerst schwierigen Tracer-Synthese konnten diese Scans jedoch nur bei wenigen Tieren durchgeführt werden. Die Tiere der Gruppen *Non-responder* und *Responder* mussten daher aufgrund der kleinen Tierzahlen zu einer Tiergruppe, die alle epileptischen Tiere beinhaltete, zusammengefasst werden und konnten nicht wie bei den übrigen Scans als *Responder* und *Non-responder* ausgewertet werden. Daher dienen die vorliegenden Ergebnisse lediglich als präliminäre Studie. Die Verteilung des Tracers im Gehirn betrug während des Scans vor der Tariquidar-Applikation bei allen Tieren durchschnittlich unter 0,9 g/ml. Die durchschnittlichen SUV-Werte der Kontrolltiere unterschieden sich während dieses Scans nicht signifikant von denen der epileptischen Tiere (Abb. 20). Durch die Tariquidar-Applikation stieg die Verteilung des Tracers im Gehirn durchschnittlich auf das circa 1,3- bis 2,6-fache an. Innerhalb der ersten 2,25 min beider Scans war dieser Anstieg der SUV-Werte lediglich bei den epileptischen Tieren im Vergleich zu den SUV-Werten vor Tariquidar-Applikation signifikant (Abb. 20). Die Kontrolltiere wiesen innerhalb dieser Zeitspanne keine signifikante Erhöhung der SUV-Werte auf. Im Hinblick auf die durchschnittlichen SUV-Werte während der gesamten Scans konnte jedoch sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den epileptischen Tieren nach der Tariquidar-Applikation eine signifikante Erhöhung der SUVs nachgewiesen werden (Abb. 20).



**Abb. 20:** [<sup>11</sup>C]Phenytoin-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, vor und nach Tariquidar-Applikation. **A)** Durchschnittliche [<sup>11</sup>C]Phenytoin-Konzentrationen innerhalb der ersten 2,25 min beider Scans, **B)** Durchschnittliche [<sup>11</sup>C]Phenytoin-Konzentrationen während der gesamten Dauer beider Scans (Mittelwert ± SEM). Innerhalb der ersten 2,25 min beider Scans war der Anstieg der SUV-Werte lediglich bei den epileptischen Tieren im Vergleich zu den SUV-Werten vor Tariquidar-Applikation signifikant. Die Kontrolltiere wiesen innerhalb dieser Zeitspanne keine signifikante Erhöhung der SUV-Werte auf. Im Hinblick auf die durchschnittlichen SUV-Werte während der gesamten Scans konnte jedoch sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den epileptischen Tieren nach der Tariquidar-Applikation eine signifikante Erhöhung der SUVs nachgewiesen werden. (Kontrolltiere: n=3; Responder: n=1; Non-responder: n=3); w/o TQD = without Tariquidar; w TQD = with Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“.

#### 1.4.4 Anreicherung des Tracers [<sup>11</sup>C]Quinidin

Um die Anreicherung des Tracers [<sup>11</sup>C]Quinidin vor und nach der Tariquidar-Applikation darstellen zu können, wurden die SUV-Werte während beiden [<sup>11</sup>C]Quinidin-Scans bestimmt (Abb. 21). Die Verteilung des Tracers im Gehirn betrug während des Scans vor der Tariquidar-Applikation bei allen Tieren durchschnittlich unter 0,6 g/ml. Zu den Zeitpunkten 0,42 min, 1,33 min und 3,50 min konnte während dieses Scans ein signifikanter Unterschied der SUVs der *Non-responder* im Vergleich zu den Kontrolltieren und den *Respondern* festgestellt werden (Abb. 22). Zu allen anderen Zeitpunkten unterschieden sich die SUV-Werte der Kontrolltiere, *Responder* und *Non-responder* während dieses Scans jedoch nicht signifikant. Durch die Tariquidar-Applikation stieg die Verteilung des Tracers im Gehirn durchschnittlich auf das circa 2- bis 5,7-fache an. Dabei konnte lediglich zum Zeitpunkt 0,08 min keine signifikante Erhöhung der SUVs der unterschiedlichen Gruppen im Vergleich zum durchschnittlichen Ausgangswert der Tiergruppen vor Tariquidar-Applikation festgestellt werden. Ab Zeitpunkt 0,25 min wiesen sowohl die Kontrolltiere als auch die Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* bis zum Ende des Scans eine signifikante Erhöhung der SUV-Werte im Vergleich zu den jeweiligen Werten vor Tariquidar-Applikation auf. Zu den Zeitpunkten 0,42 min, 0,58 min, 0,92 min, 1,75 min, 3,50 min, 12,50 min, 30,00 min und 40,00 min waren die SUV-Werte der *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation im Vergleich zu den SUV-Werten der Kontrolltiere und *Responder* nach Tariquidar-Applikation signifikant erhöht (Abb. 21). Zum Zeitpunkt 1,33 min waren die SUV-Werte der *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation lediglich im Vergleich zu den SUV-Werten der *Responder* nach Tariquidar-Applikation signifikant erhöht (Abb. 22).

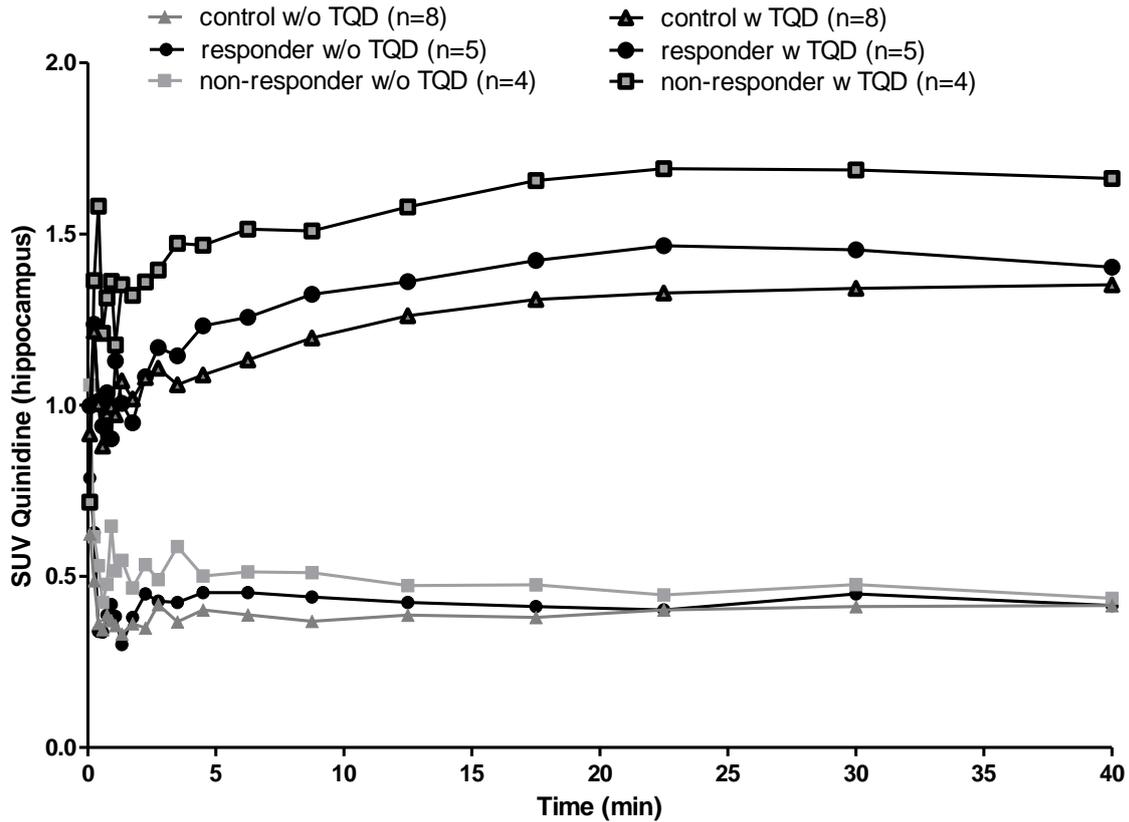


Abb. 21: [<sup>14</sup>C]Quinidin-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, vor und nach Tariquidar-Applikation (Mittelwert ± SEM). Vor Tariquidar-Applikation betrug die [<sup>14</sup>C]Quinidin-Konzentration im Gehirn durchschnittlich unter 0,6 g/ml. Durch die Tariquidar-Applikation stieg die Verteilung des Tracers im Gehirn auf das circa 2- bis 5,7-fache an. Lediglich zum Zeitpunkt 0,08 min konnte keine signifikante Erhöhung der SUV-Werte der unterschiedlichen Gruppen im Vergleich zum durchschnittlichen Ausgangswert der Tiergruppen vor Tariquidar-Applikation festgestellt werden. Ab Zeitpunkt 0,25 min konnte jedoch bis zum Ende des Scans sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tiergruppen der Responder und Non-responder zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der SUV-Werte festgestellt werden. (Kontrolltiere: n=8; Responder: n=5; Non-responder: n=4); w/o TQD = without Tariquidar; w TQD = with Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“.

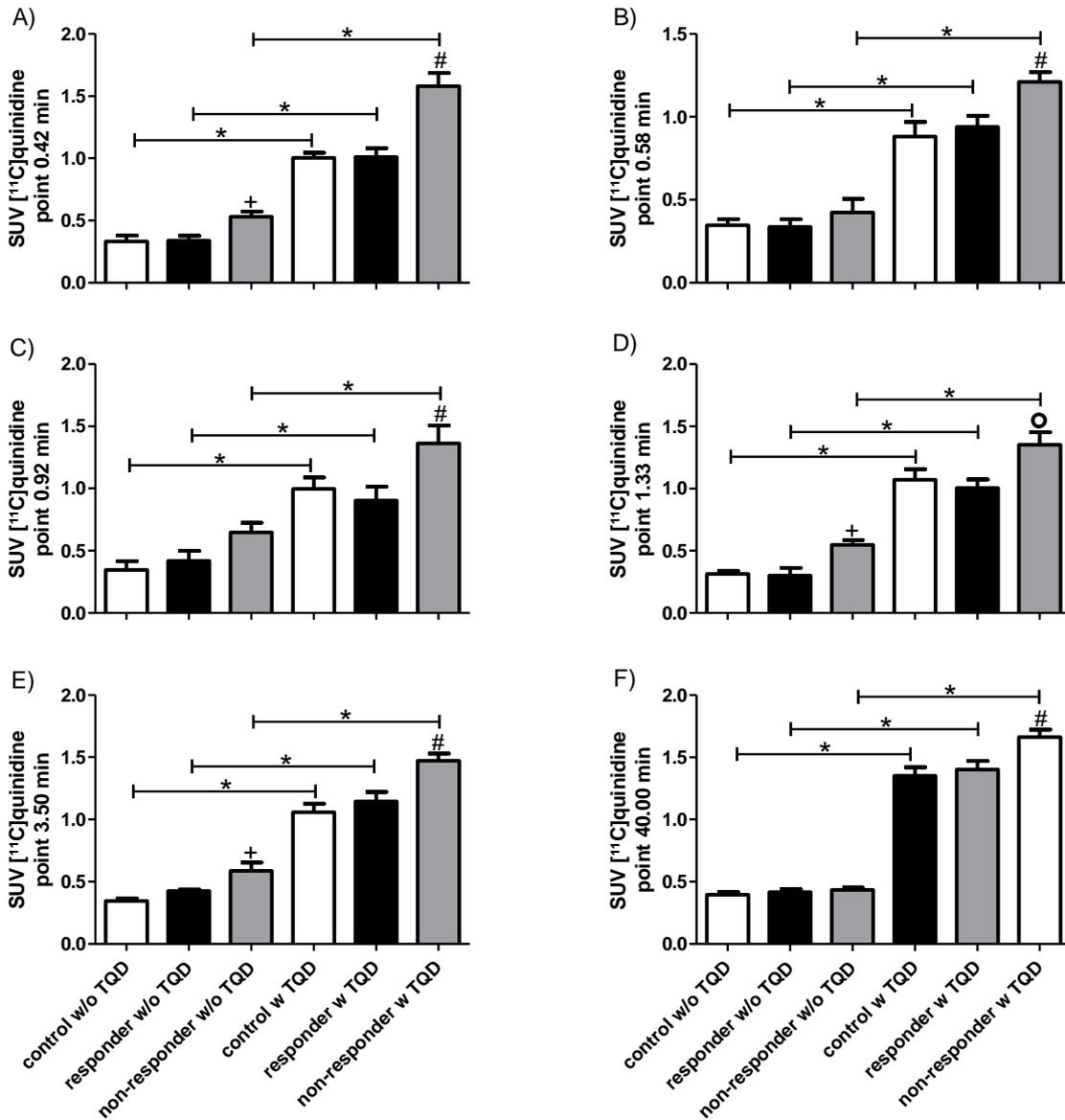


Abb. 22:  $[^{11}\text{C}]\text{Quinidin}$ -Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, vor und nach Tariquidar-Applikation zu den Zeitpunkten 0,42 min (A), 0,58 min (B), 0,92 min (C), 1,33 min (D) 3,50 min (E) und 40,00 min (F) (Mittelwert  $\pm$  SEM). Während des Scans vor Tariquidar-Applikation konnte zu den Zeitpunkten 0,42 min, 1,33 min und 3,50 min ein signifikanter Unterschied der SUVs der *Non-responder* im Vergleich zu den Kontrolltieren und den *Respondern* festgestellt werden. Nach Tariquidar-Applikation wiesen die *Non-responder* zu den Zeitpunkten 0,42 min, 0,58 min, 0,92 min, 1,75 min, 3,50 min, 12,50 min, 30,00 min und 40,00 min im Vergleich zu den Kontrolltieren und *Respondern* signifikant erhöhte SUV-Werte auf. Zum Zeitpunkt 1,33 min waren die SUV-Werte der *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation lediglich im Vergleich zu den SUV-Werten der *Responder* nach Tariquidar-Applikation signifikant erhöht. (Kontrolltiere: n=8; *Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4); w/o TQD = *without* Tariquidar; w TQD = *with* Tariquidar; SUV = „standardized uptake value“; # = signifikant zu Kontrolltieren w TQD und *Respondern* w TQD; + = signifikant zu Kontrolltieren w/o TQD und *Respondern* w/o TQD; o = signifikant zu *Respondern* w TQD.

1.4.5 Anreicherung des Tracers [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglucose (FDG)

Anhand der [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglucose-PET-Bilder konnten die sechs *regions of interest* (ROI) bestimmt werden, durch die man anschließend die Zeit-Aktivitäts-Kurven für jeden Scan und jedes Tier erhielt. Die Anreicherung des Tracers [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglucose (FDG) wurde dabei bei allen drei Tiergruppen lediglich nach Tariquidar-Applikation bestimmt (Abb. 23).

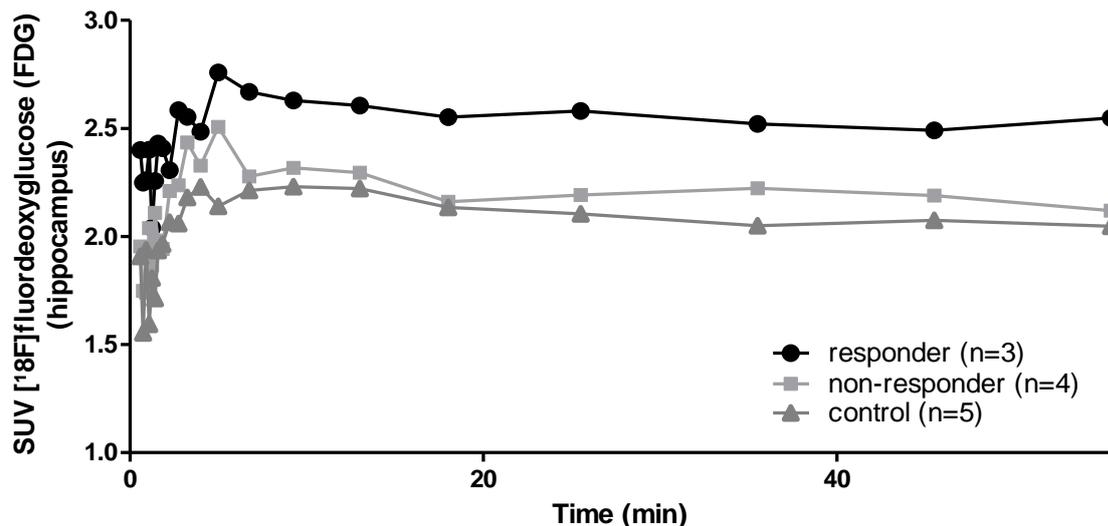
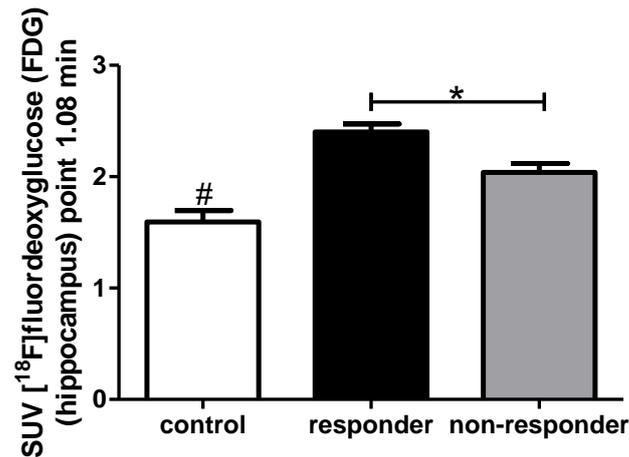


Abb. 23: [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglucose (FDG)-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, nach Tariquidar-Applikation (Mittelwert ± SEM). Die durchschnittliche [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglucose (FDG)-Konzentration im Gehirn betrug dabei unter 3 g/ml. (Kontrolltiere: n=5; Responder: n=3; Non-responder: n=4); SUV = „standardized uptake value“.

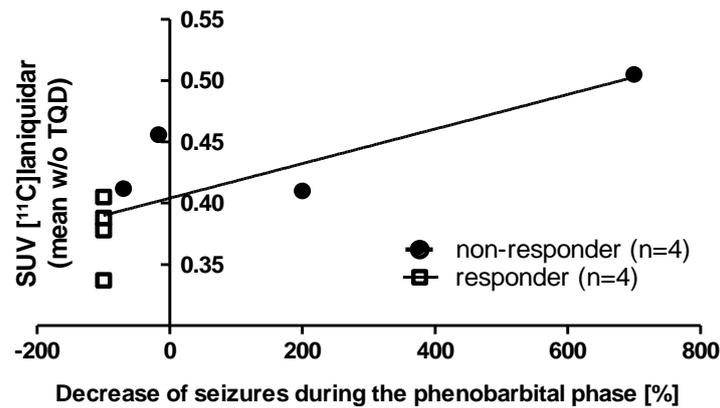
Während dieses Scans konnte lediglich zum Zeitpunkt 1,08 min ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen nachgewiesen werden (Abb. 24). Zu diesem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den SUV-Werten der Gruppe der Kontrolltiere und den entsprechenden Werten der Gruppen der Responder und Non-responder. Zudem waren zu diesem Zeitpunkt die SUV-Werte der Responder im Vergleich zu denen der Non-responder signifikant erhöht.



**Abb. 24:** [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxyglucose (FDG)-Konzentrationen im Gehirn, dargestellt als SUV, nach Tariquidar-Applikation zum Zeitpunkt 1,08 min. Zu diesem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den SUV-Werten der Gruppe der Kontrolltiere und den entsprechenden Werten der Gruppen der *Responder* und *Non-responder*. Zudem waren zu diesem Zeitpunkt die SUV-Werte der *Responder* im Vergleich zu denen der *Non-responder* signifikant erhöht (Kontrolltiere: n=5; *Responder*: n=3; *Non-responder*: n=4). # = signifikant zu *Respondern* und *Non-respondern*.

#### 1.4.6 Korrelation zwischen SUV und Anfallsreduktion

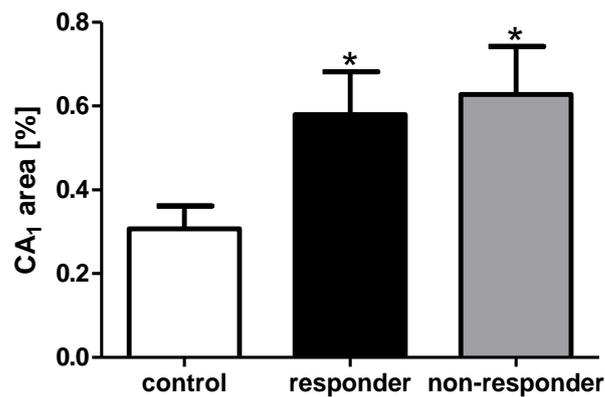
Im Anschluss an die Auswertung der Anreicherung der einzelnen *Tracer* wurde für jeden der *Tracer* eine mögliche Korrelation zwischen den SUV-Werten und der Reduktion der Anfälle während der Phenobarbitalphase überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die SUV-Werte des *Tracers* [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin weder vor noch nach Tariquidar-Applikation mit der Anfallsreduktion der Tiere korrelierten. Ebenso bestand zwischen den SUV-Werten des *Tracers* [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxyglucose (FDG) und der Anfallsreduktion der einzelnen Tiere kein Zusammenhang. Dagegen konnte jedoch bei dem *Tracer* [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar (Abb. 25) diesbezüglich eine Korrelation nachgewiesen werden. Die SUV-Werte des *Tracers* [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar korrelierten vor der Tariquidar-Applikation signifikant mit der Anfallsreduktion der Tiere (%) während der Phenobarbital-Phase.



**Abb. 25:** Korrelation der SUV-Werte des Tracers  $[^{11}\text{C}]\text{Laniquidar}$  mit der Anfallsreduktion der Tiere [%] während der Phenobarbital-Phase. Die SUV-Werte des Tracers  $[^{11}\text{C}]\text{Laniquidar}$  korrelierten vor der Tariquidar-Applikation signifikant mit der Anfallsreduktion der Tiere während der Phenobarbital-Phase ( $r = 0,78$ ,  $p = 0,02$ ).

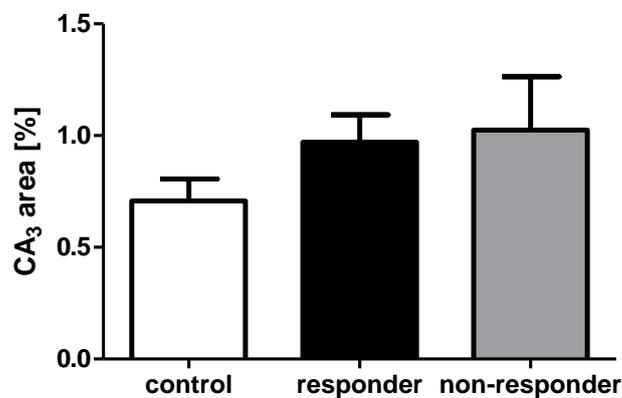
### 1.5 Quantifizierung der Pgp-Expression

Um eine Veränderung der Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp zwischen den Tiergruppen der *Responder*, *Non-responder* und Kontrolltiere nachweisen zu können, wurde die Pgp-Expression der Tiere im Bereich der CA<sub>1</sub>- und CA<sub>3</sub>-Region des Hippocampus, des piriformen Cortex, des parietalen Cortex, der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (GD) und des Hilus des Gyrus Dentatus ausgewertet (Kap. IV.1.10). Dabei konnten im Hinblick auf die CA<sub>1</sub>-Region des Hippocampus signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Sowohl *Responder* als auch *Non-responder* wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung der gemessenen Fläche des positiven Pgp-Signals auf, welche relativ zur Gesamtgröße des Messfelds angegeben wurde (Abb. 26 und Abb. 28). Des Weiteren konnte in dieser Region beobachtet werden, dass die gemessenen Werte in der Gruppe der *Non-responder* tendenziell höher lagen als in der Tiergruppe der *Responder*. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

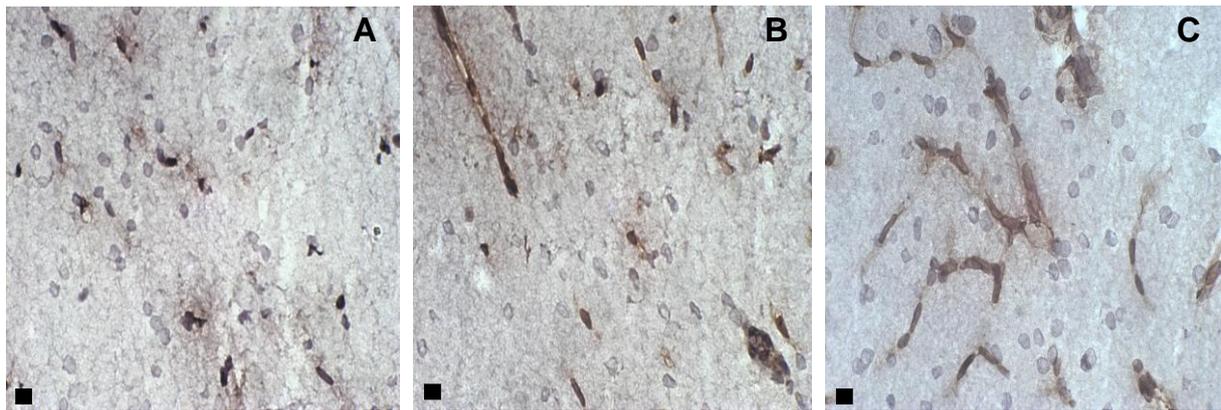


**Abb. 26:** Gemessene Fläche des positiven Pgp-Signals relativ zur Gesamtgröße des Messfelds (*area*) in der CA<sub>1</sub>-Region des Hippocampus (Mittelwert ± SEM). *Responder* und *Non-responder* wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren im Hinblick auf diese Region signifikant erhöhte *area*-Werte auf (Kontrolltiere: n=7; *Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4). \* = signifikant zu Kontrolltieren.

In der CA<sub>3</sub>-Region waren die Werte der Pgp-markierten Fläche bei *Respondern* und *Non-respondern* ebenfalls tendenziell höher als bei den Kontrolltieren. In dieser Region war der Unterschied jedoch nicht signifikant (Abb. 27).



**Abb. 27:** Gemessene Fläche des positiven Pgp-Signals relativ zur Gesamtgröße des Messfelds (*area*) in der CA<sub>3</sub>-Region des Hippocampus (Mittelwert ± SEM). *Responder* und *Non-responder* wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren im Hinblick auf diese Region erhöhte *area*-Werte auf. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Kontrolltiere: n=7; *Responder*: n=5; *Non-responder*: n=4).



**Abb. 28:** Immunhistochemische Färbung des *Multidrug-Transporters* Pgp in der CA<sub>1</sub>-Region des Hippocampus. (A) Kontrolltier, (B) *Responder*, (C) *Non-responder*. Sowohl bei den *Respondern* als auch bei den *Non-respondern* konnte eine immunhistochemisch detektierbare signifikante Erhöhung der Pgp-markierten Fläche festgestellt werden. Zudem wies die Gruppe der *Non-responder* im Hinblick auf diesen Parameter höhere Werte auf als die Tiergruppe der *Responder*. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Maßstabballen = 10 µm

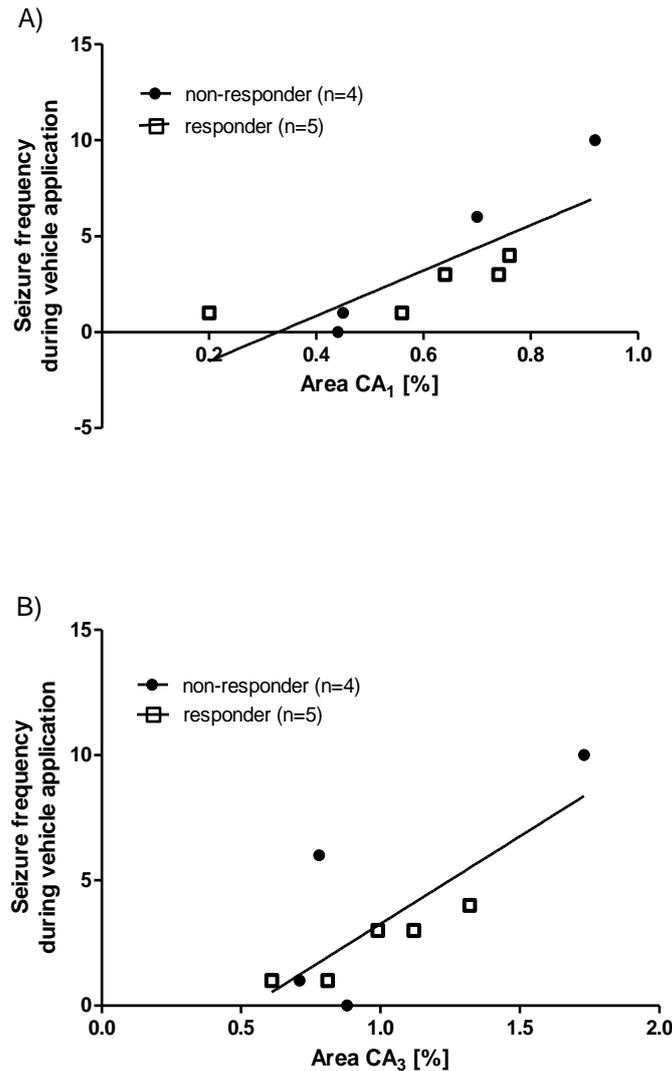
Weder im parietalen oder im piriformen Cortex noch in der Körnerzellschicht des GD oder dem Hilus des GD konnten zwischen den Tiergruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Größe der Pgp-markierten Fläche festgestellt werden (Tab. 4). Des Weiteren unterschieden sich die Tiergruppen im Hinblick auf die OD in keiner der im Rahmen dieser Studie ausgewerteten Regionen signifikant (Tab. 4).

Gehirnregion	Pgp-markierte Fläche (area in %)			Optische Dichte (OD)		
	Kontrolltiere	Responder	Non-responder	Kontrolltiere	Responder	Non-responder
CA <sub>1</sub>	0,31 ± 0,05	0,58 ± 0,10*	0,63 ± 0,12*	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01
CA <sub>3</sub>	0,71 ± 0,10	0,97 ± 0,12	1,02 ± 0,24	0,41 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Parietaler Cortex	0,39 ± 0,06	0,58 ± 0,14	0,34 ± 0,08	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,01
Piriformer Cortex	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,52 ± 0,00
Körnerzellschicht des GD	0,31 ± 0,07	0,24 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,01
Hilus des GD	0,36 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,3 ± 0,07	0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,50 ± 0,01

**Tab. 4:** Quantifizierung der Pgp-Expression in *Respondern* und *Non-respondern* durch Analyse der immunhistochemisch markierten Fläche und deren optischer Dichte. \* = signifikant zu Kontrolltieren.

### 1.6 Korrelation zwischen Anfallsfrequenz und Pgp-markierter Fläche

Im Anschluss an die Quantifizierung der Pgp-Expression wurde für die CA<sub>1</sub>- und CA<sub>3</sub>- Regionen eine mögliche Korrelation zwischen der Pgp-markierten Fläche (*area*) und der Anfallsfrequenz während der Vehikelphase überprüft. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Pgp-markierte Fläche in beiden Regionen signifikant mit der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelphase korrelierte (Abb. 29).



**Abb. 29: Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelphase und der Pgp-markierten Fläche (*area* in %) in der CA<sub>1</sub>-Region (A) und der CA<sub>3</sub>-Region (B) (Mittelwert ± SEM). Die Pgp-markierte Fläche korrelierte in beiden Regionen signifikant mit der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelphase (A:  $r = 0,80$ ,  $p = 0,01$ ; B:  $r = 0,78$ ,  $p = 0,01$ ).**

## 2. Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin

Mit dem Ziel, die Effekte einer Behandlung mit dem CNTF-mimetischen Peptid Cintrofin auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Studie sowohl die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen als auch der immunhistologischen Untersuchungen ausgewertet.

### 2.1 Elektrisches SE-Modell

Die Dauerstimulation wurde entsprechend der Beschreibung in Kap. IV.2.2 durchgeführt. Dabei wurde der SSSE nach vier Stunden durch eine Diazepam-Applikation (10 mg/kg i.p.) abgebrochen. Bei Bedarf wurde Diazepam wiederholt appliziert, bis der SSSE sicher beendet war. Von den insgesamt 34 stimulierten Tieren entwickelten 65% (n=22) einen rein generalisierten SSSE (Typ 3). 26% (n=9) zeigten fokale und generalisierte Anfälle (Typ 2) und 9% (n=3) wiesen rein fokale SSSE (Typ 1) auf. Ein Tier musste wenige Tage nach Statusinduktion aufgrund schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden.

### 2.2 Überwachung auf spontane Anfälle

Nach einer mehrwöchigen Latenzphase entwickelte die Mehrheit der Tiere als Folge des SSSE spontane epileptische Anfälle. Um einen potentiellen Effekt des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin auf die Epileptogenese zu überprüfen, wurden die Ratten acht Wochen nach Induktion des Status epilepticus systematisch auf das Auftreten von Anfällen überwacht (Kap. IV.2.4). Insgesamt konnten dabei 16 Tiere kontinuierlich überwacht werden [*reversed peptide* behandelte SE-Tiere (n=8); Cintrofin behandelte SE-Tiere (n=8)]. Während der 20-tägigen Überwachungsphase wurden die Häufigkeit und die Krampfdauer der Anfälle erfasst und anschließend ausgewertet. Die beobachteten, spontan wiederkehrenden Anfälle waren überwiegend generalisiert. Anhand des EEG war eine Unterscheidung fokaler und generalisierter Anfälle nicht möglich. Daher mussten die EEG-Aufzeichnungen in der entsprechenden Videosequenz überprüft werden. Innerhalb des Überwachungszeitraums zeigten fünf der *reversed peptide* und drei der Cintrofin behandelten Tiere spontane Anfälle. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in der Anfallsfrequenz und der mittleren Anfallsdauer.

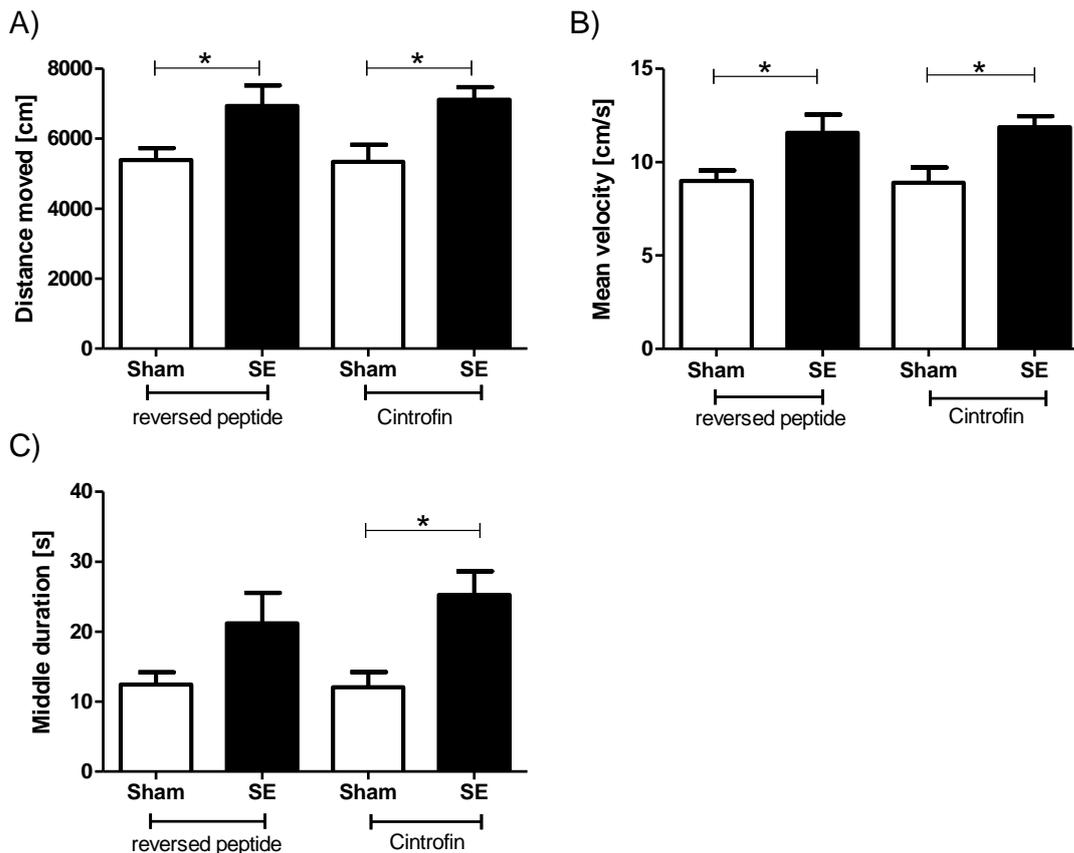
## 2.3 Prüfung antiepileptogener Effekte durch Cintrofin

### 2.3.1 Verhaltensmodelle

Die verhaltensphysiologischen Untersuchungen begannen eine Woche nach Ende des Video- und EEG-Monitorings. Um den Stress der Tiere während dieser Versuche zu minimieren, wurden die Ratten in den Wochen zuvor einem intensiven Handling unterzogen. Die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen werden im Folgenden in der Reihenfolge der verwendeten Verhaltensmodelle aufgeführt.

#### *Open Field*

Das *Open Field* dient der Beurteilung von Lokomotion und angsthäufigem Verhalten (CRABBE 1986; LANDGRAF u. WIGGER 2002; KESSLER et al. 2007) (Kap. II.3.4.2.1). Die Tiergruppen unterschieden sich dabei sowohl in der zurückgelegten Strecke als auch in der mittleren Laufgeschwindigkeit. Die mittlere Laufgeschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke der SE-Tiere waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. *Reversed peptide* und Cintrofin behandelte SE-Tiere unterschieden sich dabei jedoch nicht. Zudem waren Unterschiede in der Aufenthaltsdauer in den diversen Bereichen des *Open Field* erkennbar. Cintrofin behandelte SE-Tiere verbrachten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Zeit im mittleren Bereich des *Open Field* (Abb. 30). Die Tiergruppen unterschieden sich nicht in der Häufigkeit der „*rearings*“.

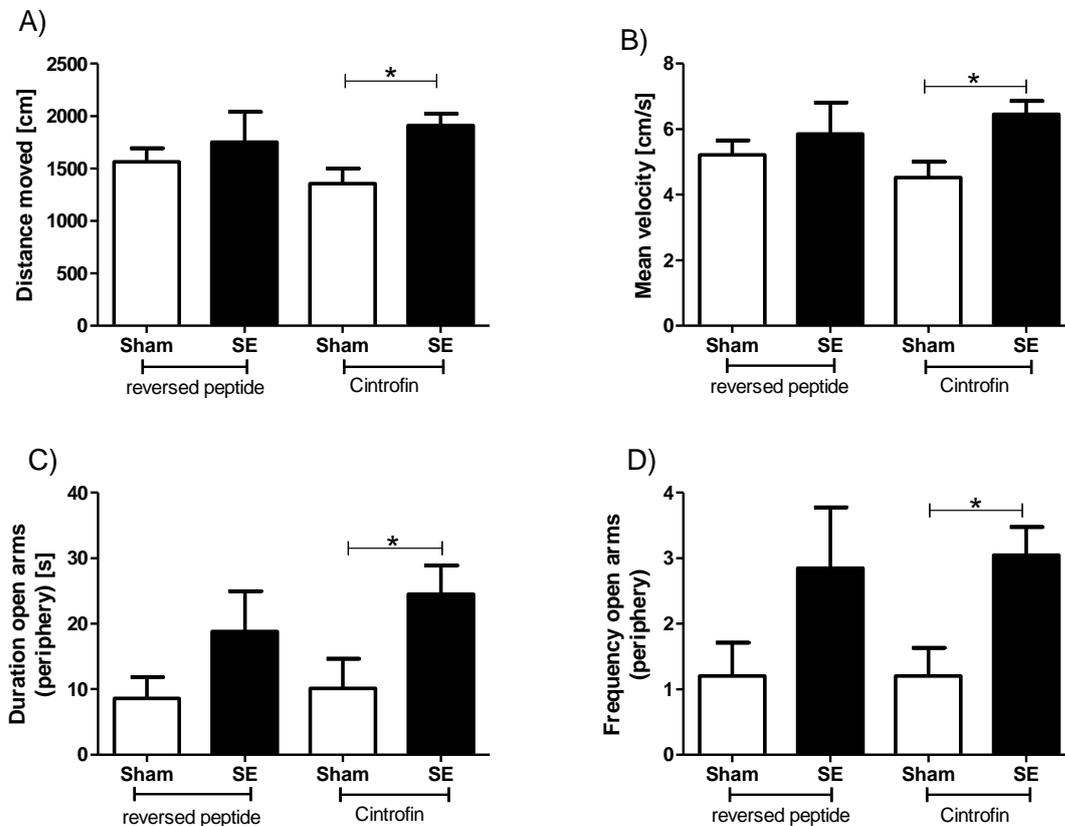


**Abb. 30: Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen im *Open Field*.** A) zurückgelegte Strecke, B) mittlere Laufgeschwindigkeit, C) Aufenthaltsdauer im mittleren Bereich des *Open Field* (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die stimulierten Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrollgruppen sowohl eine signifikant erhöhte mittlere Laufgeschwindigkeit als auch eine signifikant erhöhte zurückgelegte Strecke auf. Stimulierte, mit Cintrofin behandelte Tiere verbrachten signifikant mehr Zeit im mittleren Bereich des *Open Field* als die dazugehörige Kontrollgruppe (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=10).

#### *Elevated Plus Maze*

Das *Elevated Plus Maze* dient als Test zur Erfassung von angstassoziiertem Verhalten (HANDLEY u. MITHANI 1984) (Kap. II.3.4.2.2). Mit diesem Paradigma konnten Unterschiede in der zurückgelegten Laufstrecke und der mittleren Laufgeschwindigkeit zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Die mittlere Laufgeschwindigkeit und die zurückgelegte Laufstrecke der Cintrofin behandelten SE-Tiere waren signifikant erhöht. Zudem bestanden Unterschiede in der Häufigkeit des Betretens und der totalen Aufenthaltsdauer in der Peripherie der offenen Arme des *Elevated Plus Maze*. Die Cintrofin behandelten SE-Tiere betraten die Peripherie der offenen Arme signifikant häufiger und wiesen dort eine signifikant höhere Aufenthaltsdauer auf als die Kontrolltiere (Abb. 31).

Unterschiede in Häufigkeit und Dauer der „rearings“ oder der „head dips“ konnten nicht festgestellt werden.



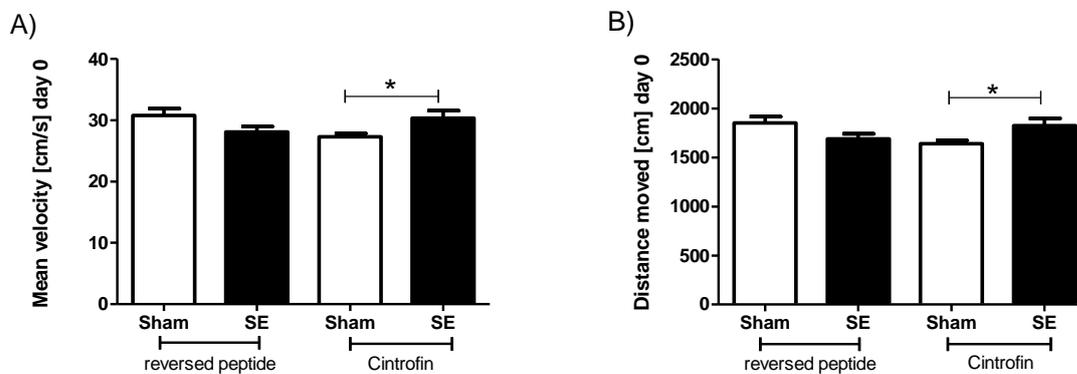
**Abb. 31: Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen im *Elevated Plus Maze*.** A) zurückgelegte Strecke, B) mittlere Laufgeschwindigkeit, C) totale Aufenthaltsdauer in der Peripherie der offenen Arme, D) Häufigkeit des Betretens der Peripherie der offenen Arme (Mittelwert± SEM). Die mittlere Laufgeschwindigkeit und die zurückgelegte Laufstrecke der Cintrofin behandelten SE-Tiere waren signifikant erhöht. Des Weiteren betraten Cintrofin behandelte SE-Tiere die Peripherie der offenen Arme signifikant häufiger und wiesen dort im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant höhere Aufenthaltsdauer auf (*reversed peptide/ Sham: n=10; reversed peptide/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=10*).

### *Black White Box*

Die *Black White Box* dient zur Erfassung von angstassoziiertem Spontanverhalten (COSTALL et al. 1989) (Kap. II.3.4.2.3). Die Tiergruppen unterschieden sich weder in der Anzahl der Übertritte zwischen den beiden Kompartimenten, noch in der Aufenthaltsdauer im schwarzen und weißen Kompartiment der Apparatur. Die Latenzzeiten der verschiedenen Gruppen bis zum Aufsuchen der dunklen Seite der Box wichen ebenfalls nicht voneinander ab.

*Morris Water Maze*

Das *Morris Water Maze* (MWM) dient der Erfassung des räumlichen Orientierungsvermögens sowie der Lern- und Gedächtnisleistung (MORRIS 1984; MCNAMARA u. SKELTON 1993) (Kap. II.3.4.2.4). Vor Beginn der Akquisition wurde ein Habituationdurchgang durchgeführt, um eventuelle Abweichungen der Tiergruppen in der Schwimgeschwindigkeit zu untersuchen. Zudem sollte den Ratten dadurch die Möglichkeit gegeben werden, sich an Becken und Wasser zu gewöhnen. Während der Habituation waren sowohl die zurückgelegte Schwimmstrecke als auch die mittlere Schwimgeschwindigkeit der Cintrofin behandelten SE-Tiere im Vergleich zu der mit Cintrofin behandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 32).



**Abb. 32:** Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen im MWM. A) mittlere Schwimgeschwindigkeit, B) zurückgelegte Schwimmstrecke (Mittelwert± SEM) während der Habituation im MWM. Die zurückgelegte Schwimmstrecke und die mittlere Schwimgeschwindigkeit der Cintrofin behandelten SE-Tiere waren im Vergleich zu der mit Cintrofin behandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9).

Während der fünftägigen Akquisitionsphase konnten an Tag 1 und Tag 3 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen beobachtet werden. An den Tagen 2, 4 und 5 benötigten die mit *reversed peptide* behandelten SE-Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant mehr Zeit bis zum ersten Auffinden der Plattform. Die Cintrofin behandelten SE-Tiere benötigten an den Tagen 4 und 5 im Vergleich zu den *reversed peptide* behandelten Kontrolltieren signifikant mehr Zeit für das Auffinden der Plattform (Abb. 33 und Abb. 34).

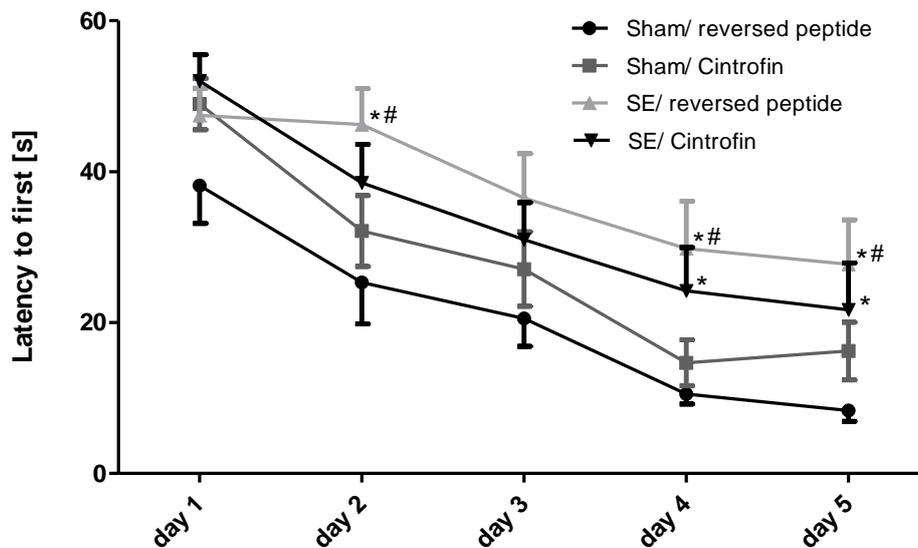
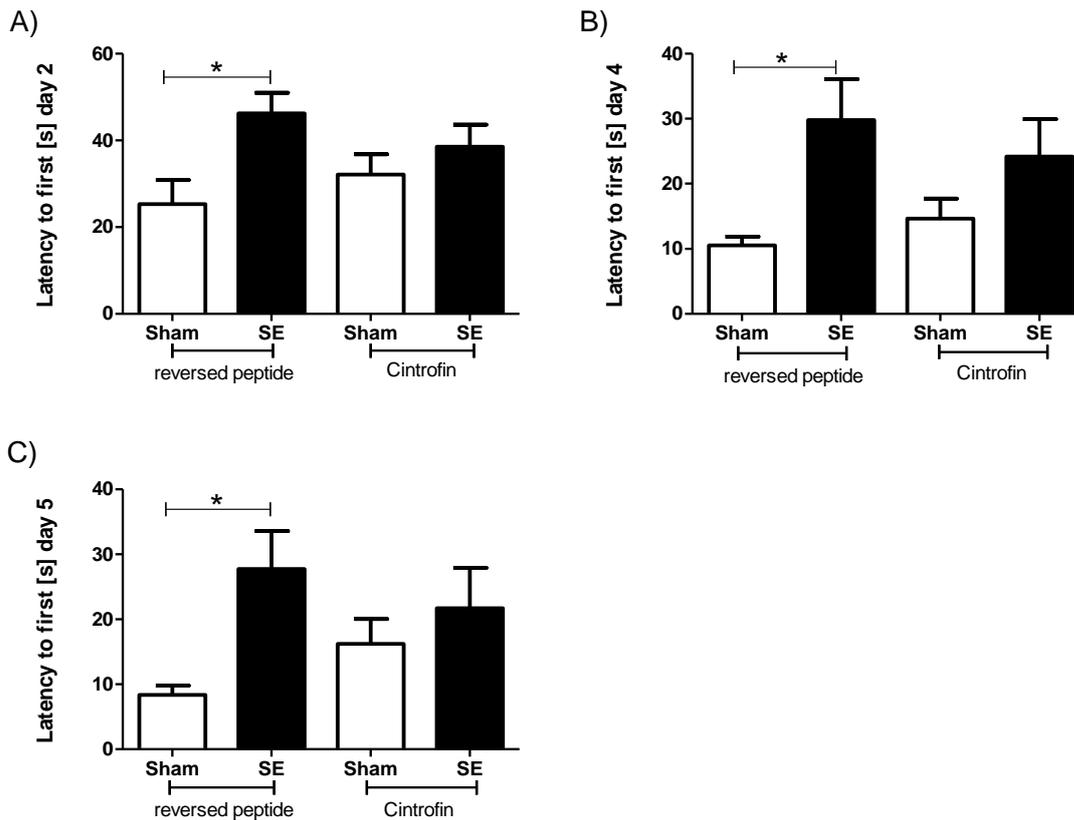
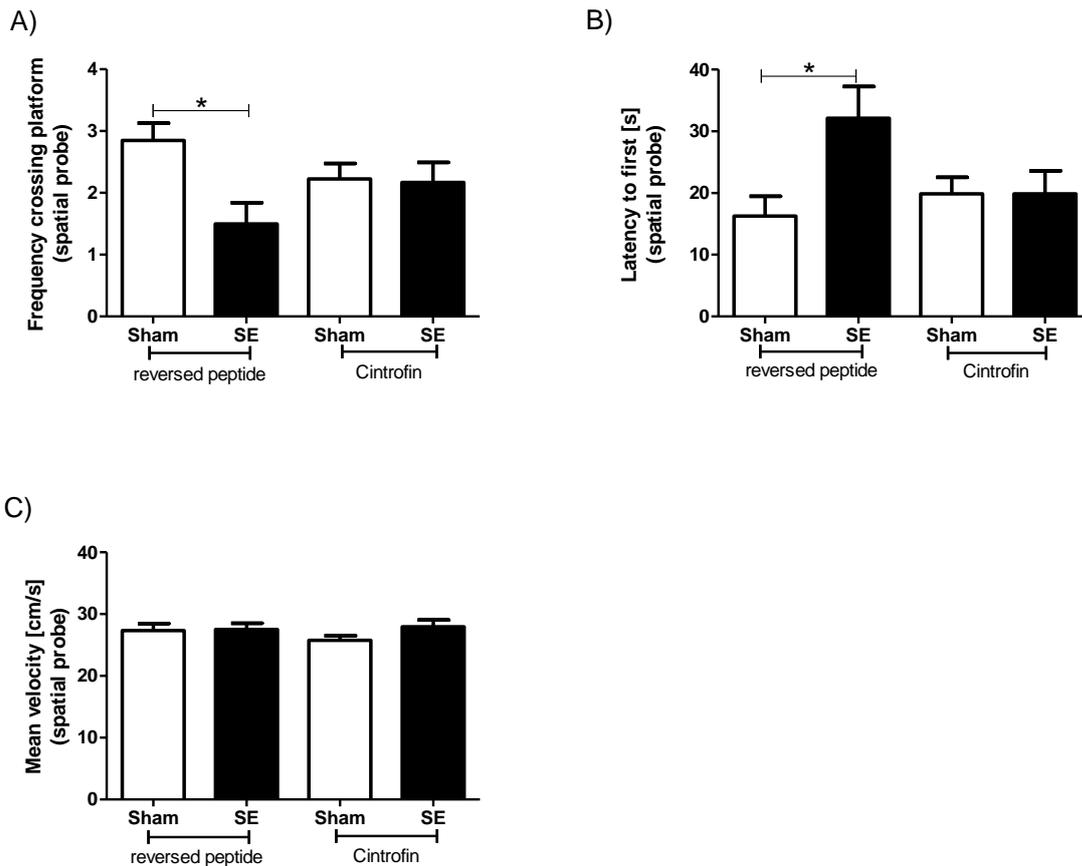


Abb. 33: Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen im MWM. Akquisitionskurve nach mehrtägigem Lerntraining im MWM (Mittelwert  $\pm$  SEM) (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9). \* = signifikant zu *reversed peptide*/ Sham, # = signifikant zu Cintrofin/ Sham.



**Abb. 34: Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen im MWM. Dauer bis zum Auffinden der Plattform an den Tagen 2 (A), 4 (B) und 5 (C) (Mittelwert  $\pm$  SEM). An den Tagen 2, 4 und 5 benötigten die mit *reversed peptide* behandelten SE-Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant mehr Zeit bis zum Auffinden der Plattform. Die Cintrofin behandelten SE-Tiere benötigten an den Tagen 4 und 5 im Vergleich zu den *reversed peptide* behandelten Kontrolltieren signifikant mehr Zeit für das Auffinden der Plattform (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9).**

Die *spatial probe* wurde direkt an den letzten Akquisitionsdurchgang des fünften Tages angeschlossen. Dabei war die Latenz bis zum Erreichen der Plattformposition bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Anzahl der Kreuzungen der Schwimmbahn mit der ehemaligen Plattformposition war bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrollgruppe signifikant herabgesetzt (Abb. 35). Des Weiteren konnten zwischen den Tiergruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Aufenthaltszeit im Plattformquadranten des MWM festgestellt werden. Die Tiergruppen unterschieden sich in der *spatial probe* nicht in ihrer mittleren Schwimgeschwindigkeit.



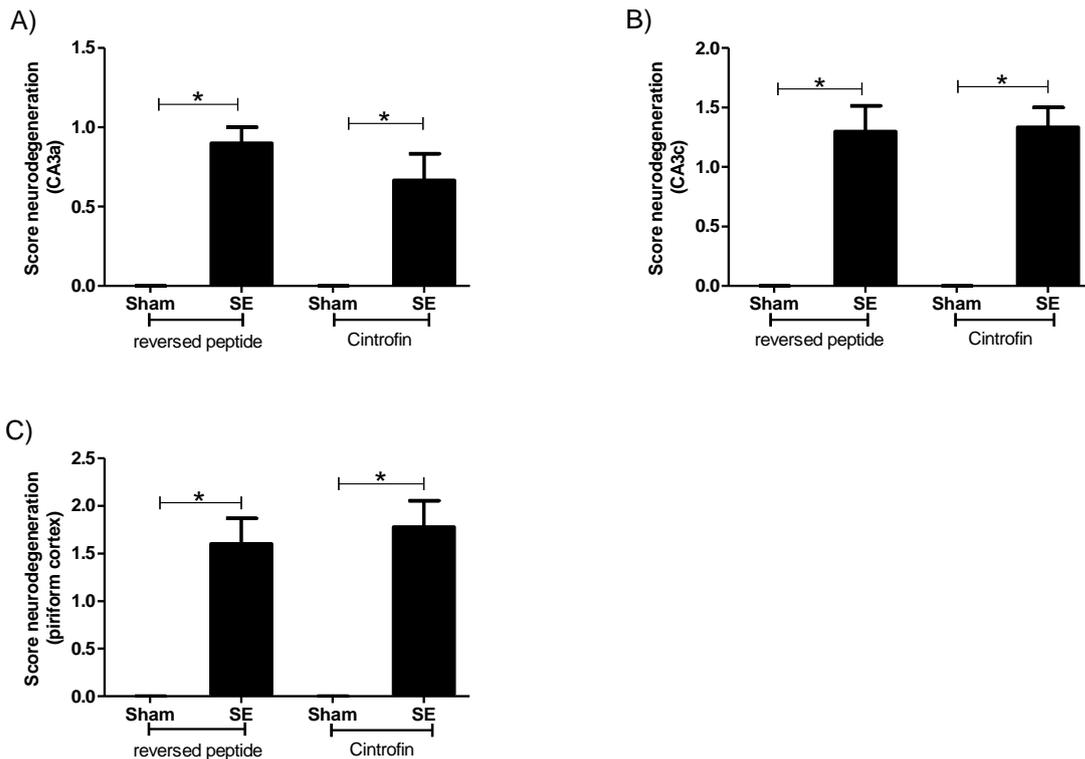
**Abb. 35:** Effekte von Cintrofin auf Verhaltensweisen in der *spatial probe* im MWM. A) Anzahl der Kreuzungen der Schwimmbahn mit der ehemaligen Plattformposition, B) Latenz bis zum Erreichen der Plattformposition, C) Mittlere Schwimmggeschwindigkeit (Mittelwert $\pm$  SEM). Bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren war die Anzahl der Kreuzungen der Schwimmbahn mit der ehemaligen Plattformposition im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrollgruppe signifikant herabgesetzt. Die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattformposition war bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Tiergruppen unterschieden sich in der *spatial probe* nicht in der mittleren Schwimmggeschwindigkeit (*reversed peptide/ Sham*: n=10; *reversed peptide/ SE*: n=10; *Cintrofin/ Sham*: n=10; *Cintrofin/ SE*: n=9).

### 2.3.2 Immunhistochemie

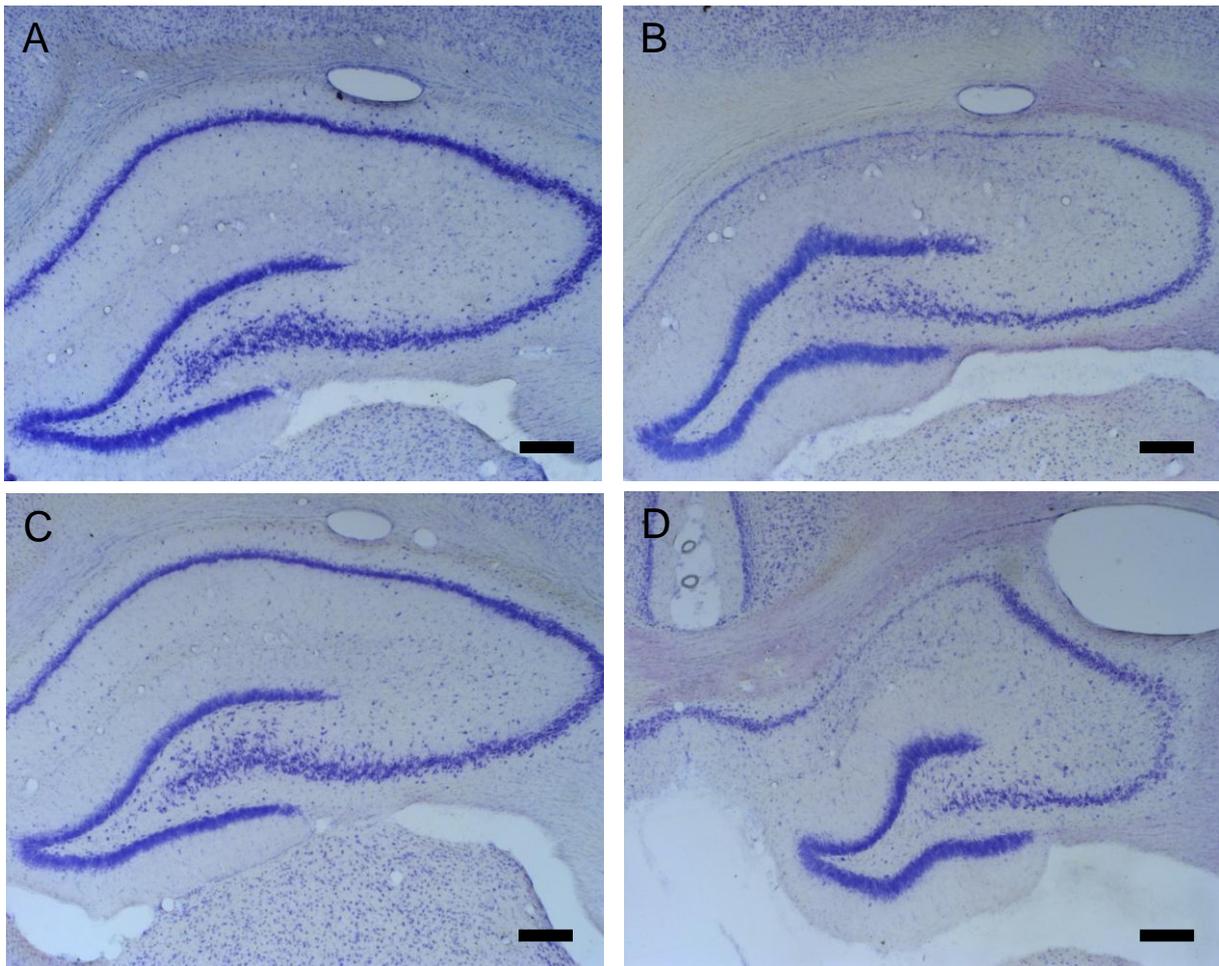
#### *Nissl-Färbung*

Um das Ausmaß der Neurodegeneration bestimmen zu können, wurden neurodegenerative Veränderungen im Bereich des Cornu Ammonis, des piriformen Cortex und des parietalen Cortex mithilfe eines *Score*-Systems erfasst (Kap. IV.2.8). Hierbei wurden die CA<sub>1</sub>-, CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c/4</sub>-Region differenziert voneinander bewertet. Zusätzlich zur Quantifizierung der Neuronenanzahl erlaubte diese Methode eine Verifizierung der genauen Lage der implantierten Elektrode. Die Tiergruppen unterschieden sich sowohl in der CA<sub>1</sub>-Region als

auch im parietalen Cortex nicht im Ausmaß der neurodegenerativen Veränderungen. Allerdings waren die neurodegenerativen Veränderungen der SE-Tiere sowohl in den CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c</sub>-Regionen als auch im piriformen Cortex im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollgruppen signifikant erhöht (Abb. 36). Cintrofin und *reversed peptide* behandelte Tiergruppen unterschieden sich dabei jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 37).



**Abb. 36: Effekte von Cintrofin auf neurodegenerative Veränderungen im Score-System. A) neurodegenerative Veränderungen in der CA<sub>3a</sub>-Region, B) neurodegenerative Veränderungen in der CA<sub>3c</sub>-Region, C) neurodegenerative Veränderungen im piriformen Cortex (Mittelwert ± SEM). In der CA<sub>3a</sub>-Region, der CA<sub>3c</sub>-Region und dem piriformen Cortex waren die neurodegenerativen Veränderungen sowohl bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren als auch bei den Cintrofin behandelten SE-Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9).**



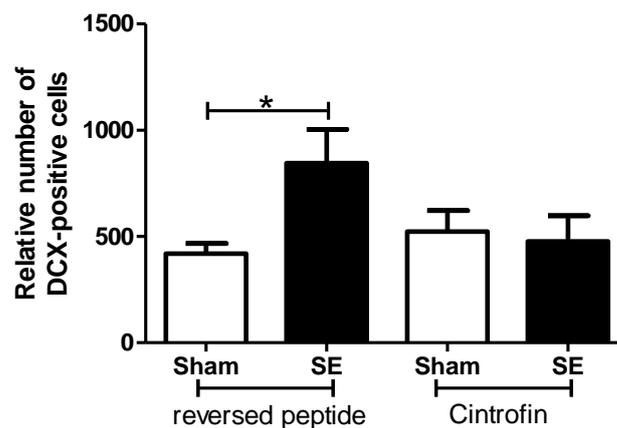
**Abb. 37: Nissl-Färbung zur Bestimmung des Ausmaßes der Neurodegeneration. Ausmaß der Neurodegeneration im Hippocampus eines *reversed peptide* behandelten Sham-Tieres (A), eines *reversed peptide* behandelten SE-Tieres (B), eines Cintrofin behandelten Sham-Tieres (C) und eines Cintrofin behandelten SE-Tieres (D). Die Induktion eines SE führte sowohl bei Cintrofin behandelten als auch bei *reversed peptide* behandelten Tieren zu einer signifikanten Zunahme der Neurodegeneration. Maßstabballen = 200 µm**

Zur weiteren Charakterisierung der Neurodegeneration wurden anschließend thioningefärbte Neurone im Bereich des Hilus des Hippocampus mittels der „*optical fractionator*“ Methode (Kap. IV.2.8) ausgezählt. Pro Gruppe wurden 5 Tiere ausgewertet, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden konnten. Daher wurde diese Auswertung eingestellt.

#### *Doublecortin-Färbung*

Um neuronale Vorläuferzellen nachweisen zu können, wurde eine Doublecortin-Färbung durchgeführt (Kap. IV.2.7). Neuronale Vorläuferzellen des Hippocampus und des olfaktorischen Systems exprimieren das Mikrotubulin-assoziierte Protein Doublecortin (DCX) transient. Aufgrund dieser neuronalen vorläuferzellspezifischen Expression eignet sich DCX

sehr gut als quantitativer Marker für den Nachweis einer adulten Neurogenese (RAO u. SHETTY 2004; COUILLARD-DESPRES et al. 2005). Die Anzahl DCX-positiver Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus war bei den stimulierten, mit *reversed peptide* behandelten Tieren im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dagegen unterschieden sich die stimulierten, mit Cintrofin behandelten Tiere in der Anzahl DCX-positiver Zellen nicht signifikant von der dazugehörigen Kontrollgruppe (Abb. 38).



**Abb. 38:** Effekte von Cintrofin auf die Anzahl DCX-positiver Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus. *Reversed peptide* behandelte SE-Tiere wiesen im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl DCX-positiver Zellen auf (*reversed peptide/ Sham*: n=10; *reversed peptide/ SE*: n=10; *Cintrofin/ Sham*: n=10; *Cintrofin/ SE*: n=8).

*Reversed peptide* behandelte SE-Tiere wiesen zudem im Vergleich zu ihrer korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl persistierender, basaler Dendriten der DCX-positiven Zellen auf (Abb. 39). Cintrofin behandelte SE-Tiere unterschieden sich jedoch auch in dieser Hinsicht nicht von ihrer dazugehörigen Kontrollgruppe (Abb. 40).

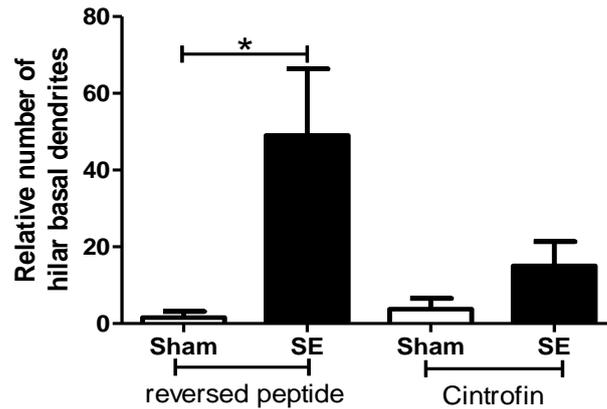


Abb. 39: Effekte von Cintrofin auf die Anzahl hilarer basaler Dendriten im Gyrus Dentatus des Hippocampus. *Reversed peptide* behandelte SE-Tiere wiesen im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl hilarer basaler Dendriten auf (*reversed peptide/ Sham*: n=10; *reversed peptide/ SE*: n=10; *Cintrofin/ Sham*: n=10; *Cintrofin/ SE*: n=8).

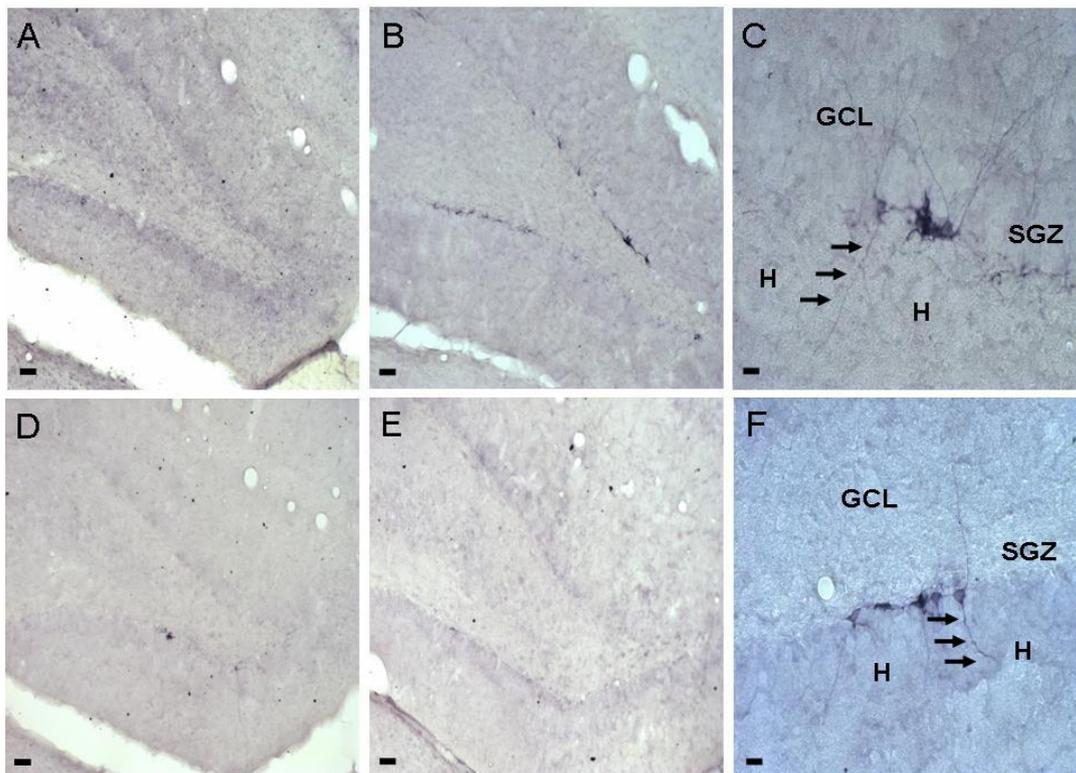
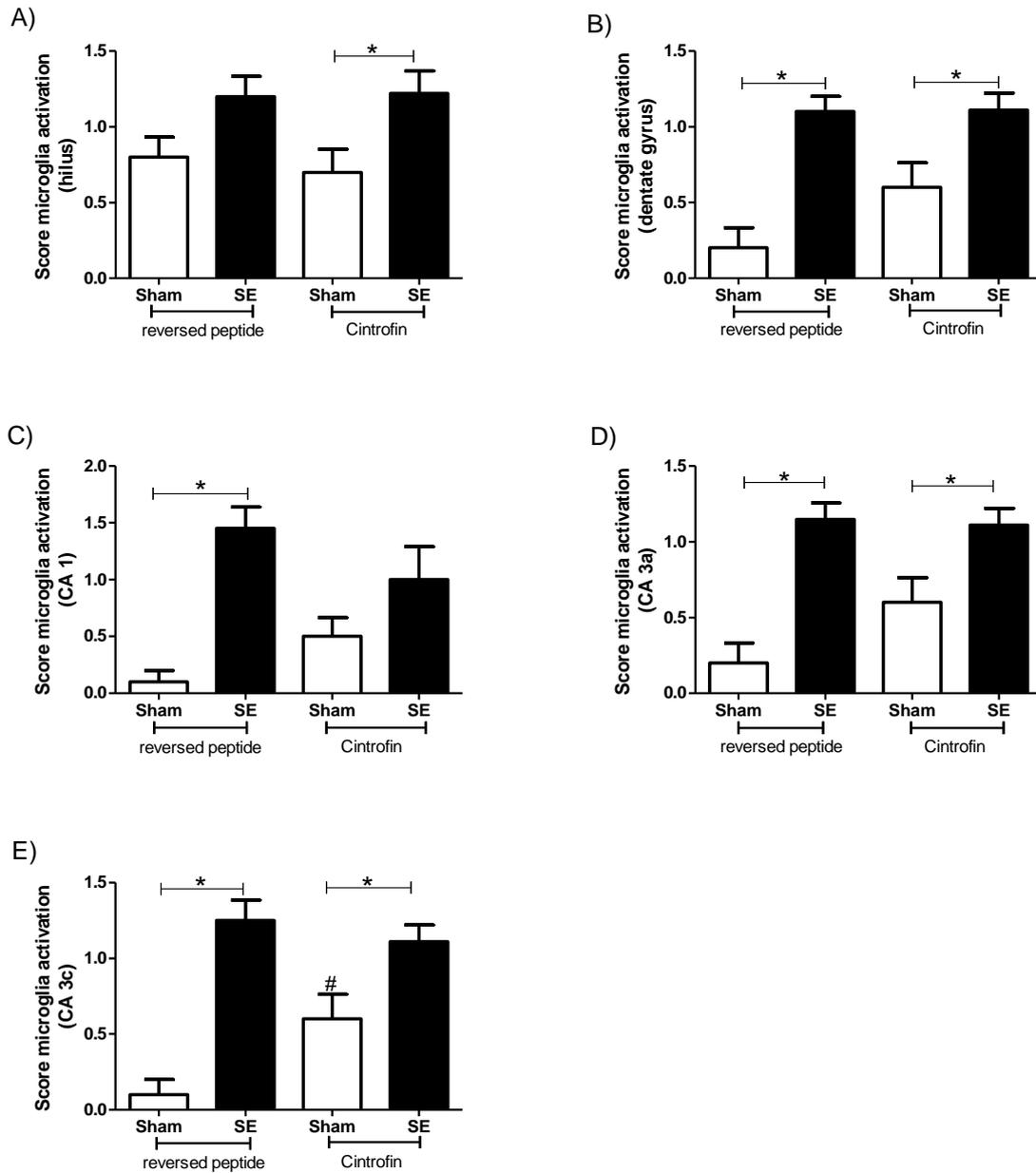


Abb. 40: Immunhistochemische Färbung des spezifischen Vorläuferproteins Doublecortin (DCX) im Hippocampus eines *reversed peptide* behandelten Sham-Tieres (A), eines *reversed peptide* behandelten SE-Tieres (B-C), eines Cintrofin behandelten Sham-Tieres (D) und eines Cintrofin behandelten SE-Tieres (E-F). Die Anzahl DCX-positiver Zellen mit persistierenden, basalen Dendriten im Gyrus Dentatus des Hippocampus war bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe signifikant erhöht. (C) und (F) zeigen Vergrößerungen einzelner DCX-positiver Zellen, wobei anfallsinduzierte, in den Hilus reichende, persistierende basale Dendriten mit Pfeilen markiert sind. GCL = *granule cell layer* (Körnerzellschicht); H = Hilus; SGZ = *subgranular zone* (subgranuläre Zone). Maßstabballen = 100  $\mu$ m

*ED1-Färbung*

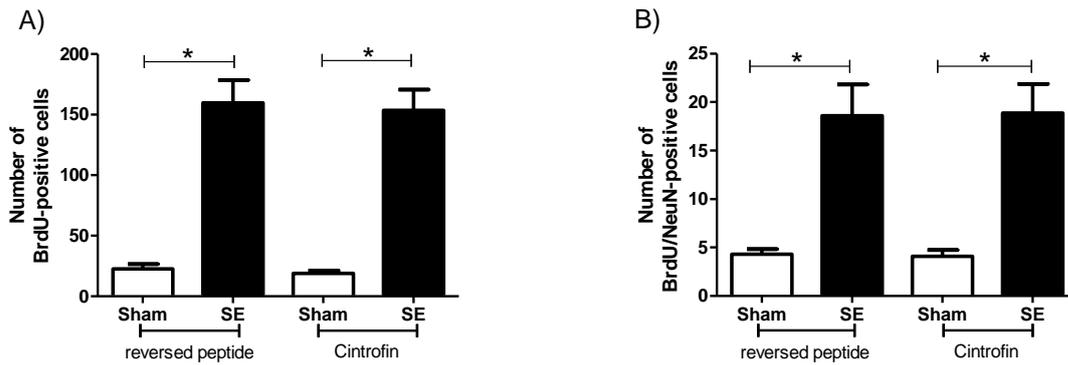
Um das Ausmaß der Mikroglia-Aktivierung bestimmen zu können, wurde diese mithilfe eines *Score*-Systems im Bereich des Cornu Ammonis erfasst (Kap. IV.2.8). Hilus, Gyrus Dentatus sowie CA<sub>1</sub>-, CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c/4</sub>- Region wurden hierbei differenziert voneinander bewertet. Im Bereich des Hilus konnte bei den Cintrofin behandelten SE-Tieren im Vergleich zu der korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Mikroglia-Aktivierung festgestellt werden. In der CA<sub>1</sub>-Region unterschieden sich die *reversed peptide* behandelten SE-Tiere signifikant von der dazugehörigen Kontrollgruppe. Sowohl im Bereich des Gyrus Dentatus als auch in der CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c</sub>- Region konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden SE-Tiergruppen und den korrespondierenden Kontrollgruppen festgestellt werden. Zudem waren signifikante Unterschiede in der Mikroglia-Aktivierung der beiden Kontrollgruppen hinsichtlich der CA<sub>3c</sub>-Region zu erkennen (Abb. 41).



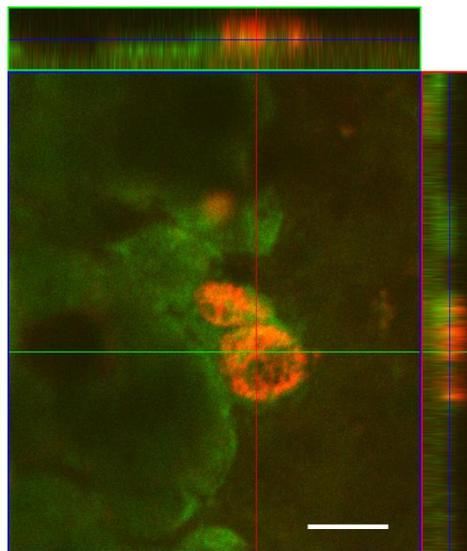
**Abb. 41: Effekte von Cintrofin auf Mikroglia-Aktivierung im *Score*-System.** A) Mikroglia-Aktivierung im Hilus, B) Mikroglia-Aktivierung im Gyrus Dentatus, C) Mikroglia-Aktivierung in der CA<sub>1</sub>-Region, D) Mikroglia-Aktivierung in der CA<sub>3a</sub>-Region, E) Mikroglia-Aktivierung in der CA<sub>3c</sub>-Region (Mittelwert ± SEM). Im Bereich des Hilus wiesen die Cintrofin behandelten SE-Tiere im Vergleich zu der korrespondierenden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Mikroglia-Aktivierung auf. In der CA<sub>1</sub>-Region unterschieden sich die *reversed peptide* behandelten SE-Tiere signifikant von der dazugehörigen Kontrollgruppe. Sowohl im Bereich des Gyrus Dentatus als auch in der CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c</sub>- Region konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden SE-Tiergruppen und den korrespondierenden Kontrollgruppen festgestellt werden. Zudem konnten signifikante Unterschiede in der Mikroglia-Aktivierung der beiden Kontrollgruppen hinsichtlich der CA<sub>3c</sub>-Region nachgewiesen werden (*reversed peptide*/ Sham: n=10; *reversed peptide*/ SE: n=10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9). # = signifikant zu *reversed peptide*/ Sham.

### *BrdU/NeuN-Färbung*

Für die Quantifizierung der Neubildung von Nervenzellen nach Induktion eines Status epilepticus wurde ein immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers BrdU verwendet (Kap. IV.2.7). Dabei erfolgte die Bestimmung der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Bereich des Gyrus Dentatus in sechs aufeinanderfolgenden Gehirnschnitten. Die BrdU-positiven Zellen der sechs Gehirnschnitte wurden separat gezählt und anschließend addiert. Sowohl bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren als auch bei den Cintrofin behandelten SE-Tieren konnte im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgruppen ein signifikanter Anstieg BrdU-positiver Zellen festgestellt werden (Abb. 42). Zusätzlich wurde eine BrdU/NeuN-Doppelmarkierung durchgeführt, um eine Aussage über das Schicksal der statusinduzierten, neugebildeten Neurone im Hippocampus treffen zu können (Kap. IV.2.7). Dabei wurde die Anzahl der Zellen, die BrdU inkorporiert hatten und NeuN koexprimierten, im Gyrus Dentatus mittels Fluoreszenztechnik erfasst. Die Bestimmung der Anzahl BrdU/NeuN-doppelmarkierter Zellen erfolgte analog zu jener der BrdU-positiven Zellen in sechs aufeinander folgenden Gehirnschnitten, die separat gezählt und anschließend addiert wurden. Durch sorgfältige Analyse der konfokalen Z-Serien konnte die Doppelmarkierung überprüft werden (Abb. 43). Während hierbei keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl BrdU/NeuN-doppelmarkierter Zellen pro Gyrus Dentatus zwischen den beiden Statusgruppen bestanden, unterschieden sich beide Statusgruppen jedoch signifikant von den korrespondierenden Kontrollgruppen. Sowohl bei den *reversed peptide* behandelten SE-Tieren als auch bei den Cintrofin behandelten SE-Tieren konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein signifikanter Anstieg BrdU/NeuN-doppelmarkierter Zellen festgestellt werden (Abb. 42).



**Abb. 42: Effekte von Cintrofin auf die Anzahl BrdU- und BrdU/NeuN- markierter Zellen im Gyrus Dentatus. A) Anzahl BrdU-markierter Zellen im Gyrus Dentatus, B) Anzahl BrdU/NeuN-markierter Zellen im Gyrus Dentatus (Mittelwert  $\pm$  SEM). Bei beiden SE-Tiergruppen konnte sowohl in Bezug auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen als auch auf die Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen ein signifikanter Anstieg festgestellt werden. *Reversed peptide* behandelte SE-Tiere und Cintrofin behandelte SE-Tiere unterschieden sich dabei jedoch nicht (*reversed peptide*/Sham: n=10; *reversed peptide*/SE: n= 10; Cintrofin/ Sham: n=10; Cintrofin/ SE: n=9).**



**Abb. 43: BrdU/NeuN-Doppelmarkierung zweier Zellen eines Cintrofin behandelten SE-Tieres innerhalb des Gyrus Dentatus. Maßstab Balken = 10  $\mu$ m**

## VI. Diskussion

### 1. Darstellung transporterassoziierter Pharmakoresistenz mittels eines positronen-emissions-tomographischen Verfahrens

Der Begriff „Epilepsie“ bezeichnet eine neurologische Erkrankung, die weltweit mindestens 50 Millionen Menschen betrifft (LAZAROWSKI u. CZORNYJ 2011). Obwohl aktuelle Daten auf einen geringfügigen Anstieg der therapeutischen Erfolge bei der Behandlung von Epilepsiepatienten hinweisen (POTSCHKA 2010c), bleibt die pharmakoresistente Epilepsieform trotz der kontinuierlichen Einführung neuer Antiepileptika eines der schwerwiegendsten Probleme der klinischen Epileptologie (POTSCHKA 2010c). Heutzutage kann bei mehr als 30% der Epilepsiepatienten immer noch kein pharmakotherapeutischer Erfolg erreicht werden (HITIRIS et al. 2007). Die Mechanismen der Pharmakoresistenz konnten bisher nicht vollständig geklärt werden. Eine zunehmende Anzahl experimenteller Studien deutet jedoch darauf hin, dass die Überexpression von *Multidrug*-Transportern an den Mechanismen, die zu einer Pharmakoresistenz führen, beteiligt sein könnte (POTSCHKA 2010d). Zu diesen *Multidrug*-Transportern, die sich an der Blut-Hirn-Schranke befinden, gehört unter anderem P-Glykoprotein (Pgp). Die Verfügbarkeit einer nicht-invasiven Darstellungsmethode, die eine Messung der Transporter-Funktion oder deren Expression *in vivo* ermöglicht, wäre von bedeutendem klinischen Nutzen. Durch den Einsatz einer solchen Methode könnte die Identifizierung jener Patienten, die von einer Behandlung mit Transporter-modulierenden Medikamenten profitieren würden, ermöglicht werden (MAIRINGER et al. 2011). Eine frühzeitige Identifizierung der pharmakoresistenten Epilepsiepatienten würde im Hinblick auf nicht-pharmakologische Behandlungsstrategien, wie beispielsweise Epilepsie-Chirurgie und Vagusnerv-Stimulation, zu einer schnelleren Entscheidungsfindung führen (POTSCHKA 2010c). Es wurde bereits diskutiert, dass eine frühzeitige Anwendung dieser alternativen therapeutischen Ansätze das Ergebnis einer Behandlung signifikant beeinflussen kann (KWAN u. SPERLING 2009). Eine nicht-invasive Darstellungsmethode zur Messung der Transporter-Funktion oder deren Expression stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar, mit deren Hilfe die klinische Relevanz der Transporter-Überexpression derzeit weiterführend analysiert wird (POTSCHKA 2010d). In diesem Zusammenhang kommt der Evaluierung verschiedener *Tracer* im Hinblick auf deren Eignung zur Untersuchung von Pgp eine besondere Bedeutung zu.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden verschiedene *Tracer* evaluiert und deren Anreicherung bei pharmakosensitiven Ratten (*Responder*), pharmakoresistenten Ratten (*Non-responder*) und Kontrolltieren (*control*) vor und nach Applikation des Pgp-Hemstoffs Tariquidar verglichen. Im Anschluss an die PET-Untersuchungen wurde eine immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der Pgp-Expression der einzelnen Tiergruppen durchgeführt. Dadurch sollte evaluiert werden, ob zwischen *Respondern*, *Non-respondern* und Kontrolltieren eine Veränderung der Pgp-Expression auftritt.

Im Rahmen der immunhistochemischen Quantifizierung der Pgp-Expression konnte in der CA<sub>1</sub>-Region des Hippocampus eine signifikante Erhöhung der Pgp-markierten Fläche bei *Respondern* und *Non-respondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit bereits durchgeführten Studien, in denen sowohl in der CA<sub>1</sub>- als auch in der CA<sub>3</sub>- Region eine signifikant größere Pgp-markierte Fläche bei den SE-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden konnte (BANKSTAHL et al. 2008; BANKSTAHL et al. 2011). Der signifikante Unterschied der Pgp-Expression zwischen stimulierten Tieren und Kontrolltieren deutet analog zu früheren Studien darauf hin, dass die Anfallsaktivität der Epilepsiepatienten eine gesteigerte Pgp-Expression verursacht (SEEGERS et al. 2002a; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b).

Zudem wies die Tiergruppe der *Non-responder* in der vorliegenden Studie im Hinblick auf die Pgp-markierte Fläche sowohl in der CA<sub>1</sub>- als auch in der CA<sub>3</sub>- Region im Vergleich zu *Respondern* und Kontrolltieren leicht erhöhte Werte auf. Dieser Unterschied war jedoch in keiner der beiden Regionen signifikant. In einer früheren Studie konnte in der CA<sub>1</sub>-Region eine signifikante Erhöhung der Pgp-markierten Fläche der *Non-responder* im Vergleich zu den *Respondern* nachgewiesen werden (VOLK u. LÖSCHER 2005). In dieser Untersuchung konnte allerdings ebenfalls nicht in allen untersuchten Gehirnregionen eine gesteigerte Pgp-Expression beobachtet werden (VOLK u. LÖSCHER 2005). Eine Ausnahme stellte dabei, analog zu den vorliegenden Ergebnissen, die CA<sub>1</sub>-Region des Hippocampus dar, in welcher ein signifikanter Anstieg der Pgp-Expression in epileptischen Tieren nachgewiesen werden konnte (SEEGERS et al. 2002c). Da Phenobarbital als Pgp-Substrat fungiert (SCHUETZ et al. 1996; POTSCHKA et al. 2002), ist die vermehrte Pgp-Expression bei Tieren, welche gegenüber Phenobarbital pharmakoresistent sind (*Non-responder*), eine eingängige Erklärung für die Tatsache, dass es mithilfe dieses Antiepileptikums nicht möglich ist, die Anfälle der Tiere zu unterdrücken (VOLK u. LÖSCHER 2005). Da im Rahmen der vorliegenden Studie die Phenobarbital-Konzentration im Plasma der Tiere bestimmt wurde, konnte ausgeschlossen

werden, dass das Nichtansprechen der Tiere auf die Behandlung mit Phenobarbital auf einen unzureichenden Wirkstoffspiegel zurückzuführen war.

Des Weiteren konnte im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien (VAN VLIET et al. 2005; REMY u. BECK 2006) eine signifikante Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelphase der Überwachung und der immunhistochemisch Pgp-markierten Fläche festgestellt werden. Demzufolge unterstützt die vorliegende Studie die Annahme, dass die gesteigerte Pgp-Expression bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten eine Konsequenz der unkontrollierten Anfälle darstellt (SEEGERS et al. 2002b).

Diese Studie stellt die erste *in vivo* PET-Studie dar, bei welcher als *Tracer* [<sup>11</sup>C]Laniquidar verwendet wurde. Laniquidar ist ein Pgp-Modulator der dritten Generation, der bereits in klinischen Tests zur Regulation der *Multidrug*-Transporter eingesetzt wurde (LUURTSEMA et al. 2009). Pgp-Modulatoren der dritten Generation werden als optimal für den klinischen Einsatz erachtet, da sie im Gegensatz zu Modulatoren der ersten Generation (MAGNASCO et al. 2008) keine zusätzlichen pharmakodynamischen Effekte verursachen. Radioaktiv markierte Pgp-Hemmstoffe können verwendet werden, um eine herabgesetzte Expression des Pgp an der Blut-Hirn-Schranke bei neurodegenerativen Erkrankungen darzustellen (COLABUFO et al. 2010).

In der vorliegenden Studie wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass [<sup>11</sup>C]Laniquidar vorwiegend als Pgp-Hemmstoff fungiert (WANG et al. 2003). Die niedrigen SUV-Werte des *Tracers* vor Tariquidar-Applikation könnten jedoch darauf hinweisen, dass [<sup>11</sup>C]Laniquidar in *Tracer*-Konzentrationen als Pgp-Substrat fungiert. Dadurch ließe sich die niedrige zerebrale Aufnahme des *Tracers* vor Tariquidar-Applikation erklären. Die Applikation des Tariquidar, welches einen Pgp-Hemmstoff darstellt (LUNA-TORTOS et al. 2008), resultierte in einer erhöhten zerebralen Anreicherung des *Tracers* [<sup>11</sup>C]Laniquidar (Abb. 18). Der signifikante Anstieg der *Tracer*-Konzentration im Gehirn nach Tariquidar-Applikation weist analog zu bereits veröffentlichten Daten (LUURTSEMA et al. 2009) darauf hin, dass [<sup>11</sup>C]Laniquidar zumindest in der für einen *Tracer* nötigen Dosierung als Pgp-Substrat fungiert. Weitere Studien werden nötig sein, um nachzuweisen, ob das Verhalten dieses *Tracers* von der verabreichten *Tracer*-Konzentration abhängig ist. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass [<sup>11</sup>C]-markiertes Tariquidar, das ursprünglich ebenfalls als Pgp-Hemmstoff beschrieben wurde und eine dem [<sup>11</sup>C]Laniquidar ähnliche Molekülstruktur besitzt, in *Tracer*-Konzentrationen ebenfalls als Pgp-Substrat fungiert (BAUER et al. 2010). Obwohl die SUV („*standardized uptake values*“)-Werte des *Tracers* [<sup>11</sup>C]Laniquidar vor

Tariquidar-Applikation sehr gering waren, waren diese dennoch höher als die SUV-Werte, die durch Einsatz des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil, dem derzeit am meisten verwendeten Pgp-Tracer, in früheren Studien unter ähnlichen experimentellen Bedingungen erzielt werden konnten (SYVÄNEN et al. 2011). Daher scheint [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar in dieser Hinsicht für die Untersuchung der Pgp-Expression und -Funktion geeigneter zu sein als [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil. Einen weiteren positiven Aspekt für den Einsatz des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar stellt die Tatsache dar, dass der Metabolismus dieses Tracers sehr gering ist (LUURTSEMA et al. 2009).

In Bezug auf einen funktionellen Unterschied zwischen *Respondern* und *Non-respondern* konnte festgestellt werden, dass die Tariquidar-Applikation zu einigen Zeitpunkten einen größeren Effekt auf die [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar-Kinetik der *Non-responder* als auf die der *Responder* hatte. Dieser Unterschied war jedoch lediglich zu zwei Zeitpunkten signifikant. Die im Vergleich zu den *Respondern* erhöhten SUV-Werte der *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation stehen im Einklang mit einer früheren Studie, in der Tariquidar zu einer Wiederherstellung der Phenobarbital-Pharmakosensitivität bei *Non-respondern* führte (BRANDT et al. 2006a).

Ein weiterer Tracer, der im Rahmen dieser Studie evaluiert wurde, ist [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin. Phenytoin stellt ein Enzym-induzierendes Antiepileptikum dar (JOHANNESSEN u. LANDMARK 2010), welches zu den Medikamenten der zweiten Wahl zählt und gewöhnlich eingesetzt wird, wenn ein Anfall nach einer oder mehreren Benzodiazepin-Applikationen immer noch nicht kontrolliert werden kann. Der Wirkmechanismus dieses Antiepileptikums besteht in der Reduktion der Regenerationszeit spannungsaktivierter Natriumkanäle (RAJ et al. 2011). Die erhöhte Pgp-Expression in chronisch epileptischen Ratten wurde bereits mit einer signifikanten Reduktion der Gehirnpenetration des Antiepileptikums Phenytoin in Zusammenhang gebracht (POTSCHKA 2010a). Es konnte zudem bereits nachgewiesen werden, dass Phenytoin als Substrat des menschlichen Pgp fungiert (LUNA-TORTOS et al. 2008). Allerdings existiert ebenfalls eine Studie, die basierend auf Untersuchungen an Brust- und Lungenkrebs-Zelllinien zeigte, dass Phenytoin möglicherweise kein Pgp-Substrat darstellt (RIVERS et al. 2008).

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass der Pgp-Hemmstoff Tariquidar die Wirksamkeit des Antiepileptikums Phenytoin in einem chronischen Epilepsiemodell an Ratten steigert. Daher könnte die Kombination dieser beiden Wirkstoffe eine

vielversprechende therapeutische Strategie für pharmakoresistente Epilepsiepatienten darstellen (VAN VLIET et al. 2006).

Die im Rahmen der vorliegenden Studie im Hinblick auf den *Tracer* [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin erhobenen Daten dienen aufgrund der kleinen Gruppengrößen, welche auf die schwierige *Tracer*-Synthese zurückzuführen sind, lediglich als präliminäre Studie. In Bezug auf einen funktionellen Unterschied zwischen *Respondern* und *Non-respondern* schien die Tariquidar-Applikation einen größeren Effekt auf die [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin-Kinetik der *Non-responder* als auf die der *Responder* zu haben (Abb. 20). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, was vermutlich auf die zu kleinen Gruppengrößen zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis unterstützt dennoch jene Studie, in der bereits gezeigt wurde, dass die Tariquidar-Applikation zu einer Steigerung der Wirksamkeit des Phenytoin in einem chronischen Epilepsiemodell an Ratten führt (VAN VLIET et al. 2006). Es werden allerdings weitere Studien mit größeren Tiergruppen nötig sein, um diese präliminäre Studie zu bestätigen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch bereits anhand der vorliegenden Daten darauf hingewiesen werden, dass [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin ein vielversprechendes Radiopharmakon für die nicht-invasive Unterscheidung pharmakoresistenter und pharmakosensitiver Epilepsiepatienten darzustellen scheint.

Der dritte *Tracer*, der im Rahmen dieser Studie evaluiert wurde, ist [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin. Quinidin stellt einen sehr wirksamen Pgp-Hemmstoff dar (WEISS et al. 2003; YU et al. 2007). Allerdings wurde noch nicht abschließend geklärt, ob Quinidin zudem auch als Pgp-Substrat fungiert (KUSUHARA et al. 1997). Bereits durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass Pgp den Effluxtransport des Quinidin über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt, woraus dessen limitierter Eintritt ins Gehirn resultiert (KUSUHARA et al. 1997). Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass Quinidin viele Eigenschaften eines Pgp-Substrats besitzt (hohe Lipophilie, positive Ladung und planare Struktur) und Pgp nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren hemmt (TSUJI et al. 1993). Anhand von *in vitro* Daten konnte bereits gezeigt werden, dass Quinidin selbst als Pgp-Substrat fungiert (FROMM et al. 1999). In niedriger Konzentration besteht die hauptsächliche Funktion des Quinidin jedoch darin, Pgp zu hemmen (FROMM et al. 1999). In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Quinidin bei Menschen die ZNS-Effekte des Wirkstoffs Loperamid verstärkt (SADEQUE et al. 2000). Einer derartigen Validierung der Wirkstoffe mit anderen Hemmstoffen kommt im Hinblick auf den Pgp-Transporter eine große Bedeutung zu, da Pgp mehrere Bindungsstellen für Substrate und Hemmstoffe besitzt

(MARTIN et al. 2000). Im Jahr 1998 wurde bereits eine Studie durchgeführt, in der die PET eingesetzt wurde, um die Verteilung des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin in Hundehirnen zu untersuchen (AGON et al. 1988). Im Rahmen dieser Untersuchungen blieb die Radioaktivität im Gehirn, die durch intravenöse (i.v.) Injektion des Tracers verursacht wurde, stets sehr gering. Daher wurde damals von einer limitierten, diffusions-abhängigen Passage des Tracers über die Blut-Hirn-Schranke ausgegangen (AGON et al. 1988). Analog zu diesem Ergebnis waren die [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidine-Konzentrationen vor Tariquidar-Applikation auch in der vorliegenden Studie sehr gering (Abb. 21). Dennoch waren diese höher als die SUV-Werte, die durch Applikation des derzeit geläufigsten Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil unter ähnlichen experimentellen Bedingungen in einer weiteren Studie erzielt werden konnten (SYVÄNEN et al. 2011). Daher könnte [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin für die Untersuchung der Pgp-Expression und damit die Selektion pharmakoresistenter Epilepsiepatienten geeigneter sein als [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil. Durch Tariquidar-Applikation stieg die Konzentration des Tracers im Gehirn an (Abb. 21). Allerdings war dieser Anstieg geringer als erwartet. Wie bereits erwähnt, stellte sich durch die Analyse der Plasmaprofile des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin heraus, dass der Metabolismus dieses Tracers sehr schnell eintritt. Dadurch wird der Einsatz dieser Substanz als Radiotracer zur Untersuchung der Pgp-Funktion erschwert. Der schnelle Metabolismus des [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin könnte zudem eine Erklärung für den niedrigen Anstieg der Tracer-Konzentration nach Tariquidar-Applikation liefern und sollte daher im Rahmen weiterer Studien genauer untersucht werden.

In Bezug auf einen funktionellen Unterschied zwischen *Respondern* und *Non-respondern* wirkte sich die Tariquidar-Applikation stärker auf die [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin-Kinetik der *Non-responder* als auf die der *Responder* aus (Abb. 22). Dieser Unterschied war zu neun der insgesamt 20 Zeitpunkte signifikant. Analog zu der bereits erwähnten früheren Untersuchung, in der Tariquidar zu einer Wiederherstellung der Phenobarbital-Pharmakosensitivität bei *Non-respondern* führte (BRANDT et al. 2006a), kam es durch Tariquidar auch in der vorliegenden Studie zu einer Aufhebung jener Effekte, die durch die Pgp-Überexpression dieser Tiere verursacht worden waren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die im Hinblick auf den Tracer [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar gewonnen werden konnten, konnte auch bei [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin bereits vor Tariquidar-Applikation eine Erhöhung der SUV-Werte der *Non-responder* im Vergleich zu den *Respondern* festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die bisherigen Forschungsergebnisse, welche mithilfe früherer Studien gewonnen werden konnten, nicht. In diesen Studien, die an zwei verschiedenen Modellen der Pharmakoresistenz durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass es in *Non-respondern* zu einer signifikanten

Überexpression des Pgp kommt (POTSCHKA et al. 2004b; VOLK u. LÖSCHER 2005; VOLK et al. 2006). Diese Aussage war anhand der in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten allerdings nicht reproduzierbar, da die Gruppe der *Responder* vor Tariquidar-Applikation im Vergleich zu den *Non-respondern* keine erhöhten SUV-Werte aufwies. Möglicherweise ist dies auf eine ungenügende Anfallsfrequenz der Tiere an den Tagen vor den PET-Untersuchungen zurückzuführen, da experimentelle Daten darauf hindeuten, dass die Überexpression der *Multidrug*-Transporter ein erworbenes Phänomen mit einer anfallsassoziierten Induktion des Transporters im epileptischen Gehirn darstellt (POTSCHKA 2010d). Diese Annahme wird von dem Ergebnis gestützt, dass im Hinblick auf [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar eine Korrelation zwischen der Anfallsreduktion der Tiere während der Phenobarbitalphase und den SUV-Werten nachgewiesen werden konnte (Abb. 25). Dies verdeutlicht, dass ein Zusammenhang zwischen der Pharmakosensitivität der Tiere und der Transportfunktion des Pgp besteht. In zukünftigen PET-Studien sollte demzufolge eine zusätzliche Überwachung der Anfälle der Tiere vor Beginn der PET-Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Kinetik des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin wurde anhand der Parameter  $K_1$ ,  $V_T$  und dem Plasmaprofil dieses Tracers evaluiert. Für  $K_1$  (Transportrate ins Gehirn in ml/g/min) konnten sowohl in den Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* als auch im Hinblick auf die Kontrolltiere ähnliche Werte nachgewiesen werden. Die  $K_1$ -Werte der *Non-responder* schienen im Vergleich zu den *Respondern* und den Kontrolltieren sowohl vor als auch nach Tariquidar-Applikation minimal erhöht. Dieser geringe Unterschied war allerdings weder vor noch nach Tariquidar-Applikation signifikant. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* hinsichtlich ihrer Pgp-Expression unterscheiden, wobei bei *Non-respondern* eine deutlich gesteigerte Pgp-Expression festgestellt werden konnte (VOLK u. LÖSCHER 2005). Aufgrund dieser Daten stellt der Einstrom des Tracers [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin über die Blut-Hirn-Schranke keinen sensitiven Indikator der individuellen Unterschiede in Bezug auf die Funktion des Pgp dar. Durch die Auswertung dieses Parameters konnte kein signifikanter Unterschied der Pgp-Funktion im Hippocampus zwischen pharmakoresistenten und pharmakosensitiven epileptischen Tieren festgestellt werden (Abb. 15). Wie auch für andere Tracer diskutiert, könnten eventuell vorhandene größere Unterschiede in Bezug auf  $K_1$  allerdings durch die relativ schnelle Penetration des Tracers in das Gehirn vor Tariquidar-Behandlung maskiert worden sein (BARTMANN et al. 2010).

Im Hinblick auf  $V_T$  (Koeffizient der Verteilung zwischen Blut und Gehirn) wies die Tiergruppe der *Non-responder* im Vergleich zu den Gruppen der *Responder* und der Kontrolltiere bereits vor der Tariquidar-Applikation signifikant erhöhte Werte auf. Durch die Tariquidar-Applikation konnte in allen drei Tiergruppen ein signifikanter Anstieg der  $V_T$ -Werte beobachtet werden. Zudem unterschieden sich *Responder* und *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation bezüglich des Parameters  $V_T$  signifikant voneinander (Abb. 16). Da  $V_T$  den Koeffizient der Verteilung des *Tracers* zwischen Blut und Gehirn darstellt, unterstützt die Tatsache, dass die Gruppe der *Non-responder* in der vorliegenden Studie bereits vor Tariquidar-Applikation signifikant erhöhte  $V_T$ -Werte aufwies, die aktuelle Datenlage, welche auf eine Pgp-Überexpression bei *Non-respondern* hinweist (VOLK u. LÖSCHER 2005), nicht. Dagegen könnte jedoch die signifikante Erhöhung der  $V_T$ -Werte der *Non-responder* im Vergleich zu den *Respondern* nach Tariquidar-Applikation darauf hindeuten, dass die Tiergruppen der *Responder* und *Non-responder* tatsächlich verschiedene Pgp-Expressionslevel aufweisen (VOLK u. LÖSCHER 2005). Dies unterstützt die bisherige Datenlage, welche für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Pgp-Überexpression und der Pharmakoresistenz gegenüber Antiepileptika spricht (POTSCHKA 2010d). Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Daten deuten darauf hin, dass  $V_T$  für den *Tracer* [ $^{11}C$ ]Quinidin im Vergleich zu  $K_1$  ein sensitiverer Indikator der individuell verschiedenen Pgp-Funktion ist.

Durch die Analyse des [ $^{11}C$ ]Quinidin-Plasmaprofiles konnte gezeigt werden, dass der Metabolismus dieses *Tracers* sehr schnell stattfindet. Die Tiere aller drei Gruppen wiesen dabei ähnliche Plasma-Pharmakokinetiken auf. Das Plasmaprofil zeigte, dass die Radioaktivität gegen Ende der Untersuchung erneut leicht anstieg. Dies könnte auf eine Metaboliten-Bildung zurückzuführen sein. Die Tariquidar-Applikation führte innerhalb der ersten Minuten bei allen drei Tiergruppen zu einer noch schnelleren Elimination des [ $^{11}C$ ]Quinidin aus dem Plasma. Eine mögliche Ursache dafür könnte die schnellere Verteilung des *Tracers* aufgrund der Pgp-Hemmung darstellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bisherigen Studien, in denen bereits nachgewiesen werden konnte, dass Tariquidar als potenter Pgp-Hemmstoff fungiert (BRANDT et al. 2006a; VAN VLIET et al. 2006).

Als letzter *Tracer* wurde FDG verwendet. Dabei wurden die SUV-Werte jedoch lediglich nach Tariquidar-Applikation bestimmt (Abb. 23). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen *Tracern* wird FDG im Rahmen der PET nicht für die Untersuchung bestimmter Rezeptoren

eingesetzt, sondern stellt vielmehr ein Analogon von Glucose dar, welches als indirekter Marker der neuronalen Aktivität fungiert (LA FOUGERE et al. 2009) und durch dessen Einsatz sowohl die Aufnahme als auch der Metabolismus der Glucose aufgezeigt werden kann (DEDEURWAERDERE et al. 2007). Dabei wird FDG von den Zellen in einer ähnlichen Weise aufgenommen wie Glucose. Im Anschluss daran wird es jedoch nicht metabolisiert, wodurch es in den Zellen eingeschlossen bleibt und eine Abbildung des Glucose-Verbrauchs in den Zellen und Regionen, die von Interesse sind, ermöglicht (DEDEURWAERDERE et al. 2007). Derzeit ist FDG der *Radiotracer*, der in der klinischen Praxis und in der Forschung am häufigsten verwendet wird (DEDEURWAERDERE et al. 2007). PET-Untersuchungen, bei denen der *Tracer* FDG verwendet wird, stellen eine exakte und zuverlässige Methode für die Lokalisation des epileptischen Fokus (LEE u. SALAMON 2009) und der medizinisch refraktären Temporallappenepilepsie dar (O'BRIEN et al. 2001). Im Rahmen der prächirurgischen Evaluation refraktärer Patienten mit partieller Epilepsie wird FDG routinemäßig eingesetzt. In der vorliegenden Studie konnten bei den *Respondern* und *Non-respondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren höhere SUV-Werte für FDG festgestellt werden. Dieser Unterschied war jedoch lediglich zu einem der Zeitpunkte signifikant. Zudem wiesen die *Responder* im Vergleich zu den *Non-respondern* zu diesem Zeitpunkt eine signifikant höhere FDG-Konzentration auf. Da der FDG-Scan nach Tariquidar-Applikation durchgeführt wurde, unterstützt dieses Ergebnis bereits durchgeführte Studien, in denen nachgewiesen werden konnte, dass es in *Non-respondern* zu einer signifikanten Überexpression des Pgp kommt (POTSCHKA et al. 2004b; VOLK u. LÖSCHER 2005; VOLK et al. 2006), nicht.

### *Schlussfolgerung*

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass sowohl [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar als auch [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin vielversprechende *Tracer* für den Nachweis einer gesteigerten Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp darstellen. Bei beiden *Tracern* konnten vor Tariquidar-Applikation höhere SUV-Werte nachgewiesen werden als im Rahmen einer früheren Studie für den derzeit am häufigsten eingesetzten Pgp-*Tracer* [ $^{11}\text{C}$ ]Verapamil (SYVÄNEN et al. 2011). Diese Eigenschaft der *Tracer* ist für deren Einsatz zum Nachweis einer gesteigerten Pgp-Expression von entscheidender Bedeutung, da es durch die Hochregulation des Pgp in pharmakoresistenten Epilepsiepatienten zu einem weiteren Absinken der *Tracer*-Konzentrationen im Gehirn kommt, und *Tracer* mit niedrigen SUV-Werten daher sehr schwer nachgewiesen werden können. Der Metabolismus des [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin, welcher im Gegensatz

zu [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar (LUURTSEMA et al. 2009) sehr schnell eintritt, sollte jedoch in weiterführenden Studien genauer untersucht werden, da dadurch ein Einsatz dieser Substanz als *Tracer* zur Untersuchung der Pgp-Funktion erschwert würde. Aufgrund der zu kleinen Gruppengrößen können die Daten, welche in der vorliegenden Studie hinsichtlich des *Tracers* [ $^{11}\text{C}$ ]Phenytoin erhoben wurden, lediglich als präliminäre Studie dienen. Allerdings weisen die im Rahmen der Anwendung dieses *Tracers* gewonnenen Daten darauf hin, dass es bei der Tiergruppe der *Non-responder* im Vergleich zu der Gruppe der *Responder* zu einer stärkeren Erhöhung der SUV-Werte gekommen ist, was möglicherweise auf eine Überexpression des Pgp bei diesen Tieren zurückgeführt werden kann. Bei den *Tracern* [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar und [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin konnten zu bestimmten Zeitpunkten ebenfalls Unterschiede der SUV-Werte zwischen *Respondern* und *Non-respondern* festgestellt werden, wobei die Tiergruppe der *Non-responder* nach Tariquidar-Applikation höhere SUV-Werte aufwies als die Gruppe der *Responder*. Dieses Ergebnis unterstützt bereits durchgeführte Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass es in pharmakoresistenten Tieren (*Non-responder*) zu einer Überexpression des Pgp kommt (POTSCHKA et al. 2004b; VOLK u. LÖSCHER 2005; VOLK et al. 2006). Allerdings konnte im Hinblick auf die [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidin- und [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar-Scans zudem festgestellt werden, dass dieser Unterschied zu einigen Zeitpunkten bereits vor Tariquidar-Applikation bestand. Daher können die bereits erwähnten Studien (POTSCHKA et al. 2004b; VOLK u. LÖSCHER 2005; VOLK et al. 2006), welche zeigten, dass es in *Non-respondern* zu einer signifikanten Überexpression des Pgp und damit zu einem vermehrten Efflux-Transport an der Blut-Hirn-Schranke kommt, durch dieses Ergebnis nicht in allen Punkten bestätigt werden.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung weisen sowohl der signifikante Unterschied der Pgp-Expression zwischen stimulierten Tieren und Kontrolltieren als auch die signifikante Korrelation der immunhistochemisch Pgp-markierten Fläche und der Anfallsfrequenz der Tiere analog zu früheren Studien darauf hin, dass die Anfallsaktivität der Epilepsiepatienten eine gesteigerte Pgp-Expression verursacht (SEEGERS et al. 2002b; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Dennoch werden weitere Studien nötig sein, da es sich bei der Pharmakoresistenz der Epilepsiepatienten um einen multifaktoriellen Prozess handelt, der bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Die PET-Untersuchung, bei der die Pgp-Funktion *in vivo* dargestellt werden kann, ist jedoch eine bedeutende Methode zur Selektion pharmakoresistenter Epilepsiepatienten. Durch die PET kann der Pgp-vermittelte Effluxtransport an der Blut-Hirn-Schranke in Individuen dargestellt werden, wodurch die Identifikation jener Patienten, bei denen eine Pgp-Überexpression zur Pharmakoresistenz

führt (BARTMANN et al. 2010) und die von einer Behandlung mit Pgp-modulierenden Arzneimitteln profitieren würden (MAIRINGER et al. 2011), ermöglicht wird. Der Evaluierung neuer *Tracer* zur Darstellung des Pgp, welche sich unter anderem aufgrund der Überlagerung der Substrate mit anderen Effluxtransportern sehr schwierig gestaltet (MAIRINGER et al. 2011), sollte demzufolge aufgrund der großen Bedeutung dieser Methode im Rahmen zukünftiger Studien weiterführend nachgegangen werden.

## 2. Prüfung der Wirksamkeit des Peptidmimetikums Cintrofin

Da Pharmakoresistenz ein bislang nicht zu überwindendes Phänomen darstellt, wäre die Möglichkeit einer Prävention der Epilepsieerkrankung wünschenswert. Die Unterbindung der Epileptogenese, z.B. nach einem Schädel-Hirn-Trauma, stellt im Jahr 2011 allerdings nach wie vor eine bisher ungelöste medizinische Herausforderung dar (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011). Der Begriff „Epileptogenese“ bezieht sich dabei auf einen dynamischen Prozess, der die neuronale Erregbarkeit modifiziert und möglicherweise komplizierte Strukturveränderungen erfordert, bevor es zum Auftreten der ersten spontanen Anfälle kommt (ENGEL 2005). Die strukturellen Veränderungen können dabei Neurodegeneration, Neurogenese, Gliose, Nervenverletzungen, das Einsprossen einzelner Nerven, die Plastizität der Dendriten, Schäden an der Blut-Hirn-Schranke, eine Reorganisation der extrazellulären Matrix sowie eine Reorganisation der molekularen Architektur der einzelnen Neurone umfassen (LUKASIUK 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt stellen die genetische Beratung und die Vermeidung der primären Verletzung, die zur Epileptogenese führt, die effizientesten Möglichkeiten dar, um eine Epileptogenese zu verhindern (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011). Aufgrund der sozialen Belastung, der hohen Behandlungskosten und des zwei- bis dreifach erhöhten Risikos von Todesfällen bei Epilepsiepatienten besteht ein dringender Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten, welche die Ausbildung der Epilepsieerkrankung bei Risikopatienten verhindern (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011). Da eine Epilepsieerkrankung mit verschiedenen Komorbiditäten, wie beispielsweise einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses oder einer emotionalen Störung, verbunden ist, stellt die Modifikation solcher Komorbiditäten einen Aspekt dar, der in einer Studie zum Thema Antiepileptogenese ebenfalls überprüft werden sollte (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011). Eine Region, die besonders in die Leistungen des Gedächtnisses involviert ist, stellt der Hippocampus dar. Dieser ist besonders anfällig für neurodegenerative Prozesse. Daher

werden Versuche, die dazu beitragen, die adulte hippocampale Neurogenese zu modulieren, im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Epilepsie als vielversprechender therapeutischer Ansatz angesehen (CHOHAN et al. 2009). Einen solchen Ansatzpunkt stellt die Anwendung neurotropher Faktoren dar (FRIELINGSDORF et al. 2007; HENRY et al. 2007), zu denen unter anderem CNTF zählt. Aufgrund seiner Nebenwirkungen (Anorexie, Muskelschwund, Hyperalgesie, Krämpfe, Muskelschmerzen) konnte CNTF bisher jedoch nicht klinisch eingesetzt werden (BLANCHARD et al. 2010). Durch die Verwendung eines CNTF-mimetischen Peptids können sowohl die Kinetik als auch die Stabilität und die Gehirngängigkeit des Peptids verbessert werden. Der Einsatz des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin könnte demnach eine erfolgversprechende neue Strategie zur Modulation anfallsinduzierter, neuronaler Veränderungen im epileptischen Gehirn darstellen.

Wie bereits im Jahr 2003 beschrieben (BRANDT et al. 2003), entwickelte auch in der vorliegenden Studie die Mehrzahl der Tiere infolge der Dauerstimulation einen sich selbst erhaltenden Status epilepticus (SSSE). Während der anhaltenden Anfallsaktivität werden eine Vielzahl akuter neuroplastischer Veränderungen induziert, die unter anderem neurodegenerative Prozesse mit einschließen (BRANDT et al. 2003). Die Cintrofin-Behandlung beeinflusste weder die Anfallsfrequenz noch die mittlere Anfallsdauer der Tiere (Kap. V.2.2). Daher ist anzunehmen, dass Cintrofin keinen antiepileptogenen Effekt besitzt.

Die Untersuchungen zu angstassoziiertem Verhalten und lokomotorischer Aktivität fanden in den Verhaltensparadigmen *Open Field* und *Elevated Plus Maze* statt. Dabei konnte bei den epileptischen Tieren eine Reduktion des angstassoziierten Verhaltens festgestellt werden, die durch die Cintrofin-Behandlung zusätzlich verstärkt wurde (Abb. 30 und Abb. 31). In beiden Paradigmen konnte zudem eine gesteigerte lokomotorische Aktivität der epileptischen Tiere nachgewiesen werden (Abb. 30 und Abb. 31). Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Studien, in denen sowohl anhand eines genetischen Tiermodells (MCINTYRE u. GILBY 2007; GILBY 2008) als auch mithilfe eines elektrisch induzierten SE (BRANDT et al. 2006b) bereits dieselben Daten gewonnen werden konnten. In der vorliegenden Studie könnte die Verhaltensänderung der Tiere daher vielmehr auf ein Hyperaktivitätssyndrom hinweisen, als auf eine Reduktion des angstassoziierten Verhaltens. Dieses Syndrom tritt bei epileptischen Humanpatienten häufig auf (KONESKI u. CASELLA 2010; PARISI et al. 2010). Zum jetzigen Zeitpunkt liegen im Hinblick auf die Epilepsiemodelle der Nager jedoch keine ausführlichen Untersuchungen dieses Hyperaktivitätssyndroms vor. Daher werden weitere

Studien nötig sein, um die komplexen Veränderungen des Verhaltens im post-SE Modell besser interpretieren zu können.

Die Untersuchung zur Lern- und Gedächtnisleistung, die mithilfe des *Morris Water Maze* durchgeführt wurde, wies auf eine kognitions-modifizierende Wirkung des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin hin (Abb. 33 und Abb. 35). Dieser positive Effekt auf kognitive Defizite konnte in vorherigen Studien bereits für die CNTF Peptide 6 und 6c gezeigt werden (CHOHAN et al. 2009; BLANCHARD et al. 2010), die ebenfalls die Leistungen der Tiere in dem Verhaltensparadigma *Morris Water Maze* verbesserten. Zudem konnte in mehreren früheren Studien gezeigt werden, dass die subchronische oder chronische Behandlung mit dem neurotrophen Faktor CNTF sich positiv auf das räumliche Lernvermögen auswirkt. Dabei erfolgte entweder eine genetische Manipulation der Tiere (EMERICH et al. 1997a; EMERICH et al. 1997b) oder eine intraventrikuläre Applikation des neurotrophen Faktors (KUMON et al. 1996). Im Rahmen dieser Studien schwächte CNTF sowohl in einem Tiermodell fokaler zerebraler Ischämie als auch in einem Tiermodell der Huntington Krankheit die kognitive Beeinträchtigung der Versuchstiere ab. In einer weiteren Studie, bei der ein Tiermodell der Alzheimer-Erkrankung eingesetzt wurde, führte der Einsatz rekombinanter, CNTF-produzierender Zellen zu einer vollständigen Wiederherstellung der kognitiven Funktionen (GARCIA et al. 2010). Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit im Hinblick auf die Auswirkungen des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin auf Lern- und Gedächtnisleistungen gewonnen wurden, stehen daher im Einklang mit den bereits erhobenen Daten. Zudem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass bereits eine kurzzeitige Behandlung mit Cintrofin einen positiven Langzeit-Effekt auf Epilepsie-assoziierte, kognitive Beeinträchtigungen besitzt (Abb. 33 und Abb. 35). Des Weiteren bestätigen die Daten, dass der positive Effekt des ursprünglichen CNTF auf die Lern- und Gedächtnisleistungen der Tiere durch die Herstellung des mimetischen Peptids Cintrofin nicht verloren gegangen ist. Aufgrund der Vielzahl neuroplastischer Veränderungen, die durch CNTF verursacht werden können, kann man jedoch aus der Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleistungen in dieser Studie keine Schlussfolgerung im Hinblick auf den verantwortlichen Mechanismus ziehen.

In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass CNTF als endogener Modulator der hippocampale Neurogenese agiert, indem es sowohl die Zellproliferation als auch die neuronale Differenzierung steigert (EMSLEY u. HAGG 2003). Aufgrund dieser Datenlage wurde im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht, ob das CNTF-mimetische

Peptid Cintrofin Epilepsie-assoziierte Veränderungen der hippocampalen Neurodegeneration und Neurogenese beeinflusst.

Analog zu bereits existierenden Daten (BRANDT et al. 2003) konnte in der vorliegenden Studie anhand eines Score-Systems nachgewiesen werden, dass ein elektrisch induzierter generalisierter SSSE mit einer Degeneration neuronaler Zellen sowohl in den CA<sub>3a</sub>- und CA<sub>3c</sub>- Regionen als auch im piriformen Cortex einhergeht (Abb. 36). Es konnte jedoch kein neuroprotektiver Effekt des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin festgestellt werden (Abb. 36 und Abb. 37). In bisherigen Studien wurde allerdings sowohl *in vitro* (CHEN et al. 2007; BELSHAM et al. 2009; CHEN et al. 2010) als auch *in vivo* (NAUMANN et al. 2003; CHEN et al. 2010) ein neuroprotektiver Effekt des ursprünglichen CNTF postuliert.

Wie bereits wiederholt beschrieben (PARENT u. MURPHY 2008; SCHARFMAN u. MCCLOSKEY 2009), steigert ein Status epilepticus die Zellproliferation und die Anzahl neugeborener Neurone während der ersten dem Status epilepticus folgenden Tage. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Injektion von CNTF in das Vordergehirn bei Mäusen zu einer gesteigerten Anzahl BrdU-positiver Zellen führt (EMSLEY u. HAGG 2003).

Die Cintrofin-Behandlung hatte in der vorliegenden Studie keinen Effekt auf die Zellproliferation, die neuronale Differenzierung und das Überleben jener Neurone, die fünf bis neun Tage nach Induktion des Status epilepticus (akute Neurogenese) generiert wurden. Die Auswertung der Doublecortin-Färbung, die dreizehn Wochen nach Statusinduktion erfolgte, ergab, dass die Cintrofin-Behandlung einen Langzeit-Effekt (chronische Neurogenese) auf die Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen hatte. Cintrofin führte bei den SE-Tieren zu einer Proliferationsrate und Neuroblasten-Bildung, die derjenigen der Kontrolltiere glich (Abb. 38). In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass die Anfallsaktivität bei den Versuchstieren zu einer Veränderung der basalen Dendriten während des Neuritenwachstums führt, wodurch es zu einer Persistenz der in den Hilus reichenden basalen Dendriten kommt (BUCKMASTER u. DUDEK 1999; SHAPIRO et al. 2008). In der vorliegenden Studie verhinderte die Cintrofin-Behandlung die Persistenz der basalen Dendriten (Abb. 39). Dies lässt vermuten, dass Cintrofin sowohl die normale Entwicklung als auch das normale Wachstum der neu gebildeten Dendriten in Richtung der Molekularschicht des Gyrus Dentatus fördert. Aufgrund der Hypothese, dass persistierende basale Dendriten eine prokonvulsive, strukturelle Netzwerkveränderung darstellen, die die Entstehung und Ausbreitung der epileptischen Anfälle unterstützt (FRANCK et al. 1995; VON CAMPE et al. 1997), ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung. Die Tatsache, dass die Cintrofin-

Behandlung zwar die Anzahl persistierender basaler Dendriten herabsetzte, zugleich jedoch keinen Effekt auf die Entwicklung spontan wiederkehrender Anfälle hatte, stützt die Hypothese, dass hilare basale Dendriten zu einer Übererregbarkeit des epileptischen Gehirns beitragen, nicht.

Frühere Studien zeigten, dass CNTF die Aktivierung der Mikroglia-Zellen beeinflusst (KRADY et al. 2008; LEE et al. 2009). Zudem wiesen weitere Studien nach, dass CNTF die Reifung der Oligodendrozyten, die ebenfalls zu den Gliazellen zählen, fördert (STANKOFF et al. 2002). Aufgrund dieser Datenlage wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob die Behandlung mit Cintrofin einen Langzeit-Effekt auf die Aktivierung der Mikroglia-Zellen besitzt. Dreizehn Wochen nach Statusinduktion konnte in mehreren Regionen des Hippocampus bei allen stimulierten Tieren ein Anstieg der Anzahl aktivierter Mikroglia-Zellen festgestellt werden (Abb. 41). Die Cintrofin-Behandlung, die kurz nach Induktion des Status epilepticus erfolgte, hatte keinen durchgängigen, klar erkennbaren Effekt auf die Anzahl ED1-positiver Mikroglia-Zellen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Langzeit-Effekt des mimetischen Peptids auf die neuronalen Vorläuferzellen mit Veränderungen im Bereich der Mikroglia-Zellen in Zusammenhang steht. Bei den Kontrolltieren kam es durch die Cintrofin-Behandlung im Vergleich zu *reversed peptide* behandelten Kontrolltieren zu einer Aktivierung von Mikroglia-Zellen. Dieser Effekt auf die Anzahl aktivierter Mikroglia-Zellen der Cintrofin behandelten Kontrolltiere war jedoch lediglich in der CA<sub>3c</sub>-Region signifikant (Abb. 41). Die Ergebnisse unterstützen bereits existierende *in vitro* Studien, die Effekte von CNTF auf die Aktivität der Mikroglia-Zellen beschreiben (KRADY et al. 2008; LEE et al. 2009). Des Weiteren bestätigen die gewonnenen Daten, dass Cintrofin bestimmte Sequenzen des CNTF enthält, welche die Effekte des mimetischen Peptids auf die Anzahl aktivierter Mikroglia-Zellen verursachen.

### *Schlussfolgerung*

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das CNTF-mimetische Peptid Cintrofin in der Lage ist, Epileptogenese-assoziierte Veränderungen der neuronalen Vorläuferzellen zu verhindern und Lern- und Gedächtnisleistungen positiv zu beeinflussen. Durch den Nachweis dieser Effekte konnte bestätigt werden, dass Cintrofin essentielle Eigenschaften des ursprünglichen CNTF besitzt. Daher kann Cintrofin als vielversprechende krankheitsmodifizierende Substanz angesehen werden, die in Zukunft die Erforschung des CNTF für den therapeutischen Einsatz bei vielen ZNS-Erkrankungen ersetzen könnte. Cintrofin stellt somit eine bedeutende Alternative zu den Methoden der genetischen

Manipulation, der viralen Vektoren oder anderen lokalen Applikationen, die im Rahmen der Erforschung des CNTF bisher entwickelt wurden (EMERICH et al. 1997a; EMERICH et al. 1997b; HERMANN et al. 2001; NKANSAH et al. 2008; HELLSTROM et al. 2011), dar. Der große Vorteil der systemischen Applikation des Peptids besteht darin, dass diese Methode jegliche invasive Herangehensweise, die stets Risiken mit sich bringt, vermeidet. Aufgrund seiner neuroprotektiven Effekte wird CNTF als vermeintliches Therapeutikum für verschiedene neurodegenerative ZNS-Erkrankungen wie Huntington's Krankheit, Morbus Parkinson oder amyotrophe Lateralsklerose angesehen (KORDOWER et al. 1999; APFEL 2001; BEURRIER et al. 2010). In der vorliegenden Studie konnte jedoch kein neuroprotektiver Effekt des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Cintrofin nicht die hierfür relevanten Sequenzen des CNTF enthält. Die vorliegenden Ergebnisse könnten jedoch auch auf Unterschiede zwischen den Tiermodellen und Behandlungsschemata, wie beispielsweise den Beginn der Cintrofin-Behandlung nach Statusinduktion vs. vor Statusinduktion, zurückzuführen sein. Des Weiteren wurde die Cintrofin-Dosierung analog zu früheren Studien, in denen mimetische Peptide untersucht wurden (SECHER et al. 2006; KLEMENTIEV et al. 2007; KLEMENTIEV et al. 2008; PANKRATOVA et al. 2010), gewählt. Bisher liegen keine Daten zur Pharmakokinetik von Cintrofin vor. Daher werden weitere Studien nötig sein, um die Kinetik und die daraus resultierende Dosierung dieses mimetischen Peptids genauer untersuchen zu können. Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Studie durch die positiven Effekte von Cintrofin auf Epileptogenese-assoziierte Veränderungen der neuronalen Vorläuferzellen sowie Lern- und Gedächtnisleistungen, dass Cintrofin aktive Sequenzen von CNTF umfasst. Obwohl die Daten gegen einen antiepileptogenen Effekt des mimetischen Peptids sprechen, unterstützen sie doch einen krankheitsmodifizierenden Effekt des Cintrofin.

## VII. Zusammenfassung

Vera Rußmann

### **Untersuchungen in einem Post-Status epilepticus-Modell:**

### **Evaluierung eines positronen-emissions-tomographischen Verfahrens und Prüfung des Peptidmimetikums Cintrofin**

Rezidivierende Anfallserkrankungen stellen bei Hunden und Katzen ein bekanntes neurologisches Problem dar. Zudem leiden weltweit derzeit etwa 50 Millionen Menschen an aktiver Epilepsie mit wiederkehrenden spontanen Anfällen. Die Therapie der Erkrankung erfordert in der Regel eine lebenslange Applikation von Antiepileptika. Allerdings kann sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin bei mehr als 30% der therapiebedürftigen Epilepsiepatienten trotz sorgfältiger Auswahl der Therapieschemata keine zufriedenstellende Kontrolle der Anfallsaktivität erreicht werden. Für die Betroffenen ist die nicht ausreichende Anfallskontrolle in der Regel sowohl mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität als auch einem erhöhten Risiko für Begleiterkrankungen, Verletzungen oder plötzliche Todesfälle verbunden. Zudem kann jedoch auch die Lebensqualität jener Patienten, bei denen eine erfolgreiche Anfallskontrolle möglich ist, durch die Nebenwirkungen der Antiepileptika sehr stark eingeschränkt werden. Dies ist sowohl bei den Veterinär- als auch bei den Humanpatienten der Fall. Aufgrund der individuellen Belastung betroffener Patienten, aber auch angesichts der sozioökonomischen Bedeutung der Erkrankung, wären sowohl eine Methode zur Überwindung der Pharmakoresistenz als auch Möglichkeiten einer Prävention der Epilepsieentstehung wünschenswert.

Vor allem im Hinblick auf die Temporallappenepilepsie stellt die Pharmakoresistenz sowohl für die Veterinär- als auch die Humanmediziner ein schwerwiegendes Problem dar, da hierbei bis zu 80% der Patienten refraktär gegenüber Antiepileptika sind. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass es sich bei der Pharmakoresistenz um ein komplexes multifaktorielles Problem handelt. In den vergangenen Jahren wurden bereits mehrere Hypothesen formuliert, die sich mit den zugrundeliegenden Resistenzmechanismen beschäftigen. Als eine mögliche Ursache für das Auftreten von Pharmakoresistenzen bei Epilepsiepatienten wird die Überexpression sogenannter *Multidrug*-Transporter diskutiert, welche sich an der Blut-Hirn-Schranke befinden und dort den aktiven Transport in Richtung des kapillären Lumens vermitteln. Durch die Überexpression dieser Transporter kommt es bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten zu einem erhöhten Rücktransport der applizierten Antiepileptika in die Blutbahn. Dadurch kann trotz ausreichender Plasma-Konzentration des eingesetzten

Antiepileptikums keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Bereich des epileptischen Fokus erreicht werden. Dem *Multidrug*-Transporter P-Glykoprotein (Pgp) wird im Zusammenhang mit dem Auftreten pharmakoresistenter Epilepsien eine besondere Bedeutung zugeschrieben. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in einem Post-Status epilepticus-Modell durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Radiopharmaka im Rahmen einer PET-Untersuchung auf ihre Eignung zur Darstellung der Pgp-Funktion untersucht. Durch ein Radiopharmakon, welches die Darstellung der Pgp-Funktion in der nuklearmedizinischen Diagnostik ermöglicht, könnten die an der Pharmakoresistenz beteiligten Mechanismen genauer untersucht werden und in Zukunft jene Patienten identifiziert werden, die von einer Behandlung mit Pgp-modulierenden Arzneimitteln profitieren würden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die *Tracer* [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidine und [ $^{11}\text{C}$ ]Laniquidar geeignete *Tracer* zur Untersuchung der Pgp-Funktion darstellen, die jedoch im Rahmen weiterer Studien noch genauer untersucht werden müssen. Durch die signifikante Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelphase und der immunhistochemisch quantifizierten Expression des *Multidrug*-Transportes Pgp konnte ferner die Hypothese bestärkt werden, dass die gesteigerte Pgp-Expression bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten eine Konsequenz der unkontrollierten Anfälle darstellt.

Die Mehrzahl der Epilepsieerkrankungen wird durch symptomatische Ursachen, wie beispielsweise Schädelhirntraumen oder Schlaganfälle, bedingt. Bei diesen sogenannten symptomatischen (strukturell metabolischen) Epilepsien scheint die Generierung eines übererregbaren epileptischen Netzwerks die Folge multipler molekularer und zellulärer Veränderungen in den Gehirnregionen zu sein. Durch Modulation dieser Veränderungen in der frühen Phase nach der initialen Gehirnschädigung könnten wesentliche Prozesse der Epilepsieentstehung unterbrochen und die Entstehung bzw. Ausprägung der Epilepsie verhindert werden. Insbesondere aufgrund der hohen Anzahl pharmakoresistenter Epilepsiepatienten wäre eine prophylaktische, antiepileptogene Therapie, welche die Entstehung der Epilepsieerkrankung verhindert, wünschenswert. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen dienten dazu, das Potential des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin sowohl im Hinblick auf einen möglichen antiepileptogenen Effekt als auch auf die Modulation Epilepsie-assoziiierter Verhaltensänderungen und kognitiver Defizite zu evaluieren. In diversen Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, dass CNTF eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuronaler Zellen zukommt, indem es

trophische Wirkungen auf parasympathische, sympathische und sensorische Neurone entfaltet. In der vorliegenden Studie wurden die Effekte des CNTF-mimetischen Peptids Cintrofin auf anfallsinduzierte, neuroplastische Veränderungen im Rahmen eines Post-Status epilepticus-Modells untersucht. In bisherigen Forschungsarbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass Cintrofin die neuronale Differenzierung steigert und *in vitro* das Überleben von Neuronen fördert. Im Zusammenhang mit der Epilepsieerkrankung weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf einen krankheitsmodifizierenden Effekt des Cintrofin hin. Eine Behandlung mit Cintrofin verstärkte die Reduktion des angstassoziierten Verhaltens und verbesserte die Lern- und Gedächtnisleistungen. Zudem konnte bei den Status epilepticus-Tieren ein Langzeit-Effekt der Cintrofin-Behandlung auf die Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen sowie eine reduzierte Manifestation persistierender basaler Dendriten nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Kontrolltiere kam es durch die Cintrofin-Behandlung zu einer vermehrten Aktivierung von Mikroglia-Zellen. Allerdings konnte kein neuroprotektiver Effekt des Cintrofin festgestellt werden. Weitere Studien werden daher nötig sein, um zu überprüfen, ob dieser fehlende neuroprotektive Effekt auf die Sequenz oder die Dosierung des Cintrofin zurückzuführen ist.

Somit ist es mit der vorliegenden Dissertation gelungen, sowohl neuartige *Tracer* für eine vielversprechende bildgebende Methode zur Identifizierung pharmakoresistenter Epilepsiepatienten zu evaluieren als auch ein krankheitsmodifizierendes mimetisches Peptid zu finden.

## VIII. Summary

Vera Rußmann

### **Research in a post-status epilepticus model:**

#### **evaluation of a positron emission tomographic imaging method and validation of the peptide mimetic Cintrofin**

Epilepsies are a well known neurological problem in dogs and cats. Likewise, about 50 million people worldwide suffer from active epilepsy, a disorder characterized by spontaneous seizures. The pharmacotherapy of epilepsy requires a lifelong administration of antiepileptic drugs. However, in both veterinary and human medicine pharmacotherapeutic success cannot be achieved in 30% of epileptic patients. Insufficient control of epileptic seizures is associated with a severe reduction in quality of life as well as an increased risk of comorbidities, injuries and sudden death. Moreover, chronic lifelong administration of antiepileptic drugs is often followed by serious side effects that can even affect the quality of life of pharmacoresponsive patients. Due to the individual burden of epileptic patients and the socio-economic burden, a method to overcome pharmacoresistance as well as possibilities to prevent epileptogenesis would be desirable for the future.

As mentioned previously, drug resistance is a major concern in epilepsy treatment particularly in the temporal lobe epilepsy with up to 80% of patients being unresponsive to antiepileptic drugs. Pharmacoresistance is a complex multifactorial problem. In recent years, several hypotheses addressed the underlying mechanisms of pharmacoresistance. The overexpression of multidrug transporters is discussed as a putative reason for pharmacoresistance in epileptic patients. These transporters are located at the blood-brain barrier where they mediate the active transport into the lumen of the capillaries. In pharmacoresistant patients overexpression of these transporters can cause an increased efflux transport of antiepileptic drugs. As a result, an adequate drug concentration cannot be reached in the epileptic focus despite therapeutic plasma concentrations of the antiepileptic drug. The multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp) seems to be the most important one in association with pharmacoresistance in epilepsy. Therefore, it was tested by PET investigations whether different radiopharmaceuticals are suitable for imaging Pgp function in a post-status epilepticus model. A radiopharmaceutical, which allows imaging of Pgp function in the nuclear medical diagnostics, might be used to study the underlying mechanisms of pharmacoresistance. Moreover, in the future those patients, who would benefit from treatment with Pgp-modulating drugs, might be identified with a respective imaging technique. According to the present results [ $^{11}\text{C}$ ]Quinidine and

$[^{11}\text{C}]Laniquidar$  are suitable tracers for the evaluation of the Pgp function. However, further studies will be necessary to elucidate the exact mechanisms of the aforementioned compounds. Moreover, the significant correlation between the seizure frequency of the animals during the vehicle phase and the immunohistochemically detected expression of the multidrug transporter Pgp supports the hypothesis that the increased Pgp expression in pharmaco-resistant epileptic patients is a consequence of uncontrolled seizures.

The majority of epilepsies is caused by symptomatic reasons like head traumas or strokes. In these cases the development of a hyperexcitable epileptic network seems to be a result of multiple molecular and cellular changes in the affected brain regions. Modulating these changes in the early phase after an initial brain injury might interrupt mechanisms of epileptogenesis and thereby prevent the development of epilepsy. Thus, a prophylactic antiepileptogenic therapy which averts epileptogenesis is of utmost interest. Recent studies demonstrated that CNTF plays an important role in the development of neuronal cells based on its trophic effects on parasympathetic, sympathetic and sensory neurons. One aim of this doctoral thesis was to evaluate the antiepileptogenic and disease-modifying potential of the CNTF-derived peptide mimetic Cintrofin and its impact on epilepsy-associated behavioural changes and cognitive deficits. The present study focussed on the impact of the CNTF-derived peptide mimetic Cintrofin on seizure-induced neuroplastic changes. Recent findings demonstrated that Cintrofin increases neuronal differentiation and promotes the survival of neurons *in vitro*. With regard to epilepsy, the results of the present study indicate that Cintrofin has a disease-modifying effect. In a post-status epilepticus model Cintrofin increased the reduction of anxiety-associated behaviour and improved learning and memory in a spatial learning paradigm. Furthermore, it was demonstrated that the treatment with Cintrofin resulted in a long-term effect on the number of neuronal progenitor cells and a reduced persistence of basal dendrites in status epilepticus-animals. With regard to the control animals Cintrofin treatment led to an increased activation of microglial cells. Moreover, Cintrofin did not show any neuroprotective effect. Further studies will be necessary to investigate whether the missing neuroprotective effect is due to the sequence or the dosage of Cintrofin.

In conclusion, the present study managed to find a disease-modifying peptide mimetic as well as to evaluate novel tracers for a promising imaging method to identify pharmaco-resistant epileptic patients.

## IX. Literaturverzeichnis

ABBOTT, N. J., A. A. PATABENDIGE, D. E. DOLMAN, S. R. YUSOF u. D. J. BEGLEY (2010):

Structure and function of the blood-brain barrier.  
Neurobiol Dis 37, 13-25

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

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

ADLER, R., K. B. LANDA, M. MANTHORPE u. S. VARON (1979):

Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons.  
Science 204, 1434-1436

AGON, P., R. BRAECKMAN, D. VAN HAVER, H. DENUTTE, P. GOETHALS, H.

DONCHE, F. VERMEULLEN, J. DEMAN u. J. M. KAUFMAN (1988):

Drug distribution in dog brain studied by positron emission tomography.  
Biopharm Drug Dispos 9, 567-577

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

AKAMATSU, N. u. S. TSUJI (2011):

[Deep brain stimulation for epilepsy].  
Brain Nerve 63, 365-369

AKIRA, S., Y. NISHIO, M. INOUE, X. J. WANG, S. WEI, T. MATSUSAKA, K.

YOSHIDA, T. SUDO, M. NARUTO u. T. KISHIMOTO (1994):

Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway.  
Cell 77, 63-71

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

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.  
J Comp Neurol 124, 319-335

AMBROZIAK, K., K. KUTEYKIN-TEPLYAKOV, C. LUNA-TORTOS, M. AL-FALAH, M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2010):

Exposure to antiepileptic drugs does not alter the functionality of P-glycoprotein in brain capillary endothelial and kidney cell lines.  
Eur J Pharmacol 628, 57-66

- APFEL, S. C. (2001):  
Neurotrophic factor therapy--prospects and problems.  
*Clin Chem Lab Med* 39, 351-355
- 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
- BAKER, G. A., J. TAYLOR u. A. P. ALDENKAMP (2011):  
Newly diagnosed epilepsy: Cognitive outcome after 12 months.  
*Epilepsia*
- BALTES, S., M. FEDROWITZ, C. L. TORTOS, H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2007a):  
Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays.  
*J Pharmacol Exp Ther* 320, 331-343
- BALTES, S., A. M. GASTENS, M. FEDROWITZ, H. POTSCHKA, V. KAEVER u. W. LÖSCHER (2007b):  
Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein.  
*Neuropharmacology* 52, 333-346
- BANKSTAHL, J. P., M. BANKSTAHL, C. KUNTNER, J. STANEK, T. WANEK, M. MEIER, X. Q. DING, M. MULLER, O. LANGER u. W. LÖSCHER (2011):  
A Novel Positron Emission Tomography Imaging Protocol Identifies Seizure-Induced Regional Overactivity of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier.  
*J Neurosci* 31, 8803-8811
- BANKSTAHL, J. P., K. HOFFMANN, K. BETHMANN u. W. LÖSCHER (2008):  
Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain.  
*Neuropharmacology* 54, 1006-1016
- BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LÖSCHER (1995):  
Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.  
*Eur J Pharmacol* 286, 167-175
- BARTMANN, H., C. FUEST, C. LA FOUGERE, G. XIONG, T. JUST, J. SCHLICHTIGER, P. WINTER, G. BONING, B. WANGLER, A. PEKCEC, J. SOERENSEN, P. BARTENSTEIN, P. CUMMING u. H. POTSCHKA (2010):  
Imaging of P-glycoprotein-mediated pharmacoresistance in the hippocampus: proof-of-concept in a chronic rat model of temporal lobe epilepsy.  
*Epilepsia* 51, 1780-1790

- BAUER, F., C. KUNTNER, J. P. BANKSTAHL, T. WANEK, M. BANKSTAHL, J. STANEK, S. MAIRINGER, B. DORNER, W. LÖSCHER, M. MULLER, T. ERKER u. O. LANGER (2010):  
Synthesis and in vivo evaluation of [<sup>11</sup>C]tariquidar, a positron emission tomography radiotracer based on a third-generation P-glycoprotein inhibitor.  
*Bioorg Med Chem* 18, 5489-5497
- BAZAN, J. F. (1991):  
Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold.  
*Neuron* 7, 197-208
- BELSHAM, D. D., L. J. FICK, P. S. DALVI, M. L. CENTENO, J. A. CHALMERS, P. K. LEE, Y. WANG, D. J. DRUCKER u. M. M. KOLETAR (2009):  
Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons.  
*FASEB J* 23, 4256-4265
- BEN-ARI, Y. (1985):  
Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy.  
*Neuroscience* 14, 375-403
- BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010):  
Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009.  
*Epilepsia* 51, 676-685
- BEURRIER, C., M. FAIDEAU, K. E. BENNOUAR, C. ESCARTIN, L. KERKERIAN-LE GOFF, G. BONVENTO u. P. GUBELLINI (2010):  
Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake.  
*PLoS One* 5, e8550
- BLANCHARD, J., M. O. CHOCHAN, B. LI, F. LIU, K. IQBAL u. I. GRUNDKE-IQBAL (2010):  
Beneficial effect of a CNTF tetrapeptide on adult hippocampal neurogenesis, neuronal plasticity, and spatial memory in mice.  
*J Alzheimers Dis* 21, 1185-1195
- BLESSING, C., U. FEINE, L. GEIGER, M. CARL, G. RASSNER u. G. FIERLBECK (1995):  
Positron emission tomography and ultrasonography. A comparative retrospective study assessing the diagnostic validity in lymph node metastases of malignant melanoma.  
*Arch Dermatol* 131, 1394-1398
- BLUMENFELD, H. (2011):  
New strategies for preventing epileptogenesis: Perspective and overview.  
*Neurosci Lett*

- BOULTON, T. G., N. STAHL u. G. D. YANCOPOULOS (1994):  
Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors.  
*J Biol Chem* 269, 11648-11655
- BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LÖSCHER (2006a):  
The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy.  
*Neurobiol Dis* 24, 202-211
- BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LÖSCHER (2006b):  
Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.  
*Neuropharmacology* 51, 789-804
- BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCSKA, H. VOLK u. W. LÖSCHER (2003):  
Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.  
*Epilepsy Res* 55, 83-103
- BREEDVELD, P., J. H. BEIJNEN u. J. H. SCHELLENS (2006):  
Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs.  
*Trends Pharmacol Sci* 27, 17-24
- BRODIE, M. J. u. G. J. SILLS (2011):  
Combining antiepileptic drugs--rational polytherapy?  
*Seizure* 20, 369-375
- BROOKS, D. J. (2005):  
Positron emission tomography and single-photon emission computed tomography in central nervous system drug development.  
*NeuroRx* 2, 226-236
- BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):  
Epilepsy.  
*N Engl J Med* 344, 1145-1151
- BUCKMASTER, P. S. u. F. E. DUDEK (1999):  
In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats.  
*J Neurophysiol* 81, 712-721
- BUCKMASTER, P. S., G. F. ZHANG u. R. YAMAWAKI (2002):  
Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit.  
*J Neurosci* 22, 6650-6658
- CAMERON, H. A., C. S. WOOLLEY, B. S. MCEWEN u. E. GOULD (1993):  
Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.  
*Neuroscience* 56, 337-344

- CASCINO, G. D. (2008):  
When drugs and surgery don't work.  
*Epilepsia* 49 Suppl 9, 79-84
- CHAOULOFF, F., M. DURAND u. P. MORMEDE (1997):  
Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests.  
*Behav Brain Res* 85, 27-35
- CHARYTON, C., J. O. ELLIOTT, B. LU u. J. L. MOORE (2009):  
The impact of social support on health related quality of life in persons with epilepsy.  
*Epilepsy Behav* 16, 640-645
- CHEN, Y. F. CHU, J. M. CHEN u. B. C. LI (2010):  
Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats.  
*Adv Med Sci* 55, 32-42
- CHEN, Y. C. TUNG, B. LI, K. IQBAL u. I. GRUNDKE-IQBAL (2007):  
Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis.  
*Neurobiol Aging* 28, 1148-1162
- CHEN u. C. G. WASTERLAIN (2006):  
Status epilepticus: pathophysiology and management in adults.  
*Lancet Neurol* 5, 246-256
- CHINCHURE, S., C. KESAVADAS u. B. THOMAS (2010):  
Structural and functional neuroimaging in intractable epilepsy.  
*Neurol India* 58, 361-370
- CHOHAN, M. O., B. LI, J. BLANCHARD, Y. C. TUNG, A. T. HEANEY, A. RABE, K. IQBAL u. I. GRUNDKE-IQBAL (2009):  
Enhancement of dentate gyrus neurogenesis, dendritic and synaptic plasticity and memory by a neurotrophic peptide.  
*Neurobiol Aging*
- CHUGANI, D. C. u. H. T. CHUGANI (2000):  
New directions in PET neuroimaging for neocortical epilepsy.  
*Adv Neurol* 84, 447-456
- CIPOLLA, M. J. (2009):  
The Cerebral Circulation.  
San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences
- CLINCKERS, R., I. SMOLDERS, A. MEURS, G. EBINGER u. Y. MICHOTTE (2005):  
Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal monoamines as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity.  
*J Pharmacol Exp Ther* 314, 725-731

- COLABUFO, N. A., F. BERARDI, M. G. PERRONE, E. CAPPARELLI, M. CANTORE, C. INGLESE u. R. PERRONE (2010):  
Substrates, inhibitors and activators of P-glycoprotein: candidates for radiolabeling and imaging perspectives.  
*Curr Top Med Chem* 10, 1703-1714
- COSTALL, B., B. J. JONES, M. E. KELLY, R. J. NAYLOR u. D. M. TOMKINS (1989):  
Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety.  
*Pharmacol Biochem Behav* 32, 777-785
- COUILLARD-DESPRES, S., B. WINNER, S. SCHAUBECK, R. AIGNER, M. VROEMEN, N. WEIDNER, U. BOGDAHN, J. WINKLER, H. G. KUHN u. L. AIGNER (2005):  
Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.  
*Eur J Neurosci* 21, 1-14
- COULTER, D. A., D. C. MCINTYRE u. W. LOSCHER (2002):  
Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us?  
*Brain Pathol* 12, 240-256
- CRABBE, J. C. (1986):  
Genetic differences in locomotor activation in mice.  
*Pharmacol Biochem Behav* 25, 289-292
- CRAWLEY, J. u. F. K. GOODWIN (1980):  
Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.  
*Pharmacol Biochem Behav* 13, 167-170
- CRESPER, A., V. RIGAU, P. COUBES, M. C. ROUSSET, F. DE BOCK, H. OKANO, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT u. M. LERNER-NATOLI (2005):  
Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy.  
*Neurobiol Dis* 19, 436-450
- CROWE, A. u. Y. K. TEOH (2006):  
Limited P-glycoprotein mediated efflux for anti-epileptic drugs.  
*J Drug Target* 14, 291-300
- CUCULLO, L., M. HOSSAIN, E. RAPP, T. MANDERS, N. MARCHI u. D. JANIGRO (2007):  
Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs.  
*Epilepsia* 48, 505-516
- DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):  
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.  
*Curr Opin Neurol* 14, 187-192
- DALLNER, C., A. G. WOODS, T. DELLER, M. KIRSCH u. H. D. HOFMANN (2002):  
CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain.  
*Glia* 37, 374-378

- DAMIAN, D. L., M. J. FULHAM, E. THOMPSON u. J. F. THOMPSON (1996):  
Positron emission tomography in the detection and management of metastatic melanoma.  
*Melanoma Res* 6, 325-329
- DANO, K. (1973):  
Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.  
*Biochim Biophys Acta* 323, 466-483
- DASHTIPOUR, K., A. M. WONG, A. OBENAU, I. SPIGELMAN u. C. E. RIBAK (2003):  
Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status  
epilepticus.  
*Epilepsy Res* 54, 141-151
- DAUCHY, S., F. DUTHEIL, R. J. WEAVER, F. CHASSOUX, C. DAUMAS-DUPORT, P.  
O. COURAUD, J. M. SCHERRMANN, I. DE WAZIERS u. X. DECLEVES (2008):  
ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the  
human blood-brain barrier.  
*J Neurochem* 107, 1518-1528
- DAVIS, S., T. H. ALDRICH, N. Y. IP, N. STAHL, S. SCHERER, T. FARRUGGELLA, P. S.  
DISTEFANO, R. CURTIS, N. PANAYOTATOS, H. GASCAN u. ET AL. (1993):  
Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses.  
*Science* 259, 1736-1739
- DAVIS, S., T. H. ALDRICH, D. M. VALENZUELA, V. V. WONG, M. E. FURTH, S. P.  
SQUINTO u. G. D. YANCOPOULOS (1991):  
The receptor for ciliary neurotrophic factor.  
*Science* 253, 59-63
- DE JONG, H. W., F. H. VAN VELDEN, R. W. KLOET, F. L. BUIJS, R. BOELLAARD u.  
A. A. LAMMERTSMA (2007):  
Performance evaluation of the ECAT HRRT: an LSO-LYSO double layer high resolution,  
high sensitivity scanner.  
*Phys Med Biol* 52, 1505-1526
- DEDEURWAERDERE, S., B. JUPP u. T. J. O'BRIEN (2007):  
Positron Emission Tomography in basic epilepsy research: a view of the epileptic brain.  
*Epilepsia* 48 Suppl 4, 56-64
- DEMEULE, M., A. REGINA, J. JODOIN, A. LAPLANTE, C. DAGENAIS, F.  
BERTHELET, A. MOGHRABI u. R. BELIVEAU (2002):  
Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain  
barrier.  
*Vascul Pharmacol* 38, 339-348
- DEVINSKY, O. (2003):  
Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: implications for diagnosis and treatment.  
*Epilepsy Behav* 4 Suppl 4, S2-10

- DITTRICH, F., H. THOENEN u. M. SENDTNER (1994):  
Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat.  
*Ann Neurol* 35, 151-163
- DOMBROWSKI, S. M., S. Y. DESAI, M. MARRONI, L. CUCULLO, K. GOODRICH, W. BINGAMAN, M. R. MAYBERG, L. BENGEZ u. D. JANIGRO (2001):  
Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy.  
*Epilepsia* 42, 1501-1506
- DOZIO, E., H. WATANOBE, M. RUSCICA, R. MAGGI, M. MOTTA u. P. MAGNI (2005):  
Expression of functional ciliary neurotrophic factor receptors in immortalized gonadotrophin-releasing hormone-secreting neurones.  
*J Neuroendocrinol* 17, 286-291
- DUDEK, F. E., J. L. HELLIER, P. A. WILLIAMS, D. J. FERRARO u. K. J. STALEY (2002):  
The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus.  
*Prog Brain Res* 135, 53-65
- EGUIBAR, J. R. u. C. CORTES MDEL (2010):  
[Absence epilepsy models in rodents].  
*Gac Med Mex* 146, 332-338
- ELGER, C. E. u. D. SCHMIDT (2008):  
Modern management of epilepsy: a practical approach.  
*Epilepsy Behav* 12, 501-539
- ELSON, G. C., E. LELIEVRE, C. GUILLET, S. CHEVALIER, H. PLUN-FAVREAU, J. FROGER, I. SUARD, A. B. DE COIGNAC, Y. DELNESTE, J. Y. BONNEFOY, J. F. GAUCHAT u. H. GASCAN (2000):  
CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex.  
*Nat Neurosci* 3, 867-872
- EMERICH, D. F., C. K. CAIN, C. GRECO, J. A. SAYDOFF, Z. Y. HU, H. LIU u. M. D. LINDNER (1997a):  
Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease.  
*Cell Transplant* 6, 249-266
- EMERICH, D. F., S. R. WINN, P. M. HANTRAYE, M. PESCHANSKI, E. Y. CHEN, Y. CHU, P. MCDERMOTT, E. E. BAETGE u. J. H. KORDOWER (1997b):  
Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease.  
*Nature* 386, 395-399

- EMSLEY, J. G. u. T. HAGG (2003):  
Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice.  
Exp Neurol 183, 298-310
- ENGEL (2005):  
What is epilepsy? In: Epilepsy: A comprehensive textbook. .  
Philadelphia: Lippincott-Raven 1-11
- ENGEL (2006):  
Report of the ILAE classification core group.  
Epilepsia 47, 1558-1568
- ENGEL, C. K. SCHINDLER, A. SANZ-RODRIGUEZ, R. M. CONROY, R. MELLER, R. P. SIMON u. D. C. HENSHALL (2011):  
Expression of neurogenesis genes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.  
Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 3, 38-47
- FANG, M., Z. Q. XI, Y. WU u. X. F. WANG (2011):  
A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis.  
Med Hypotheses
- 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
- FOLDVARY, N., W. E. BINGAMAN u. E. WYLLIE (2001):  
Surgical treatment of epilepsy.  
Neurol Clin 19, 491-515
- FOWLER, J. S., C. D. ARNETT, A. P. WOLF, R. R. MACGREGOR, E. F. NORTON u. A. M. FINDLEY (1982):  
[11C]spiroperidol: synthesis, specific activity determination, and biodistribution in mice.  
J Nucl Med 23, 437-445
- FRANCK, J. E., J. POKORNY, D. D. KUNKEL u. P. A. SCHWARTZKROIN (1995):  
Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus.  
Epilepsia 36, 543-558
- FRIELINGSDORF, H., D. R. SIMPSON, L. J. THAL u. D. P. PIZZO (2007):  
Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus.  
Neurobiol Dis 26, 47-55
- FROMM, M. F. (2000):  
P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs.  
Int J Clin Pharmacol Ther 38, 69-74

- FROMM, M. F. (2004):  
Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.  
*Trends Pharmacol Sci* 25, 423-429
- FROMM, M. F., R. B. KIM, C. M. STEIN, G. R. WILKINSON u. D. M. RODEN (1999):  
Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine [seecomments].  
*Circulation* 99, 552-557
- FUJIKAWA, D. G., H. H. ITABASHI, A. WU u. S. S. SHINMEI (2000a):  
Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy.  
*Epilepsia* 41, 981-991
- FUJIKAWA, D. G., S. S. SHINMEI u. B. CAI (2000b):  
Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms.  
*Epilepsia* 41 Suppl 6, S9-13
- GAGE, F. H. (2002):  
Neurogenesis in the adult brain.  
*J Neurosci* 22, 612-613
- GAGE, F. H., G. KEMPERMANN, T. D. PALMER, D. A. PETERSON u. J. RAY (1998):  
Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus.  
*J Neurobiol* 36, 249-266
- GAITATZIS, A., M. R. TRIMBLE u. J. W. SANDER (2004):  
The psychiatric comorbidity of epilepsy.  
*Acta Neurol Scand* 110, 207-220
- GARCIA, P., I. YOUSSEF, J. K. UTVIK, S. FLORENT-BECHARD, V. BARTHELEMY, C. MALAPLATE-ARMAND, B. KRIEM, C. STENGER, V. KOZIEL, J. L. OLIVIER, M. C. ESCANYE, M. HANSE, A. ALLOUCHE, C. DESBENE, F. T. YEN, R. BJERKVIG, T. OSTER, S. P. NICLOU u. T. PILLOT (2010):  
Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease.  
*J Neurosci* 30, 7516-7527
- GASTENS, A. M., C. BRANDT, J. P. BANKSTAHL u. W. LOSCHER (2008):  
Predictors of pharmacoresistant epilepsy: pharmacoresistant rats differ from pharmacoresponsive rats in behavioral and cognitive abnormalities associated with experimentally induced epilepsy.  
*Epilepsia* 49, 1759-1776
- GEARING, D. P., M. R. COMEAU, D. J. FRIEND, S. D. GIMPEL, C. J. THUT, J. MCGOURTY, K. K. BRASHER, J. A. KING, S. GILLIS, B. MOSLEY u. ET AL. (1992):  
The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor.  
*Science* 255, 1434-1437

GEARING, D. P., N. M. GOUGH, J. A. KING, D. J. HILTON, N. A. NICOLA, R. J. SIMPSON, E. C. NICE, A. KELSO u. D. METCALF (1987):  
Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF).  
EMBO J 6, 3995-4002

GEARING, D. P., C. J. THUT, T. VANDEBOS, S. D. GIMPEL, P. B. DELANEY, J. KING, V. PRICE, D. COSMAN u. M. P. BECKMANN (1991):  
Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130.  
EMBO J 10, 2839-2848

GILBY, K. L. (2008):  
A new rat model for vulnerability to epilepsy and autism spectrum disorders.  
Epilepsia 49 Suppl 8, 108-110

GILLIAM, F. u. A. M. KANNER (2002):  
Treatment of depressive disorders in epilepsy patients.  
Epilepsy Behav 3, 2-9

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

GOULD, E. (2007):  
How widespread is adult neurogenesis in mammals?  
Nat Rev Neurosci 8, 481-488

GROVER, S., K. BALA, S. SHARMA, M. GOURIE-DEVI, R. BAGHEL, H. KAUR, M. GUPTA, P. TALWAR u. R. KUKRETI (2010):  
Absence of a general association between ABCB1 genetic variants and response to antiepileptic drugs in epilepsy patients.  
Biochimie 92, 1207-1212

GULPEK, D., E. BOLAT, L. METE, S. ARICI u. M. CELEBISOY (2011):  
Psychiatric comorbidity, quality of life and social support in epileptic patients.  
Nord J Psychiatry

GUPTA, Y. K., S. BRIYAL u. G. CHAUDHARY (2002):  
Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats.  
Pharmacol Biochem Behav 71, 245-249

HAAS (2010):  
Ciliary neurotrophic factor (CNTF)- activated astrocytes are protective in a mouse model of temporal lobe epilepsy.  
FENS Abstr., vol.5, 106.14

HALL (1934):

Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.

J Comp Psychol. 18, 385-405

HALONEN, T., J. NISSINEN u. A. PITKÄNEN (2001):

Effect of lamotrigine treatment on status epilepticus-induced neuronal damage and memory impairment in rat.

Epilepsy Res 46, 205-223

HANDLEY, S. L. u. S. MITHANI (1984):

Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 327, 1-5

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

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

J Comp Neurol 413, 146-154

HEINRICH, P. C., I. BEHRMANN, G. MULLER-NEWEN, F. SCHAPER u. L. GRAEVE (1998):

Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.

Biochem J 334 ( Pt 2), 297-314

HELLSTROM, M., M. A. POLLETT u. A. R. HARVEY (2011):

Post-injury delivery of rAAV2-CNTF combined with short-term pharmacotherapy is neuroprotective and promotes extensive axonal regeneration after optic nerve trauma.

J Neurotrauma

HENNIGER, M. S., F. OHL, S. M. HOLTER, P. WEISSENBACHER, N. TOSCHI, P. LORSCHER, A. WIGGER, R. SPANAGEL u. R. LANDGRAF (2000):

Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour.

Behav Brain Res 111, 153-163

HENRY (1996):

Functional neuroimaging with positron emission tomography.

Epilepsia 37, 1141-1154

HENRY, S. M. HUGHES u. B. CONNOR (2007):

AAV-mediated delivery of BDNF augments neurogenesis in the normal and quinolinic acid-lesioned adult rat brain.

Eur J Neurosci 25, 3513-3525

HERMAN, B. (2004):

Memory and its reorganization in temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Curr 4, 139-140

- HERMANN, D. M., E. KILIC, S. KUGLER, S. ISENMANN u. M. BAHR (2001):  
Adenovirus-mediated GDNF and CNTF pretreatment protects against striatal injury following transient middle cerebral artery occlusion in mice.  
*Neurobiol Dis* 8, 655-666
- HIBI, M., M. MURAKAMI, M. SAITO, T. HIRANO, T. TAGA u. T. KISHIMOTO (1990):  
Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130.  
*Cell* 63, 1149-1157
- HITIRIS, N., R. MOHANRAJ, J. NORRIE, G. J. SILLS u. M. J. BRODIE (2007):  
Predictors of pharmacoresistant epilepsy.  
*Epilepsy Res* 75, 192-196
- HODGES, H. (1996):  
Maze procedures: the radial-arm and water maze compared.  
*Brain Res Cogn Brain Res* 3, 167-181
- HOFFMAN, G. E., N. MOORE, G. FISKUM u. A. Z. MURPHY (2003):  
Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment.  
*Exp Neurol* 182, 124-134
- 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
- HOPPE, C. u. C. E. ELGER (2011):  
Depression in epilepsy: a critical review from a clinical perspective.  
*Nat Rev Neurol* 7, 462-472
- HUBER, B., W. BOMMEL, I. HAUSER, V. HORSTMANN, S. LIEM, T. MAY, T. MEINERT, E. ROBERTSON, L. SCHULZ, M. SEIDEL, M. TOMKA-HOFFMEISTER u. W. WAGNER (2004):  
Efficacy and tolerability of levetiracetam in patients with therapy-resistant epilepsy and learning disabilities.  
*Seizure* 13, 168-175
- IP, N. Y., J. MCCLAIN, N. X. BARREZUETA, T. H. ALDRICH, L. PAN, Y. LI, S. J. WIEGAND, B. FRIEDMAN, S. DAVIS u. G. D. YANCOPOULOS (1993):  
The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development.  
*Neuron* 10, 89-102
- IP, N. Y., S. H. NYE, T. G. BOULTON, S. DAVIS, T. TAGA, Y. LI, S. J. BIRREN, K. YASUKAWA, T. KISHIMOTO, D. J. ANDERSON u. ET AL. (1992):  
CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130.  
*Cell* 69, 1121-1132

- ITO, S. u. H. OGUNI (2011):  
[A Ketogenic Diet for Intractable Childhood Epilepsy; As an Early Option as well as a Last Resort.].  
*Brain Nerve* 63, 393-400
- JACOBS, B. L., H. VAN PRAAG u. F. H. GAGE (2000):  
Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression.  
*Mol Psychiatry* 5, 262-269
- JANG, S. Y., Y. K. SHIN, J. JUNG, S. H. LEE, S. Y. SEO, D. J. SUH u. H. T. PARK (2010):  
Injury-induced CRMP4 expression in adult sensory neurons; a possible target gene for ciliary neurotrophic factor.  
*Neurosci Lett* 485, 37-42
- JESSBERGER, S., B. ROMER, H. BABU u. G. KEMPERMANN (2005):  
Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells.  
*Exp Neurol* 196, 342-351
- JING, X., X. LIU, T. WEN, S. XIE, D. YAO, G. WANG u. L. XIE (2010):  
Combined effects of epileptic seizure and phenobarbital induced overexpression of P-glycoprotein in brain of chemically kindled rats.  
*Br J Pharmacol* 159, 1511-1522
- JOHANNESSEN, S. I. u. C. J. LANDMARK (2010):  
Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications.  
*Curr Neuropharmacol* 8, 254-267
- JOHNSON, E. K., J. E. JONES, M. SEIDENBERG u. B. P. HERMANN (2004):  
The relative impact of anxiety, depression, and clinical seizure features on health-related quality of life in epilepsy.  
*Epilepsia* 45, 544-550
- JONES, N. C., G. KUMAR, T. J. O'BRIEN, M. J. MORRIS, S. M. REES u. M. R. SALZBERG (2009):  
Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling, and the influence of early life experience in rats.  
*Behav Brain Res* 203, 81-87
- JULIANO, R. L. u. V. LING (1976):  
A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.  
*Biochim Biophys Acta* 455, 152-162
- KALLEN, K. J., J. GROTZINGER, E. LELIEVRE, P. VOLLMER, D. AASLAND, C. RENNE, J. MULLBERG, K. H. MYER ZUM BUSCHENFELDE, H. GASCAN u. S. ROSEJOHN (1999):  
Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6.  
*J Biol Chem* 274, 11859-11867

- KAMIIE, J., S. OHTSUKI, R. IWASE, K. OHMINE, Y. KATSUKURA, K. YANAI, Y. SEKINE, Y. UCHIDA, S. ITO u. T. TERASAKI (2008):  
Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria.  
Pharm Res 25, 1469-1483
- KANNAN, P., C. JOHN, S. S. ZOGHBI, C. HALLDIN, M. M. GOTTESMAN, R. B. INNIS u. M. D. HALL (2009):  
Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and in vivo applications.  
Clin Pharmacol Ther 86, 368-377
- KANNER, A. M. (2003):  
Depression in epilepsy: a frequently neglected multifaceted disorder.  
Epilepsy Behav 4 Suppl 4, 11-19
- KATO, H., M. NAKAJIMA, M. SOHDA, N. TANAKA, T. INOSE, T. MIYAZAKI, M. FUKUCHI, N. ORIUCHI, K. ENDO u. H. KUWANO (2009):  
The clinical application of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to predict survival in patients with operable esophageal cancer.  
Cancer 115, 3196-3203
- KAWAI, K. (2011):  
[Vagus Nerve Stimulation Therapy for Epilepsy].  
Brain Nerve 63, 331-346
- KEMPERMANN, G., L. WISKOTT u. F. H. GAGE (2004):  
Functional significance of adult neurogenesis.  
Curr Opin Neurobiol 14, 186-191
- KESSLER, C. MURGATROYD, M. BUNCK, L. CZIBERE, E. FRANK, W. JACOB, C. HORVATH, P. MUIGG, F. HOLSBOER, N. SINGEWALD, D. SPENGLER u. R. LANDGRAF (2007):  
Diabetes insipidus and, partially, low anxiety-related behaviour are linked to a SNP-associated vasopressin deficit in LAB mice.  
Eur J Neurosci 26, 2857-2864
- KESSLER, E. G. NEAL, C. S. CAMFIELD u. E. H. KOSSOFF (2011):  
Dietary therapies for epilepsy: Future research.  
Epilepsy Behav
- KISHIMOTO, T., T. TAGA u. S. AKIRA (1994):  
Cytokine signal transduction.  
Cell 76, 253-262
- KLEMENTIEV, B., T. NOVIKOVA, I. KORSHUNOVA, V. BEREZIN u. E. BOCK (2008):  
The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury.  
Eur J Neurosci 27, 2885-2896

- KLEMENTIEV, B., T. NOVIKOVA, V. NOVITSKAYA, P. S. WALMOD, O. DMYTRIYEVA, B. PAKKENBERG, V. BEREZIN u. E. BOCK (2007):  
A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35.  
*Neuroscience* 145, 209-224
- KNOWLES, K. (1998):  
Idiopathic epilepsy.  
*Clin Tech Small Anim Pract* 13, 144-151
- KOKAIA, M. (2011):  
Seizure-induced neurogenesis in the adult brain.  
*Eur J Neurosci* 33, 1133-1138
- KONESKI, J. A. u. E. B. CASELLA (2010):  
Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: diagnosis and implications to the treatment.  
*Arq Neuropsiquiatr* 68, 107-114
- KORDOWER, J. H., O. ISACSON u. D. F. EMERICH (1999):  
Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible?  
*Exp Neurol* 159, 4-20
- KRADY, J. K., H. W. LIN, C. M. LIBERTO, A. BASU, S. G. KREMLEV u. S. W. LEVISON (2008):  
Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia.  
*J Neurosci Res* 86, 1538-1547
- KUBOTA, H., H. ISHIHARA, T. LANGMANN, G. SCHMITZ, B. STIEGER, H. G. WIESER, Y. YONEKAWA u. K. FREI (2006):  
Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis.  
*Epilepsy Res* 68, 213-228
- KUHN, H. G., H. DICKINSON-ANSON u. F. H. GAGE (1996):  
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.  
*J Neurosci* 16, 2027-2033
- KUMON, Y., S. SAKAKI, H. WATANABE, K. NAKANO, S. OHTA, S. MATSUDA, H. YOSHIMURA u. M. SAKANAKA (1996):  
Ciliary neurotrophic factor attenuates spatial cognition impairment, cortical infarction and thalamic degeneration in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia.  
*Neurosci Lett* 206, 141-144
- KUSUHARA, H., H. SUZUKI, T. TERASAKI, A. KAKEE, M. LEMAIRE u. Y. SUGIYAMA (1997):  
P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier.  
*J Pharmacol Exp Ther* 283, 574-580

KWAN, P., A. ARZIMANOGLU, A. T. BERG, M. J. BRODIE, W. ALLEN HAUSER, G. MATHERN, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, S. WIEBE u. J. FRENCH (2010):  
Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.  
*Epilepsia* 51, 1069-1077

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2000):  
Early identification of refractory epilepsy.  
*N Engl J Med* 342, 314-319

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2002):  
Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition?  
*Seizure* 11, 77-84

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):  
Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.  
*Expert Rev Neurother* 6, 397-406

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2010):  
Definition of refractory epilepsy: defining the indefinable?  
*Lancet Neurol* 9, 27-29

KWAN, P. u. M. R. SPERLING (2009):  
Refractory seizures: try additional antiepileptic drugs (after two have failed) or go directly to early surgery evaluation?  
*Epilepsia* 50 Suppl 8, 57-62

LA FOUGERE, C., A. ROMINGER, S. FORSTER, J. GEISLER u. P. BARTENSTEIN (2009):  
PET and SPECT in epilepsy: a critical review.  
*Epilepsy Behav* 15, 50-55

LANDGRAF, R. u. A. WIGGER (2002):  
High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety.  
*Behav Genet* 32, 301-314

LANGER, O., M. BAUER, A. HAMMERS, R. KARCH, E. PATARAIA, M. J. KOEPP, A. ABRAHIM, G. LUURTSEMA, M. BRUNNER, R. SUNDER-PLASSMANN, F. ZIMPRICH, C. JOUKHADAR, S. GENTZSCH, R. DUDCZAK, K. KLETTER, M. MULLER u. C. BAUMGARTNER (2007):  
Pharmacoresistance in epilepsy: a pilot PET study with the P-glycoprotein substrate R-[(11)C]verapamil.  
*Epilepsia* 48, 1774-1784

LAZAROVA, N., S. S. ZOGHBI, J. HONG, N. SENECA, E. TUAN, R. L. GLADDING, J. S. LIOW, A. TAKU, R. B. INNIS u. V. W. PIKE (2008):  
Synthesis and evaluation of [N-methyl-11C]N-desmethyl-loperamide as a new and improved PET radiotracer for imaging P-gp function.  
*J Med Chem* 51, 6034-6043

- LAZAROWSKI, A. u. L. CZORNYJ (2011):  
Potential role of multidrug resistant proteins in refractory epilepsy and antiepileptic drugs interactions.  
*Drug Metabol Drug Interact* 26, 21-26
- LAZAROWSKI, A., F. LUBIENIECKI, S. CAMARERO, H. POMATA, M. BARTULUCHI, G. SEVLEVER u. A. L. TARATUTO (2004):  
Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy.  
*Pediatr Neurol* 30, 102-106
- LEE, T. DELLER, M. KIRSCH, M. FROTSCHER u. H. D. HOFMANN (1997):  
Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion.  
*J Neurosci* 17, 1137-1146
- LEE u. N. SALAMON (2009):  
[18F] fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography and MR imaging coregistration for presurgical evaluation of medically refractory epilepsy.  
*AJNR Am J Neuroradiol* 30, 1811-1816
- LEE, L. SCHLICHTER, M. BENDAYAN u. R. BENDAYAN (2001):  
Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia.  
*J Pharmacol Exp Ther* 299, 204-212
- LEE, C. S. YANG, K. M. FANG u. S. F. TZENG (2009):  
Role of ciliary neurotrophic factor in microglial phagocytosis.  
*Neurochem Res* 34, 109-117
- LEHMANN, K., M. BUTZ u. G. TEUCHERT-NOODT (2005):  
Offer and demand: proliferation and survival of neurons in the dentate gyrus.  
*Eur J Neurosci* 21, 3205-3216
- LEHRNER, J., R. KALCHMAYR, W. SERLES, A. OLBRICH, E. PATARAIA, S. AULL, J. BACHER, F. LEUTMEZER, G. GROPPPEL, L. DEECKE u. C. BAUMGARTNER (1999):  
Health-related quality of life (HRQOL), activity of daily living (ADL) and depressive mood disorder in temporal lobe epilepsy patients.  
*Seizure* 8, 88-92
- LEPPIK, I. E. (1992):  
Intractable epilepsy in adults.  
*Epilepsy Res Suppl* 5, 7-11
- LIN, L. F., D. MISMER, J. D. LILE, L. G. ARMES, E. T. BUTLER, 3RD, J. L. VANNICE u. F. COLLINS (1989):  
Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF).  
*Science* 246, 1023-1025
- LITMAN, T., T. E. DRULEY, W. D. STEIN u. S. E. BATES (2001):  
From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.  
*Cell Mol Life Sci* 58, 931-959

- LIU, X., A. F. CLARK u. R. J. WORDINGER (2007):  
Expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and its tripartite receptor complex by cells of the human optic nerve head.  
*Mol Vis* 13, 758-763
- LOENING, A. M. u. S. S. GAMBHIR (2003):  
AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis.  
*Mol Imaging* 2, 131-137
- LOGAN, J., J. S. FOWLER, N. D. VOLKOW, A. P. WOLF, S. L. DEWEY, D. J. SCHLYER, R. R. MACGREGOR, R. HITZEMANN, B. BENDRIEM, S. J. GATLEY u. ET AL. (1990):  
Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects.  
*J Cereb Blood Flow Metab* 10, 740-747
- LOGUE, S. F., R. PAYLOR u. J. M. WEHNER (1997):  
Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task.  
*Behav Neurosci* 111, 104-113
- LÖSCHER u. O. LANGER (2010):  
Imaging of P-glycoprotein function and expression to elucidate mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy.  
*Curr Top Med Chem* 10, 1785-1791
- LÖSCHER u. H. POTSCHKA (2005a):  
Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family.  
*NeuroRx* 2, 86-98
- LÖSCHER u. H. POTSCHKA (2005b):  
Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.  
*Nat Rev Neurosci* 6, 591-602
- LÖSCHER u. H. POTSCHKA (2005c):  
Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases.  
*Prog Neurobiol* 76, 22-76
- LÖSCHER u. D. SCHMIDT (2002):  
New horizons in the development of antiepileptic drugs.  
*Epilepsy Res* 50, 3-16
- LÖSCHER, W. (1997):  
Animal models of intractable epilepsy.  
*Prog Neurobiol* 53, 239-258
- LÖSCHER, W. (2011):  
Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.  
*Seizure*

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):

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

LOWENSTEIN, D. H., T. BLECK u. R. L. MACDONALD (1999):

It's time to revise the definition of status epilepticus.  
*Epilepsia* 40, 120-122

LUKASIUK, P. (2009):

Seizure-induced gene expression.  
*Encyclopedia of basic epilepsy research Oxford: Academic Press*, 1302–1309

LUNA-TORTOS, C., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2008):

Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein.  
*Neuropharmacology* 55, 1364-1375

LUNA-TORTOS, C., B. RAMBECK, U. H. JURGENS u. W. LÖSCHER (2009):

The antiepileptic drug topiramate is a substrate for human P-glycoprotein but not multidrug resistance proteins.  
*Pharm Res* 26, 2464-2470

LUURTSEMA, G., R. C. SCHUIT, R. P. KLOK, J. VERBEEK, J. E. LEYSEN, A. A.

LAMMERTSMA u. A. D. WINDHORST (2009):

Evaluation of [<sup>11</sup>C]laniquidar as a tracer of P-glycoprotein: radiosynthesis and biodistribution in rats.  
*Nucl Med Biol* 36, 643-649

MAEHARA, T. (2011):

[Intraoperative Monitoring of epileptic foci: usefulness of multimodality image-guided epilepsy surgery performed in combination with electrocorticography].  
*Brain Nerve* 63, 321-329

MAGNASCO, A., A. ROSSI, P. CATARSI, R. GUSMANO, F. GINEVRI, F. PERFUMO u.

G. M. GHIGGERI (2008):

Cyclosporin and organ specific toxicity: clinical aspects, pharmacogenetics and perspectives.  
*Curr Clin Pharmacol* 3, 166-173

MAIRINGER, S., T. ERKER, M. MULLER u. O. LANGER (2011):

PET and SPECT Radiotracers to Assess Function and Expression of ABC Transporters in Vivo.  
*Curr Drug Metab*

MALIK, N., J. C. KALLESTAD, N. L. GUNDERSON, S. D. AUSTIN, M. G. NEUBAUER,

V. OCHS, H. MARQUARDT, J. M. ZARLING, M. SHOYAB, C. M. WEI u. ET AL. (1989):  
Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M.

*Mol Cell Biol* 9, 2847-2853

- MARCHI, N., G. GUIISO, M. RIZZI, S. PIRKER, K. NOVAK, T. CZECH, C. BAUMGARTNER, D. JANIGRO, S. CACCIA u. A. VEZZANI (2005):  
A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine.  
*Epilepsia* 46, 1613-1619
- MARKAKIS, E. A. u. F. H. GAGE (1999):  
Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles.  
*J Comp Neurol* 406, 449-460
- MARTIN, C., G. BERRIDGE, C. F. HIGGINS, P. MISTRY, P. CHARLTON u. R. CALLAGHAN (2000):  
Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein.  
*Mol Pharmacol* 58, 624-632
- MCINTYRE, D. C. u. K. L. GILBY (2007):  
Genetically seizure-prone or seizure-resistant phenotypes and their associated behavioral comorbidities.  
*Epilepsia* 48 Suppl 9, 30-32
- MCNAMARA (1994):  
Cellular and molecular basis of epilepsy.  
*J Neurosci* 14, 3413-3425
- MCNAMARA u. R. W. SKELTON (1993):  
The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze.  
*Brain Res Brain Res Rev* 18, 33-49
- MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001):  
Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene.  
*Pharmacogenetics* 11, 727-733
- MING, G. L. u. H. SONG (2005):  
Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.  
*Annu Rev Neurosci* 28, 223-250
- MOERMAN, L., L. WYFFELS, D. SLAETS, R. RAEDT, P. BOON u. F. DE VOS (2011):  
Antiepileptic drugs modulate P-glycoproteins in the brain: A mice study with (11)C-desmethylloperamide.  
*Epilepsy Res* 94, 18-25
- MOMMA, S., E. VASILYEVA, N. TOMILIN u. O. SHUPLIAKOV (2002):  
Ultrastructural identification of dividing cells in the adult mammalian central nervous system.  
*J Neurosci Methods* 119, 59-63

MONTARON, M. F., E. DRAPEAU, D. DUPRET, P. KITCHENER, C. AUROUSSEAU, M. LE MOAL, P. V. PIAZZA u. D. N. ABROUS (2006):

Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory.  
*Neurobiol Aging* 27, 645-654

MONTGOMERY, K. C. (1955):

The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.  
*J Comp Physiol Psychol* 48, 254-260

MONTZ, H. P., G. E. DAVIS, S. D. SKAPER, M. MANTHORPE u. S. VARON (1985):

Tumor-promoting phorbol diester mimics two distinct neuronotrophic factors.  
*Brain Res* 355, 150-154

MORRIS (1984):

Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.  
*J Neurosci Methods* 11, 47-60

MORRIS, P. GARRUD, J. N. RAWLINS u. J. O'KEEFE (1982):

Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.  
*Nature* 297, 681-683

MOTAMEDI, G. u. K. MEADOR (2003):

Epilepsy and cognition.  
*Epilepsy Behav* 4 Suppl 2, S25-38

MURAKAMI, M., Y. IMAHORI, S. KIMURA, K. TATSUZAWA, K. OHWADA, Y. INOUE, H. SASAJIMA u. K. MINEURA (2005):

Positron emission tomography elucidates transport system and tumor proliferation in meningiomas.  
*Oncol Rep* 14, 853-859

NAUMANN, T., O. SCHNELL, Q. ZHI, M. KIRSCH, K. O. SCHUBERT, M. SENDTNER u. H. D. HOFMANN (2003):

Endogenous ciliary neurotrophic factor protects GABAergic, but not cholinergic, septohippocampal neurons following fimbria-fornix transection.  
*Brain Pathol* 13, 309-321

NELSON, O. L., E. CARSTEN, S. A. BENTJEN u. K. L. MEALEY (2003):

Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies.  
*J Vet Intern Med* 17, 354-356

NGUGI, A. K., C. BOTTOMLEY, I. KLEINSCHMIDT, J. W. SANDER u. C. R. NEWTON (2010):

Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach.  
*Epilepsia* 51, 883-890

NKANSAH, M. K., S. Y. TZENG, A. M. HOLDT u. E. B. LAVIK (2008):

Poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and microspheres for short- and long-term delivery of bioactive ciliary neurotrophic factor.  
*Biotechnol Bioeng* 100, 1010-1019

NOH, H. S., Y. S. KIM, Y. H. KIM, J. Y. HAN, C. H. PARK, A. K. KANG, H. S. SHIN, S. S. KANG, G. J. CHO u. W. S. CHOI (2006):

Ketogenic diet protects the hippocampus from kainic acid toxicity by inhibiting the dissociation of bad from 14-3-3.

J Neurosci Res 84, 1829-1836

O'BRIEN, T. J., R. J. HICKS, R. WARE, D. S. BINNS, M. MURPHY u. M. J. COOK (2001):

The utility of a 3-dimensional, large-field-of-view, sodium iodide crystal--based PET scanner in the presurgical evaluation of partial epilepsy.

J Nucl Med 42, 1158-1165

OPPENHEIM, R. W., D. PREVETTE, Q. W. YIN, F. COLLINS u. J. MACDONALD (1991):

Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor.

Science 251, 1616-1618

OWEN, A., M. PIRMOHAMED, J. N. TETTEY, P. MORGAN, D. CHADWICK u. B. K. PARK (2001):

Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein.

Br J Clin Pharmacol 51, 345-349

PANKRATOVA, S., D. KIRYUSHKO, K. SONN, V. SOROKA, L. B. KOHLER, M. RATHJE, B. GU, K. GOTFRYD, O. CLAUSEN, A. ZHARKOVSKY, E. BOCK u. V. BEREZIN (2010):

Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor.

Brain 133, 2281-2294

PARDRIDGE, W. M. (2005):

The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development.

NeuroRx 2, 3-14

PARDRIDGE, W. M., P. L. GOLDEN, Y. S. KANG u. U. BICKEL (1997):

Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein.

J Neurochem 68, 1278-1285

PARENT, J. M. (2002):

The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair.

Epilepsy Res 50, 179-189

PARENT, J. M. (2007):

Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus.

Prog Brain Res 163, 529-540

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

Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy.

Ann Neurol 59, 81-91

- PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (2002):  
Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?  
Prog Brain Res 135, 121-131
- PARENT, J. M. u. G. G. MURPHY (2008):  
Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis.  
Epilepsia 49 Suppl 5, 19-25
- PARISI, P., R. MOAVERO, A. VERROTTI u. P. CURATOLO (2010):  
Attention deficit hyperactivity disorder in children with epilepsy.  
Brain Dev 32, 10-16
- PAXINOS, G. U. C. W. (2005):  
The rat brain in stereotactic coordinates.  
Academic Press, Sydney
- PEKCEC, A. u. H. POTSCHKA (2007):  
Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks.  
Neuroreport 18, 585-589
- PENNICA, D., K. L. KING, K. J. SHAW, E. LUIS, J. RULLAMAS, S. M. LUOH, W. C. DARBONNE, D. S. KNUTZON, R. YEN, K. R. CHIEN u. ET AL. (1995):  
Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy.  
Proc Natl Acad Sci U S A 92, 1142-1146
- PHELPS, M. E. (2000):  
Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes.  
Proc Natl Acad Sci U S A 97, 9226-9233
- PHELPS, M. E., E. J. HOFFMAN, N. A. MULLANI u. M. M. TER-POGOSSIAN (1975):  
Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography.  
J Nucl Med 16, 210-224
- PIERZCHALA, K. (2010):  
[Pharmacoresistant epilepsy - epidemiology and current studies].  
Neurol Neurochir Pol 44, 285-290
- PITKÄNEN, A. (2010):  
Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon.  
Epilepsia 51 Suppl 3, 2-17
- PITKÄNEN, A. (2002):  
Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models.  
Epilepsy Res 50, 141-160
- PITKÄNEN, A., T. BOLKVADZE u. R. IMMONEN (2011):  
Anti-epileptogenesis in rodent post-traumatic epilepsy models.  
Neurosci Lett

PITKÄNEN, A. u. H. KUBOVA (2004):  
Antiepileptic drugs in neuroprotection.  
*Expert Opin Pharmacother* 5, 777-798

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2009):  
Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.  
*Epilepsy Behav* 14 Suppl 1, 16-25

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2011):  
Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets.  
*Lancet Neurol* 10, 173-186

PITKÄNEN, A. u. T. P. SUTULA (2002):  
Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy.  
*Lancet Neurol* 1, 173-181

PITKÄNEN, A., J. TUUNANEN, R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. T. SALMENPERA (1998):  
Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy.  
*Epilepsy Res* 32, 233-253

POTSCHKA, H. (2010a):  
Modulating P-glycoprotein regulation: future perspectives for pharmaco-resistant epilepsies?  
*Epilepsia* 51, 1333-1347

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

POTSCHKA, H. (2010c):  
Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches.  
*Pharmacogenomics* 11, 1427-1438

POTSCHKA, H. (2010d):  
Transporterhypothese der Pharmakoresistenz von Epilepsien.  
*Z Epileptol*

POTSCHKA, H., S. BALTES u. W. LÖSCHER (2004a):  
Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats.  
*Epilepsy Res* 58, 85-91

POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2001):  
P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain.  
*Neuroreport* 12, 3557-3560

- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2002):  
P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats.  
*Neurosci Lett* 327, 173-176
- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2003):  
Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity.  
*J Pharmacol Exp Ther* 306, 124-131
- POTSCHKA, H. u. W. LÖSCHER (2001):  
In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats.  
*Epilepsia* 42, 1231-1240
- POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LÖSCHER (2004b):  
Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats.  
*Neuroreport* 15, 1657-1661
- POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. A. PEKCEC (2009):  
Aktueller Stand und Trends in der Epilepsitherapie bei Hund und Katze.  
*Tierärztliche Praxis Kleintiere* 211-217
- PRUT, L. u. C. BELZUNG (2003):  
The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.  
*Eur J Pharmacol* 463, 3-33
- QIU, Y., D. ROBINSON, T. G. PRETLOW u. H. J. KUNG (1998):  
Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3644-3649
- RACINE, R. J. (1975):  
Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas.  
*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 38, 1-12
- RAJ, D., S. GULATI u. R. LODHA (2011):  
Status epilepticus.  
*Indian J Pediatr* 78, 219-226
- RAO, M. S. u. A. K. SHETTY (2004):  
Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.  
*Eur J Neurosci* 19, 234-246

RATHJE, PANKRATOVA u. V. BEREZIN A peptide derived from the CD loop-D helix region of ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces neuronal differentiation and survival through binding to the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and the common cytokine receptor chain gp130.

European Journal of Cell Biology, in press

REDZIC, Z. (2011):

Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences.

Fluids Barriers CNS 8, 3

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

RICHARDSON, M. (2010):

Update on neuroimaging in epilepsy.

Expert Rev Neurother 10, 961-973

RIEUX, C., R. CARNEY, D. LUPI, O. DKHISSI-BENYAHYA, K. JANSEN, N.

CHOUNLAMOUNTRI, R. G. FOSTER u. H. M. COOPER (2002):

Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification.

J Biol Rhythms 17, 121-136

RIVERS, F., T. J. O'BRIEN u. R. CALLAGHAN (2008):

Exploring the possible interaction between anti-epilepsy drugs and multidrug efflux pumps; in vitro observations.

Eur J Pharmacol 598, 1-8

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

ROBERTS, L. M., D. S. BLACK, C. RAMAN, K. WOODFORD, M. ZHOU, J. E.

HAGGERTY, A. T. YAN, S. E. CWIRLA u. K. K. GRINDSTAFF (2008):

Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier by in vivo biotinylation.

Neuroscience 155, 423-438

RODGERS, R. J. u. A. DALVI (1997):

Anxiety, defence and the elevated plus-maze.

Neurosci Biobehav Rev 21, 801-810

- SADEQUE, A. J., C. WANDEL, H. HE, S. SHAH u. A. J. WOOD (2000):  
Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition.  
*Clin Pharmacol Ther* 68, 231-237
- SAIF, M. W., I. TZANNOU, N. MAKRILIA u. K. SYRIGOS (2010):  
Role and cost effectiveness of PET/CT in management of patients with cancer.  
*Yale J Biol Med* 83, 53-65
- SALMENPERA, T., R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. A. PITKÄNEN (2001):  
Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: a cross-sectional MRI study of 241 patients.  
*Epilepsy Res* 46, 69-82
- SANKAR, R. u. A. MAZARATI (2010):  
Neurobiology of Depression as a Comorbidity of Epilepsy.  
*Epilepsia* 51, 81
- SANTARELLI, L., M. SAXE, C. GROSS, A. SURGET, F. BATTAGLIA, S. DULAWA, N. WEISSTAUB, J. LEE, R. DUMAN, O. ARANCIO, C. BELZUNG u. R. HEN (2003):  
Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants.  
*Science* 301, 805-809
- SARKADI, B., L. HOMOLYA, G. SZAKACS u. A. VARADI (2006):  
Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system.  
*Physiol Rev* 86, 1179-1236
- SCHARFMAN, H. E. u. D. P. MCCLOSKEY (2009):  
Postnatal neurogenesis as a therapeutic target in temporal lobe epilepsy.  
*Epilepsy Res* 85, 150-161
- SCHARFMAN, H. E., A. E. SOLLAS, R. E. BERGER, J. H. GOODMAN u. J. P. PIERCE (2003):  
Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures.  
*Neuroscience* 121, 1017-1029
- SCHINKEL, A. H. (1999):  
P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.  
*Adv Drug Deliv Rev* 36, 179-194
- SCHINKEL, A. H. u. J. W. JONKER (2003):  
Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.  
*Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29
- SCHMIDT, D. (2011):  
Efficacy of new antiepileptic drugs.  
*Epilepsy Curr* 11, 9-11

- SCHUETZ, E. G., W. T. BECK u. J. D. SCHUETZ (1996):  
Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells.  
*Mol Pharmacol* 49, 311-318
- SCHWARTZ-PORSCHKE, D. u. U. JURGENS (1991):  
[Effectiveness of bromide in therapy resistant epilepsy of dogs].  
*Tierarztl Prax* 19, 395-401
- SECHER, T., V. NOVITSKAIA, V. BEREZIN, E. BOCK, B. GLENTHOJ u. B. KLEMENTIEV (2006):  
A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention.  
*Neuroscience* 141, 1289-1299
- SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2002a):  
Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions.  
*Eur J Pharmacol* 451, 149-155
- SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2002b):  
Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions.  
*Eur J Pharmacol* 451, 149-155
- SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2002c):  
Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy.  
*Epilepsy Res* 51, 257-268
- SENDTNER, M., P. CARROLL, B. HOLTSMANN, R. A. HUGHES u. H. THOENEN (1994):  
Ciliary neurotrophic factor.  
*J Neurobiol* 25, 1436-1453
- SHAPIRO, L. A., M. J. KORN u. C. E. RIBAK (2005):  
Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes.  
*Neuroscience* 136, 823-831
- SHAPIRO, L. A., C. E. RIBAK u. S. JESSBERGER (2008):  
Structural changes for adult-born dentate granule cells after status epilepticus.  
*Epilepsia* 49 Suppl 5, 13-18
- SHARMA, V., G. D. LUKER u. D. PIWNICA-WORMS (2002):  
Molecular imaging of gene expression and protein function in vivo with PET and SPECT.  
*J Magn Reson Imaging* 16, 336-351

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

Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice.

Neurosci Lett 416, 49-54

SHORS, T. J., G. MIESEGAES, A. BEYLIN, M. ZHAO, T. RYDEL u. E. GOULD (2001):

Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.

Nature 410, 372-376

SHORS, T. J., D. A. TOWNSEND, M. ZHAO, Y. KOZOROVITSKIY u. E. GOULD (2002):

Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning.

Hippocampus 12, 578-584

SHORVON, S. D. (2011):

The etiologic classification of epilepsy.

Epilepsia

SILLS, G. J., P. KWAN, E. BUTLER, E. C. DE LANGE, D. J. VAN DEN BERG u. M. J. BRODIE (2002):

P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in *mdr1a* knockout mice.

Epilepsy Behav 3, 427-432

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

Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy.

Trends Pharmacol Sci 27, 631-638

SIMONATO, M. u. S. ZUCCHINI (2010):

Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis?

Epilepsia 51 Suppl 3, 48-51

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

SLOVITER, R. S. (1999):

Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization.

Epilepsia 40 Suppl 1, S34-39; discussion S40-31

SLOVITER, R. S. (2005):

The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge.

C R Biol 328, 143-153

SMITH, D. B., R. H. MATTSON, J. A. CRAMER, J. F. COLLINS, R. A. NOVELLY u. B. CRAFT (1987):

Results of a nationwide Veterans Administration Cooperative Study comparing the efficacy and toxicity of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone.

Epilepsia 28 Suppl 3, S50-58

- SODERLUND, H., M. MOSCOVITCH, N. KUMAR, M. MANDIC u. B. LEVINE (2011):  
As time goes by: Hippocampal connectivity changes with remoteness of autobiographical memory retrieval.  
Hippocampus
- SPECTOR, S., C. CULL u. L. H. GOLDSTEIN (2000):  
Seizure precipitants and perceived self-control of seizures in adults with poorly-controlled epilepsy.  
Epilepsy Res 38, 207-216
- STAFSTROM (2006):  
Behavioral and cognitive testing procedures in animal models of epilepsy.  
In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, und Mosché SL (Eds.) Models of seizures and epilepsy.  
Elsevier Academic Press, Burlington pp 613-628
- STAHL, N., T. J. FARRUGGELLA, T. G. BOULTON, Z. ZHONG, J. E. DARNELL, JR. u. G. D. YANCOPOULOS (1995):  
Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors.  
Science 267, 1349-1353
- STAHL, N. u. G. D. YANCOPOULOS (1994):  
The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines.  
J Neurobiol 25, 1454-1466
- STANKOFF, B., M. S. AIGROT, F. NOEL, A. WATTILLIAUX, B. ZALC u. C. LUBETZKI (2002):  
Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules.  
J Neurosci 22, 9221-9227
- STEFAN, H., F. H. LOPES DA SILVA, W. LÖSCHER, 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
- STEVENS, S. J. u. C. L. HARDEN (2011):  
Hormonal Therapy for Epilepsy.  
Curr Neurol Neurosci Rep
- STEWART, L. S., L. S. LEUNG u. M. A. PERSINGER (2001):  
Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity.  
Epilepsy Res 44, 207-212
- STOCKLI, K. A., F. LOTTSPREICH, M. SENDTNER, P. MASIAKOWSKI, P. CARROLL, R. GOTZ, D. LINDHOLM u. H. THOENEN (1989):  
Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor.  
Nature 342, 920-923

SYVÄNEN, S., G. LUURTSEMA, C. F. MOLTHOFF, A. D. WINDHORST, M. C. HUISMAN, A. A. LAMMERTSMA, R. A. VOSKUYL u. E. C. DE LANGE (2011): (R)-[11C]verapamil PET studies to assess changes in P-glycoprotein expression and functionality in rat blood-brain barrier after exposure to kainate-induced status epilepticus. *BMC Med Imaging* 11, 1

TAGA, T. u. T. KISHIMOTO (1992): Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 6, 3387-3396

TERASAKI, T. u. K. HOSOYA (1999): The blood-brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 195-209

THOMAS (2010): Idiopathic epilepsy in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40, 161-179

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

TOURNIER, N., H. VALETTE, M. A. PEYRONNEAU, W. SABA, S. GOUTAL, B. KUHNAST, F. DOLLE, J. M. SCHERRMANN, S. CISTERMINO u. M. BOTTLAENDER (2011): Transport of selected PET radiotracers by human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2): an in vitro screening. *J Nucl Med* 52, 415-423

TSUJI, A., I. TAMAI, A. SAKATA, Y. TENDA u. T. TERASAKI (1993): Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 46, 1096-1099

VAN PRAAG, H., A. F. SCHINDER, B. R. CHRISTIE, N. TONI, T. D. PALMER u. F. H. GAGE (2002): Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034

VAN VELDEN, F. H., R. W. KLOET, B. N. VAN BERCKEL, A. A. LAMMERTSMA u. R. BOELLAARD (2009): Accuracy of 3-dimensional reconstruction algorithms for the high-resolution research tomograph. *J Nucl Med* 50, 72-80

VAN VELDEN, F. H., R. W. KLOET, B. N. VAN BERCKEL, C. F. MOLTHOFF, A. A. LAMMERTSMA u. R. BOELLAARD (2008): Gap filling strategies for 3-D-FBP reconstructions of High-Resolution Research Tomograph scans. *IEEE Trans Med Imaging* 27, 934-942

- VAN VLIET, E. A., S. REDEKER, E. ARONICA, P. M. EDELBROEK u. J. A. GORTER (2005):  
Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats.  
*Epilepsia* 46, 1569-1580
- VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAIK, P. M. EDELBROEK, S. REDEKER, E. ARONICA, W. J. WADMAN, N. MARCHI, A. VEZZANI u. J. A. GORTER (2006):  
Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats.  
*Epilepsia* 47, 672-680
- VELISKOVA, J., G. DE JESUS, R. KAUR u. L. VELISEK (2010):  
Females, their estrogens, and seizures.  
*Epilepsia* 51 Suppl 3, 141-144
- VELISKOVA, J., L. VELISEK, A. S. GALANOPOULOU u. E. F. SPERBER (2000):  
Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus.  
*Epilepsia* 41 Suppl 6, S30-35
- VIJAYARAGHAVAN, L., S. NATARAJAN u. E. S. KRISHNAMOORTHY (2011):  
Peri-ictal and ictal cognitive dysfunction in epilepsy.  
*Behav Neurol* 24, 27-34
- VOLK, H. A., D. ARABADZISZ, J. M. FRITSCHY, C. BRANDT, K. BETHMANN u. W. LÖSCHER (2006):  
Antiepileptic drug-resistant rats differ from drug-responsive rats in hippocampal neurodegeneration and GABA(A) receptor ligand binding in a model of temporal lobe epilepsy.  
*Neurobiol Dis* 21, 633-646
- VOLK, H. A. u. W. LÖSCHER (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., H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2004):  
Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats.  
*Epilepsy Res* 58, 67-79
- VOLLMANN-HONSDORF (2001):  
Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle morphologische Veränderungen in der Hippocampusformation von Tupaia (*Tupaia belangeri*) als Folge von chronisch psychosozialem Streß.
- VON CAMPE, G., D. D. SPENCER u. N. C. DE LANEROLLE (1997):  
Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus.  
*Hippocampus* 7, 472-488

- WALSH, R. N. u. R. A. CUMMINS (1976):  
The Open-Field Test: a critical review.  
Psychol Bull 83, 482-504
- WANG, C. L. KUO, L. L. LIEN u. E. J. LIEN (2003):  
Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors.  
J Clin Pharm Ther 28, 203-228
- WANG, S. YU, A. SIMONYI, G. ROTTINGHAUS, G. Y. SUN u. A. Y. SUN (2004):  
Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid.  
Neurochem Res 29, 2105-2112
- WEISS, J., S. M. DORMANN, M. MARTIN-FACKLAM, C. J. KERPEN, N. KETABI-KIYANVASH u. W. E. HAEFELI (2003):  
Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants.  
J Pharmacol Exp Ther 305, 197-204
- WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):  
Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.  
Anat Rec 231, 482-497
- WHISHAW, I. Q. u. J. A. TOMIE (1987):  
Cholinergic receptor blockade produces impairments in a sensorimotor subsystem for place navigation in the rat: evidence from sensory, motor, and acquisition tests in a swimming pool.  
Behav Neurosci 101, 603-616
- 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 pharmacoresistant temporal lobe epilepsy.  
J Neuropathol Exp Neurol 59, 907-920
- YU, X. L. FU, Y. J. ZHANG, J. Q. XIANG, L. SHEN u. J. Y. CHANG (2011):  
A Prospective Evaluation of Staging and Target Volume Definition of Lymph Nodes by (18)FDG PET/CT in Patients with Squamous Cell Carcinoma of Thoracic Esophagus.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys
- YU, S. G. LIN, Z. W. ZHOU, X. CHEN, J. LIANG, X. Q. YU, B. CHOWBAY, J. Y. WEN, W. DUAN, E. CHAN, X. T. LI, J. CAO, C. G. LI, C. C. XUE u. S. F. ZHOU (2007):  
Role of P-glycoprotein in limiting the brain penetration of glabridin, an active isoflavan from the root of *Glycyrrhiza glabra*.  
Pharm Res 24, 1668-1690
- ZARLING, J. M., M. SHOYAB, H. MARQUARDT, M. B. HANSON, M. N. LIOUBIN u. G. J. TODARO (1986):  
Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A 83, 9739-9743

ZELLINGER, C., M. HADAMITZKY, E. BOCK, V. BEREZIN u. H. POTSCHKA (2011a):  
Impact of the NCAM derived mimetic peptide plannexin on the acute cellular consequences  
of a status epilepticus.

Neurosci Lett

ZELLINGER, C., N. SEEGER, M. HADAMITZKY, S. FISCHBORN, V. RUSSMANN, H.  
WENDT, S. PANKRATOVA, E. BOCK, V. BEREZIN u. H. POTSCHKA (2011b):  
Impact of the erythropoietin-derived peptide mimetic Epotris on the histopathological  
consequences of status epilepticus.

Epilepsy Res

ZHANG, C., P. KWAN, Z. ZUO u. L. BAUM (2010):

In vitro concentration dependent transport of phenytoin and phenobarbital, but not  
ethosuximide, by human P-glycoprotein.

Life Sci 86, 899-905

## X. Anhang

### 1. Geräte

#### *Geräte für die Stimulation der basolateralen Amygdala*

Gerät	Hersteller
Beobachtungskäfige (Glasaquarien)	Domes Aquaristik, München, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
EEG-Ableitung	AD-Instruments, Spechbach, Deutschland
Personalcomputer	Diverse Bezugsquellen
Stereotaktische Apparate	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Stimulations- und EEG- Kabel	Conrad Elektronik, München, Deutschland
Stimulationseinheit (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator A365)	World Precision Instruments, Berlin

#### *Geräte für die EEG- und Video-Überwachung*

Gerät	Hersteller
Analog-Digitalwandler PowerLab/800s	ADInstruments Ltd, Hastings, UK
CCD-Kameramodule	Conrad Electronic GmbH, Hannover, Deutschland
Digi-Protect Searcher 6.275 beta software	ABUS Security-Tech, Affing, Deutschland
EEG-Software Chart 5	AD-Instruments, Spechbach, Deutschland
Ein-Kanal-Verstärker Animal Bio Amp	AD-Instruments Ltd, Hastings, UK
CCD Industrie Tag/Nacht- Überwachungskamera	Sony , Berlin, Deutschland

*Weitere Geräte*

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Bildanalysesoftware KS 400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision) und AxioVision Release 4.6	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Farbkamera (AxioCam)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland
Gamma Counter	LKB Wallac, Turku, Finnland
Hochdruck-Flüssigkeitschromatograph (HPLC)	Knauer, Berlin, Deutschland
Immunhistoapparatur (Shandon Sequenza <sup>®</sup> )	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Konfokales Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland
Kryostat (HM560M)	Microm, Walldorf, Deutschland
Leica DMLB-Mikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
Objekträger Elka	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Objekträger Histobond <sup>®</sup>	Paula Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauder-Königshofen, Deutschland
OD-Standard (Calibration of Step Tablet)	Eastman Kodak Company, USA
BH2-Mikroskop	Olympus, Japan
PET Scanner	CTI/Siemens, Knoxville, TN, USA
Reagenzglasschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Software EthoVision	Noldus, Niederlande
Stereo Investigator 6.0	MicroBrightField Europe, Magdeburg, Deutschland
Tierkäfige	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Videokamera (CCTV Camera)	Panasonic, Suzhou, China

## 2. Lösungen und Substanzen

### *Protokolle für die histologischen Methoden*

#### **Blocking-Lösung**

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

#### **Carrier-Lösung**

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

#### **Chrom-Gelatine-Lösung**

- 0,7 g Gelatine + 0,07 g Chrom(III)–Kaliumsulfat-Dodecahydrat
- mit 100 ml Aqua dest. vermischen
- langsam auf 60 °C erhitzen, bis sich die Gelatine gelöst hat
- langsam abkühlen lassen
- eine Messerspitze Thymol dazu geben

#### **DAB-Lösung**

- Ansatz (entspricht 3,3 mg 3,3`-DAB)
- 4 ml Tris/Ni-Lösung

#### **Färbelösung für Nissl (Thionin-) -Färbung**

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

**Formamid/SSC**

- 4 x SSC: 20 x SSC 1:5 verd. + 0,06 M Natrium-Citrat-Dihydrat
- 2 ml 100% Formamid + 2 ml 4 x SSC

**Gefriermedium**

- 4,28 g Glucose
- 0,07 MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat in 25 ml 0,1 M PBS lösen
- ad 50 ml Glycerin

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

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

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

- in Aqua dest.
- 5,7% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,2% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

**0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)**

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

**Natrium-Citratpuffer**

- 2,94 g Natrium-Citrat-Dihydrat auf 1000 ml Aqua dest.
- auf pH 9,0 einstellen

**Nissl (Thionin-) -Färbung**

- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Aqua dest.

- 75 – 95 s in Thionin
- 3 min in 50% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Terpeneol/Xylol-Ersatzmedium 1:1
- 3 min in Xylol-Ersatzmedium
- 3 min in frisches Xylol-Ersatzmedium
- mit Entellan eindecken

#### 4% Paraformaldehyd

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

#### 20 x SSC

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

#### Tris/Ni-Lösung

- 6 g Ammonium-Nickelsulfat Hexahydrat auf 1000 ml TBS
- pH 7,6 kontrollieren
- bei 4°C lagern

#### Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Biotin-gekoppelter sekundärer Kaninchen-anti Maus-Antikörper	DAKO, Dänemark

Biot. Esel-anti-Maus	Jackson Immuno Research, UK
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bupivacain (JENAPHARM®)	mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Chloralhydrat	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Chrom(III)–Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Cintrofin	GL Biochem Ltd., Shanghai, China
[ <sup>11</sup> C]quinidine, [ <sup>11</sup> C]laniquidar, [ <sup>11</sup> C]phenytoin und [ <sup>18</sup> F]fluorodeoxyglucose (FDG)	Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research, Holland
Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte	AbD serotec, UK
3,3´ Diaminobenzidin (DAB)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB Kit SK-4100)	Vector Laboratories, UK
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Heiland, Hamburg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Einbettmedium (Tissue Tec Medium)	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Eindeckmedium (Entellan)	Fa. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethacridinlactat (Rivanol®)	WDT, Garbsen, Deutschland

Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gelatine, gepulvert	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Holland
Isofluran (Isofluran CP <sup>®</sup> ; wurde für die Versuche in Deutschland verwendet)	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Isofluran (wurde für die Versuche in Holland verwendet)	Pharmachemie BV, Haarlem, Niederlande
Kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur <sup>®</sup> )	Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Marbocyl (Marbocyl <sup>®</sup> FD1%)	Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland
Meloxicam (Metacam <sup>®</sup> )	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Monoklonaler Mausantikörper C219	Calbiochem, USA
Monoklonaler Maus-anti-NeuN	Millipore, UK
Monoklonaler Ratte-anti-BrdU	AbD serotec, UK
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Phenobarbital	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyklonaler biot. Esel-anti-Ziege	Jackson Immuno Research, UK
Polyklonaler biot. Kaninchen-anti-Maus	Dako, Dänemark
Polyklonaler Maus-anti-CD68	AbD serotec, UK
Polyklonaler Ziege-anti-DCX	Santa Cruz, USA
reversed peptide	GL Biochem Ltd., Shanghai, China
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Serum (Kaninchen, Esel)	Vector Laboratories, UK
Streptavidin Cy2	Jackson ImmunoResearch, USA
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP)	SouthernBiotech, USA
Terpineol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tetracainhydrochlorid-Augentropfen (Ophthocain N)	Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland
Thionin (Acetate Salt)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Toluol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Triton x – 100	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Thymol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Vitigel Augengel (Vitigel®)	Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Xylol-Ersatzmedium (Rotihistol®)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

## Publikationen

### *Veröffentlichungen in internationalen Zeitungen*

**Russmann V**, Seeger N, Zellinger C, Hadamitzky M, Wendt H, Bock E, Berezin V and H Potschka:

The CNTF-derived peptide mimetic Cintrofin attenuates spatial-learning deficits in a rat post-status epilepticus model.

Manuskript in Vorbereitung

**Russmann V**, Syvänen S, Labots M, de Lange EC, Voskuyl RA, Verbeek J, Eriksson J, Schuit R, Windhorst AD, Lammertsma AA, Rongen M, van Kooij R, Zellinger C, Seeger N and H Potschka:

Brain P-glycoprotein function can be studied using two novel PET radiotracers: [<sup>11</sup>C]quinidine and [<sup>11</sup>C]laniquidar.

Manuskript in Vorbereitung

Zellinger C, Seeger N, Hadamitzky M, Fischborn S, **Russmann V**, Wendt H, Pankratova S, Bock E, Berezin V and H Potschka (2011):

Impact of the erythropoietin-derived peptide mimetic Epotris on the histopathological consequences of status epilepticus.

**Epilepsy Research**, 96 Issue 3: 241-249

Seeger N, Zellinger C, Rode A, Wagner S, Stein V, Tipold A, Roloff F, Bicker G, **Russmann V**, Fischborn S, Wendt H and H Potschka (2011):

The erythropoietin-derived peptide mimetic pHBSP affects cellular, behavioral and cognitive consequences in a rat post-status epilepticus model.

**Epilepsia**, 52 Issue 12: 2333-2343

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Überlassung dieser spannenden Themen, die gute Betreuung, die Anleitung zur experimentellen und neurowissenschaftlichen Forschung und die jederzeit gewährte konstruktive Unterstützung meiner Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die stetige Förderung meines beruflichen Werdegangs.

Ein ganz großer Dank geht an Christina Zellinger und Natalie Seeger, die mir bei allen pharmakologischen und neurowissenschaftlichen Fragestellungen stets zur Seite gestanden haben. Zudem waren sie auch in persönlichen Angelegenheiten immer für mich da. Durch ihre unermüdliche Motivation und ihren Zuspruch waren sie mir während der gesamten Promotion eine riesige Unterstützung. Daher danke ich ihnen an dieser Stelle nicht nur als Betreuer, sondern vor allem als Freunden.

Frau Prof. Elisabeth Bock und Herrn Prof. Vladimir Berezin danke ich für die Bereitstellung des mimetischen Peptids und die gute Kooperation.

Stina Syvänen und dem gesamten Team der *Division of Pharmacology Leiden/ Amsterdam Center for Drug Research* danke ich für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Unterstützung meiner Arbeit.

Janine Avemary und Martin Hadamitzky danke ich dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten. Janine möchte ich zudem dafür danken, dass sie mich durch ihren enormen wissenschaftlichen Anspruch und ihre Hilfsbereitschaft beim Erstellen dieser Dissertation trotz zeitweise vorhandener Sprachbarrieren stets unterstützte. Martin danke ich für seine aufmunternden Worte, seinen einzigartigen Humor und seine große Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Die lustigen Mittagspausen mit euch beiden werde ich sicherlich nie vergessen.

Bei Josi möchte ich mich für die wunderschöne gemeinsame Zeit im Doktorandenzimmer und ihre Freundschaft bedanken. Bei den wirklich wichtigen Fragestellungen hinsichtlich Satzbauten, Rechtschreibung, den Grundsätzen der Biologie und auch allen anderen Themen des alltäglichen Lebens war sie mir immer eine tolle Unterstützung. Bessere „Arbeitsplatz-Nachbarn“ als Josi und Natalie hätte ich mir nicht wünschen können. Hannes danke ich herzlich für seine stets vorhandenen aufmunternden Worte und Gesten. Durch seine warmherzige Art fühlte ich mich im Doktorandenzimmer von Anfang an sehr wohl. Thomas danke ich für die vielen unterhaltsamen Anekdoten, die mich täglich zum Lachen brachten, sowie seine einzigartige stimmliche Begabung, welche es stets vermochte, mich aufzuheitern. Mehrnoosh danke ich für die anregenden Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft bezüglich des englischen Vokabulars. Zudem gilt ein großer Dank Nicole, die mich stets von ganzem Herzen unterstützte und in jeder Situation für mich da war. Euch allen möchte ich für die vielen schönen Erinnerungen an die tolle gemeinsame Zeit danken. Des Weiteren danke ich Lotta, Sarah und Christina.

Für die freundliche und kompetente technische Unterstützung danke ich Carmen Meyer, Angela Vicidomini, Heidi Zankl, Andrea Wehmeyer, Sieglinde Fischlein, Regina Rentsch, Inge Sautter, Marion Fisch und Manfred Kutschka.

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

Ein großer Dank gilt zudem meinen Eltern und meiner Schwester, die mir durch ihre Liebe, ihren bedingungslosen Rückhalt sowie ihre immer währende Unterstützung das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichten. Durch ihr unerschütterliches Vertrauen in mich haben sie es insbesondere in schwierigen Zeiten geschafft, mich stets aufzumuntern. Ohne sie wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Florian möchte ich mich für seine liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Insbesondere in schwierigen Zeiten ist er immer für mich da gewesen und hat mir Kraft gegeben.

Meiner Freundin Lena danke ich dafür, dass sie trotz der teilweise sehr großen Entfernung immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich stets mental unterstützte.

Diese Studie wurde unterstützt durch das 7. Forschungsrahmenprogramm der EU (EURIPIDES; Stipendium Nr. HEALTH-F5-2007-201380) sowie das Stipendium PO-681/5-1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).