

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Rolle neuronaler Na_v 1.1. Kanäle für die Auslösung von Periinfarktdepolarisationen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Saicic

aus

Belgrad

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter:	apl. Prof. Dr. Christian Opherk apl. Prof. Dr. Thomas Pfefferkorn Priv. Doz. Dr. Nicole Terpolilli
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Eva Auffenberg
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	17.06.2021

Inhaltsverzeichnis

	Seitenzahl
1. Einleitung	1
1.1 Kortikale Streudepolarisationen (CSDs)	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Pathomechanismus und Ausbreitung	2
1.1.3 Vorkommen	5
1.1.3.1 Migräne	5
1.1.3.2 Ischämischer Schlaganfall	7
1.1.3.3 Weitere Relevanz	9
1.2 Migräne	10
1.2.1 Definition und Epidemiologie	10
1.2.2 Familiäre Hemiplegie Migräne (FHM)	11
1.2.2.1 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 1 (FHM1)	13
1.2.2.2 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 2 (FHM2)	14
1.2.2.3 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 3 (FHM3)	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Versuchstiere	23
2.2 Prämedikation und Narkose	23
2.3 Temperaturmessung	24
2.4 Ventilation	24
2.5 Blutdruckmessung	25
2.6 Messung der zerebralen Perfusion	25
2.7 Euthanasierung	26
2.8 Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)	26
2.8.1 Fokal-neurologisches Defizit	28
2.8.2 Histomorphometrische Aufarbeitung	29
2.8.3 Auswertung des Infarktvolumens	31
2.9 Versuchsreihe 2: Messung der CSDs	32
2.9.1 Versuchsdurchführung	32
2.9.2 Auswertung	38
2.10 Genotypisierung	40
2.11 Statistische Auswertung	40

3. Ergebnisse **41**

3.1 Validierung der fMCAo	41
3.1.1. Infarktvolumina	41
3.1.2. Zerebrale Perfusion	42
3.1.3. Gewicht	43
3.2 Validierung der CSD-Messung	44
3.3 Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)	46
3.3.1 Infarktvolumina von SCN1a _{wt/het} Mäusen	46
3.3.2 Zerebrale Perfusion	48
3.3.3 Gewicht	49
3.3.4 Fokal-neurologisches Defizit	50
3.4 Versuchsreihe 2: Messung der CSDs in SCN1a _{wt/het} Mäusen	52
3.4.1 Kumulative Anzahl der CSDs 120 Minuten nach fMCAo	52
3.4.2 Amplitude	55
3.4.3 Geschwindigkeit	56
3.4.4 Zerebrale Perfusion: fMCAo	57
3.4.5 Zerebrale Perfusion: CSD	58
3.5 Genotypisierung	60
3.6 Physiologische Parameter	61

4. Diskussion **62**

4.1. Methodendiskussion	62
4.1.1. Wahl der Versuchstiere	62
4.1.2. Schlaganfallmodell	63
4.1.3. Histomorphometrische Aufarbeitung	65
4.1.4. CSD-Modell	66
4.2. Ergebnisdiskussion	68
4.2.1. Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)	68
4.2.2. Versuchsreihe 2: Messung der CSDs in SCN1a _{wt/het} Mäusen	69
4.2.2.1. Zerebrale Perfusion	71
4.3. Zusammenfassung und Ausblick	72

5. Literaturverzeichnis **73**

Danksagung **91**

Eidesstattliche Versicherung **92**

1. Einleitung

1.1 Kortikale Streudepolarisationen (CSDs)

1.1.1 Definition

Eine kortikale Streudepolarisation (eng. cortical spreading depression, CSD) ist eine langsame, wellenartig fortlaufende Depolarisation neuronaler und glialer Zellen, welche sich mit einer Geschwindigkeit von 2 bis 3 mm/min über den Kortex ausbreitet. Dieser Depolarisation unmittelbar folgend, schließt sich eine bis zu 15 Minuten anhaltende Phase verminderter neuronaler Aktivität an, welche mit einer Störung des intra- und extrazellulären Ionengleichgewichts, sowie einem erhöhten Energieverbrauch einhergeht. ¹⁻⁴

Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen 1944 vom Neurophysiologen Aristides Leao im wissenschaftlichen Artikel „Spreading depression of activity in the cerebral cortex.“¹ Wichtig ist in diesem Zusammenhang die dort gewählte Bezeichnung „depression“, welche eine Depolarisation und somit eigentlich eine „Positivierung“ beschreibt. Grund für diese Begriffswahl war die von Leao im EEG beobachtete neuronale Suppression nach einem CSD Ereignis.^{5,6} Schon einige Jahre vor Leaos Entdeckung wurden solche wellenartigen Exzitationsereignisse ohne das Wissen um ihre Funktion und physiologische Grundlagen beobachtet, unter anderem an isolierten Froschhirnen.⁷ Seitdem wurde dieses Phänomen an diversen Modellorganismen (sowohl Wirbeltieren als auch Wirbellosen) und auch am Menschen nachgewiesen und untersucht.⁸⁻¹²

Kortikale Streudepolarisationen breiten sich nur in der grauen Substanz aus und können die weiße Substanz sowie existente Parenchymläsionen nicht penetrieren.² Die Hauptkomponente der Exzitation tragen hierbei neuronale Zellen, gefolgt von einer verzögerten astrozytären Antwort.¹³

1.1.2 Pathomechanismus und Ausbreitung

Als Auslöser einer kortikalen Streudepolarisation kommen vielfältige Stimuli in Betracht. In gesunden Rattengehirnen wurden der Einfluss von überphysiologischen Kalium-Konzentrationen auf die CSD-Entstehung untersucht und in diesem Zusammenhang ein kritischer Wert der extrazellulären K^+ -Konzentration von 15 mmol/L in einem Parenchymvolumen von 0,05 mm³ festgelegt.¹⁴ Der Einfluss von hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen konnte auch schon durch perioperative stereotaktische KCl-Injektion am menschlichen Gehirn nachgewiesen werden.¹⁵ Darüber hinaus gelten in gesundem Hirngewebe auch mechanische Reize, wie leichte bis schwere Verletzungen (experimentell z.B. durch pin-prick¹⁶ oder Schädel-Hirn-Traumata¹⁷), sowie Ultraschall^{18,19} und elektrische Stimulation mittels Laser²⁰ als mögliche Auslöser kortikaler Streudepolarisationen. Auch Hypoxämien und Ischämien des Parenchyms können die Wahrscheinlichkeit von CSD-Ereignissen signifikant erhöhen.²¹ Substanzen, die CSDs auslösen können, sind z.B. 2,4-Dinitrophenol Fluoressigsäure oder Zyanid, sowie Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase.²²⁻²⁴

Die genauen physiologischen Abläufe während einer CSD sind komplex. Nach bisherigen Erkenntnissen bedingt eine Positivierung des Membranpotentials eine massive Umverteilung intra- und extrazellulärer Ionen sowie Veränderungen im Zellvolumen.^{24-29,169} Die extrazelluläre K^+ -Konzentration steigt dabei aufgrund der kaskadenartigen Öffnung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle im Peak der Depolarisation von initialen 2 bis 3 mmol/L bis auf 60 mmol/L an.²⁵ Dem K^+ -Ausstrom entgegenwirkend, strömen Na^+ - und Cl^- -Ionen in die Zelle hinein.²⁶ Auch Ca^{2+} -Ionen folgen ihrem Konzentrationsgradienten nach intrazellulär, sodass die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf etwa 0,1 mmol/L abfällt.²⁷

Die Konsequenzen dieser Ionen-Umverteilung sind ein osmotisch nach intrazellulär gerichteter H_2O -Einstrom, eine reversible neuronale Schwellung, sowie eine Schrumpfung des extrazellulären Raums.³⁰

Auch Auswirkungen auf die extrazelluläre Konzentration von Neurotransmittern sind beschrieben. Ein Anstieg von GABA, sowie der Aminosäuren Glycin, Aspartat und Glutamat konnten während CSD-Ereignissen gemessen werden.^{31,32}

Die gleichgeschaltete Depolarisation breitet sich schließlich wellenartig über den Kortex aus. Vermutlich an diesem Ausbreitungsmechanismus beteiligt sind interzelluläre Poren (eng. gap-junctions), welche eine Fortpflanzung der supraphysiologischen K^+ -Konzentrationen entlang benachbarter Astrozyten und anderer glialer Zellen erlaubt.²⁹

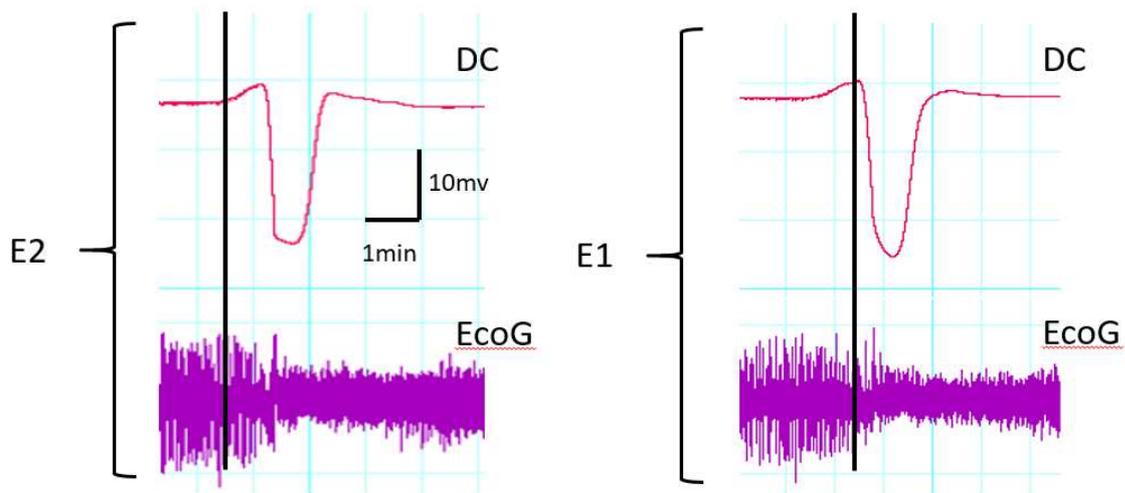


Abb. 1: Aufzeichnung einer kortikalen Streudepolarisation mithilfe von zwei intraparenchymalen Elektroden bei der Ratte. (KCl Applikation). Nach einem Stimulus breitet sich die CSD von Elektrode 1 (E1) zentrifugal über den Kortex aus und wird mit einer Latenz von Elektrode 2 (E2) erfasst. Charakteristisch zeigt sich eine Negativierung des Membranpotentials mit einer Amplitude von 20–30 mV und einer Dauer von mehr als eine Minute („DC-shift“ \triangleq Shift des Membranpotentials). Das EcoG-Signal (Elektrokortikographie) zeigt nach der CSD eine bis zu zehn Minuten andauernde Signalabschwächung, entsprechend der gehemmten neuronalen Aktivität.⁴

(Abbildung modifiziert nach: Ayata, C. et al. 2009⁴)

Der Metabolismus der Neuronen wird durch eine CSD ebenfalls beeinflusst. Vor allem ein Auslösen repetitiver Streudepolarisationen vervielfacht die Rate des zerebralen Glukosemetabolismus, was an erhöht gemessenen Laktatkonzentrationen sowie einer transienten Azidose des betroffenen Gewebes ersichtlich wird.³³⁻³⁶ Ihre physiologische Baseline erreichen die Metaboliten, analog der nachgeschalteten Suppression der zellulären Aktivität, erst nach etwa 10 Minuten.³⁷ Dieser hohe Energieverbrauch schlägt sich auch in einem erhöhten Sauerstoffbedarf nieder.^{38,39}

Die vollständige Normalisierung des zerebralen Sauerstoffverbrauchs kann je nach Zelltyp und abhängig von Frequenz der CSD Ereignisse bis zu zwei Stunden andauern.⁴⁰

Des Weiteren ist eine erhöhte Stoffwechselrate während der Depolarisation an eine Veränderung der zerebralen Perfusion gekoppelt, die die Blut- und Energiezufuhr an die neuronale Aktivität anpasst (sog. neurovaskuläre Kopplung) und sich auf die Durchblutung des gesamten Gehirns (eng. CBF) auswirkt.^{41,42} In bisherigen Studien zeigt sich mit Beginn einer CSD eine reflektorische Hyperämie, um den neuronalen Stoffwechselbedarf zu decken. Entsprechend konnten während des Peaks der CSD 50% (Primaten)¹² bis 500% (Katzen)⁴³ höhere CBF-Werte gemessen werden. Diese Ergebnisse sind wegweisend für die Annahme, dass es während dieser Hyperämie zu einer, vor allem arteriellen, Vasodilatation zerebraler Gefäße kommt.^{44,45} In einigen Fällen ist einer CSD vor Beginn der Depolarisation eine kurzzeitige Vasokonstriktion mit Hypoperfusion vorgeschaltet.⁴⁶⁻⁴⁸

Der Zustand erhöhter zerebraler Perfusion erholt sich zeitgleich mit der Normalisierung des DC-Potentials und geht dann in eine bis zu einer Stunde andauernden Oligämie über.⁴⁹⁻⁵¹

1.1.3 Vorkommen

1.1.3.1 Migräne

Der wohl am besten etablierte Zusammenhang zwischen CSDs und neurologischen Erkrankungen bzw. Syndromen besteht zwischen kortikalen Streudepolarisationen und Auren im Zuge der Migräne.^{52,53}

Sowohl kortikale Streudepolarisationen als auch visuelle oder somatosensorische Auren breiten sich in einer ähnlichen Charakteristik und Geschwindigkeit über den Kortex aus.^{2,54} Dieser Zusammenhang konnte von *Hadjikhani et al.* 2001 auch mittels MRT in Migränepatienten untermauert werden. Der visuellen Aura folgend, breitete sich ein von der O₂-Sättigung des Blutes abhängiges Signal (BOLD-Signal) mit charakteristischen 3 mm/min über den Kortex des Patienten aus.⁵⁵ Vasomotorische Veränderungen während einer Aura, ähnlich denen der CSD (vgl. Kapitel 1.1.1) wurden in Migränestudien beobachtet. Insbesondere die der Streudepolarisation nachgeschaltete Oligämie konnte in Migränepatienten nach einer Aura erfasst werden.^{56,57}

Darüber hinaus aktivieren CSDs die Pars caudalis des Nucleus spinalis nervi trigemini und führen damit zu einer Vasodilatation meningealer Arterien, welche stark mit Migränekopfschmerzen assoziiert ist.⁵⁸ Auch die Freisetzung des potenten Vasodilatators NO sowie eine Aktivierung perivaskulärer Nerven wird gefördert.⁴³ Migräneprophylaktika wie Valproat, Topiramid und Metoprolol führten nach Applikation zu einer erfolgreichen Senkung der CSD-Schwelle in Ratten.⁵⁹ Zuletzt zeigten Studien an transgenen Mauslinien genetisch vererbter Migräneerkrankungen eine erhöhte Anzahl kortikaler Streudepolarisationen, sowie eine verringerte Schwelle für deren Auslösung (vgl. Kapitel 2).^{60,61}

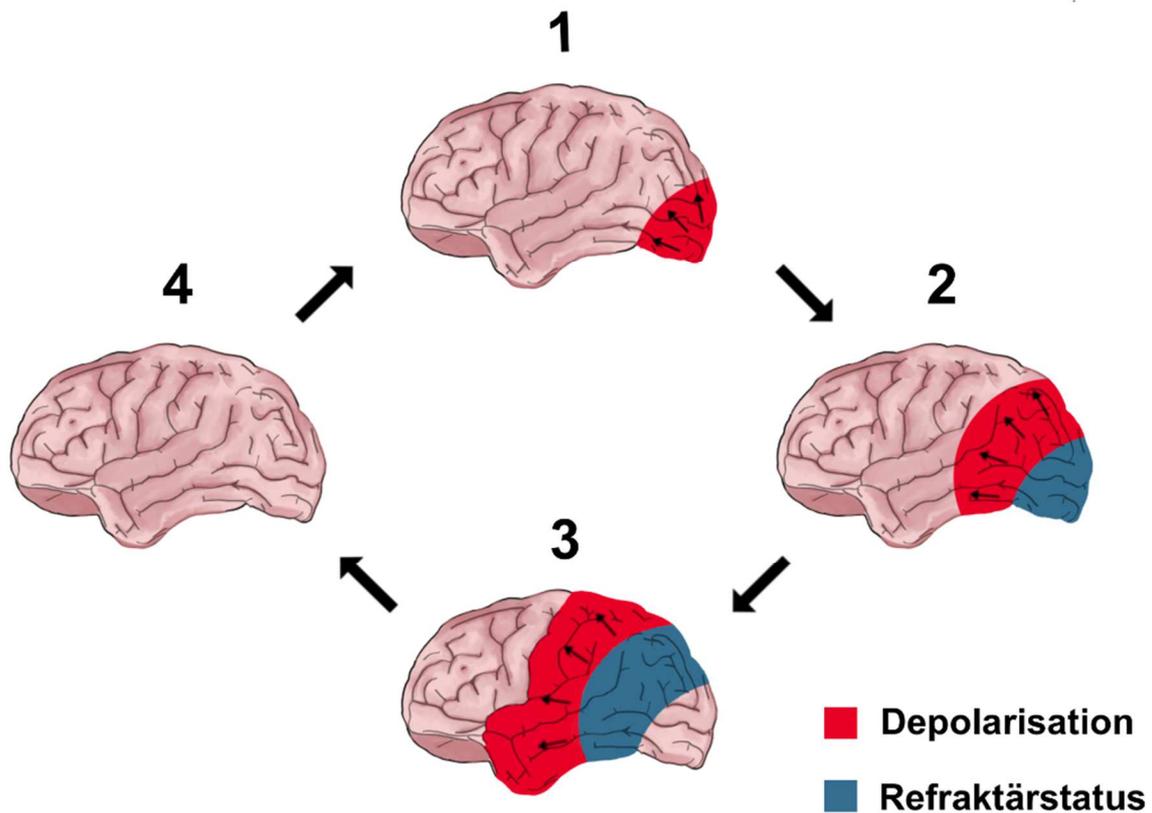


Abb. 2: Exemplarische Ausbreitung einer CSD beim Menschen. Analog einer visuellen Aura kommt es durch einen Reiz primär zu einer Induktion einer CSD am okzipitalen Pol (1). Im betroffenen Bereich sinkt die zerebrale Perfusion aufgrund gestörter neurovaskulärer Kopplung um 20–30%. Ein erhöhter zerebraler Sauerstoffverbrauch kann 2–6 Stunden persistieren. Nicht von CSDs befallene Regionen bleiben dabei metabolisch unverändert. Die Depolarisation breitet sich weiter nach anterior bis zum Sulcus centralis aus (2–3). Erreicht die CSD den Gyrus postcentralis kommt es zu einer ausgeprägten somatosensorischen Symptomatik. Der Patient nimmt symptomatisch nun einen voll ausgeprägten Migräneanfall wahr (7). Diese Attacke ist physiologisch gekennzeichnet durch einen persistierenden Abfall der zerebralen Durchblutung, sowie einer erhöhten zerebralen Stoffwechselrate. Nach dem Migräneanfall kommt es zu einer langsamen, metabolischen Erholung des Cortex (4). Der Kreislauf kann von vorne beginnen.⁵³

(Abbildung modifiziert nach: Lauritzen, M. 1994⁵³)

1.1.3.2 Ischämischer Schlaganfall

CSDs spielen in einem ischämisch geschädigten Gehirn eine wesentliche Rolle, welche das Outcome sowie die Infarktgröße beeinflussen kann. Bezeichnet wird diese Form der kortikalen Streudepolarisationen aufgrund ihres Entstehungsortes als PID (Periinfarktdepolarisation). Diese konnten bisher in fast allen Modellorganismen mit ischämischem Schlaganfall nachgewiesen werden und haben ihren topografischen Ursprung in der Nähe, des durch den Infarkt geschädigtem Hirngewebes, der Penumbra.⁶²⁻⁶⁵ Mit diesem Begriff wird Hirnparenchym beschrieben, welches durch den Schlaganfall zwar funktionell gestört, jedoch noch nicht irreversibel geschädigt ist. Die zerebrale Durchblutung schwankt hier zwischen 20% und 50% des physiologischen CBF.⁶⁶

PIDs entstehen dadurch, dass Kalium-Ionen aus dem von Zellyse betroffenen Infarktkern in die Penumbra diffundieren und dort, wie bereits beschrieben, spontane Depolarisationen begünstigen.⁶⁷

Reagiert gesundes Hirnparenchym auf eine Streudepolarisation wie bereits erläutert mit einer reflektorischen Hyperämie, so ist die neuro-vaskuläre Kopplung im ischämisch geschädigten Hirnparenchym stark beeinträchtigt. Die metabolische Schuld kann vom Gewebe nicht mehr getragen werden, die Gefahr irreversibler hypoxischer Schädigung steigt, der Infarktkern wächst.⁶⁸⁻⁷⁰ Hypoxämie trägt maßgeblich zu einer Verlängerung kortikaler Streudepolarisationen bei. Die Dauer sowie die Anzahl der PIDs korreliert experimentell direkt mit der Expansion des Infarktkerns.^{68, 71-73}

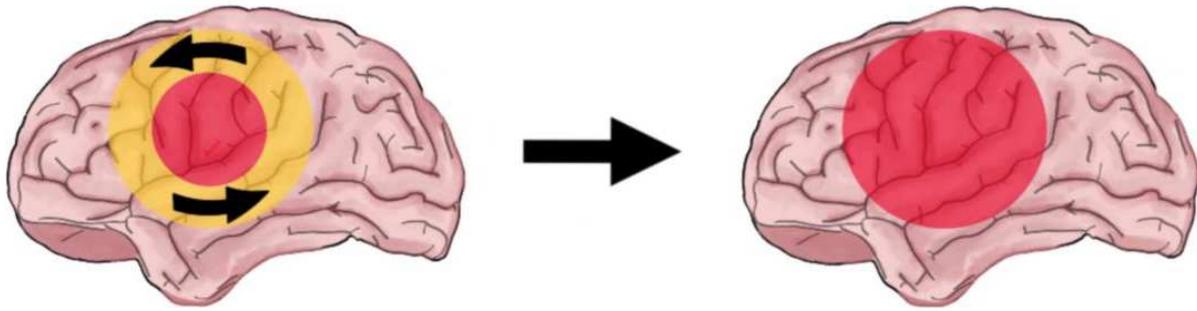


Abb. 3: Illustration einer um den Infarktkern kreisenden Periinfarktdepolarisation (PID). Vor allem am Rand des Infarktkerns (**gelber Kreis**) kommt es aufgrund metabolischer Missverhältnisse und Durchblutungsstörungen stochastisch wahrscheinlicher zur Auslösung einer spontanen CSD (bzw. PID). Diese kreist im Uhrzeigersinn um den Infarktkern (**roter Kreis**). Eine gleichzeitige Ausbreitung in die Gegenrichtung wird dabei durch die Refraktärzeit bereits depolarisierter kortikaler Zellen verhindert. Bereiche mit nahem Bezug zum Infarktkern, erholen sich aufgrund der ausgeprägten ischämischen Vorschädigung nicht von der metabolischen Schuld. Es kommt durch inverse neuro-vaskuläre Kopplung (Vasokonstriktion) zu einer weiteren Schädigung der umliegenden, noch intakten Zellen. Der Infarktkern wächst im Sinne einer sich ausbreitenden Ischämie (engl. spreading ischaemia). In äußeren, noch gesunden Arealen kommt es hingegen zu einer anschließenden Reperfusion.⁷⁵

(Abbildung modifiziert nach: Lauritzen, M. et al. 2011⁷⁵)

1.1.3.3 Weitere Relevanz

Abgesehen von den bisher erwähnten Krankheitsbildern, spielen CSDs auch bei Subarachnoidalblutungen, intrakraniellen Blutungen sowie Schädel-Hirn-Traumata (TBI) eine relevante Rolle.^{16,76-78}

Eine 2009 erschienene Studie von *Dreier et al.* zeigte in einem Patientenkollektiv von 13 Patienten, die an einer Subarachnoidalblutung litten, sowohl das Auftreten isolierter CSDs (in 12 Patienten) als auch repetitiver CSDs (in 5 Patienten), welche mit einer adäquaten als auch einer inversen Gefäßreaktion einhergingen.⁷⁶ Im Falle intrazerebraler Blutungen wurden von *Helbok R. et al.* 2017 in 18 von 27 untersuchten, komatösen Patienten insg. 650 kortikale Streudepolarisationen aufgezeichnet.⁷⁷ Zuletzt konnten auch bei Schädel-Hirn-Trauma Patienten CSDs mit inverser neurovaskulärer Kopplung aufgezeichnet werden.⁷⁸

1.2 Migräne

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Nach der „International Classification Of Headache Disorders“ (ICOHD) tritt eine Migräne in zwei Ausprägungen auf. Bei der „Migräne ohne Aura“ (auch: klassische Migräne), handelt es sich üblicherweise um unilateral auftretende, pulsierende Kopfschmerzen mittelgradiger bis starker Intensität mit einer Dauer von etwa 4–72 Stunden. Leidet der Patient an mehr als 15 Tagen innerhalb von drei Monaten an einer solchen Kopfschmerzsymptomatik, spricht man von einer chronischen Migräne.⁷⁹ Im Vergleich dazu ist eine sog. „Migräne mit Aura“ von fokal-neurologischer Symptomatik vor bzw. während der Migräneattacke gekennzeichnet. Typischerweise können sowohl visuelle Auren in Form von Skotomen als auch sensorische Parästhesien Stunden, teilweise sogar Tage vor dem eigentlichen Kopfschmerz auftreten.⁷⁹ Bei etwa 2,5% der Patienten, die an einer episodischen Migräne leiden, chronifiziert diese im Laufe des Lebens.⁸⁰

Die globale Krankheitslast-Studie von 2016 setzte die Migräne gemessen an der Anzahl an mit Behinderung gelebten Lebensjahren in 195 Ländern (eng. Years lived with Disease/Disability, YLD) international auf Platz 2, welchen sie seit 1990 hält.⁸¹ Die Prävalenz in den USA beträgt je nach durchgeführter Studie etwa 1,4–2,2%.⁸² Eine 2012 durchgeführte Studie des deutschen Kopfschmerzkonsortiums gab die Prävalenz chronischer Kopfschmerzen in Deutschland mit 2,6% in der Allgemeinbevölkerung an. Darunter nimmt der Anteil, der an chronischer Migräne Leidenden mit 42,4% fast die Hälfte ein.⁸³ Nicht nur statistisch zeigt diese Kopfschmerzerkrankung ihren medizinischen Stellenwert. Vor allem Patienten, die an chronischer Migräne leiden, zeigen einen niedrigeren sozioökonomischen Status, eine erhöhte Anfälligkeit für andere psychiatrische Erkrankungen wie Depressionen und chronische Schmerzen sowie eine geringere Lebensqualität.^{84,85}

1.2.2 Familiäre Hemiplegie Migräne (FHM)

Bei der Familiären Hemiplegischen Migräne (FHM) handelt es sich um eine seltene Form der Migräneerkrankung, die durch ausgeprägte motorische Symptomatik im Zuge der Aura gekennzeichnet ist. Zusätzlich muss nach Definition der „International Classification Of Headache Disorders“ mindestens ein Verwandter ersten bzw. zweiten Grades ebenfalls an einer Migräne mit motorischer Aura leiden.⁷⁹

Typischerweise manifestiert sich die FHM während des ersten bis zweiten Lebensjahrzehnts und ist neben visueller und sensorischer Aura vor allem durch motorische Ausfälle geprägt, die von leichter Grobmotorik bis hin zu Hemiplegien und Aphasien reichen.⁸⁶ Die Anzahl der Anfälle variiert von Patient zu Patient stark.⁸⁷⁻⁸⁹ Die motorische Komponente tritt dabei immer auch zusammen mit einer, denselben Körperteil betreffenden sensorischen Aura auf und kann sowohl einseitige als auch bilaterale Beschwerden auslösen.⁸⁹⁻⁹² Auch ist eine „Abfolge“ der jeweiligen Symptome in folgender Reihenfolge in etwa 70% der Fälle möglich: visuell → sensorisch → motorisch → aphasisch → stammbetont.⁹⁰ Letzteres umfasst eine ausgeprägte Hirnstamm-Symptomatik, reichend von leichter Vertigo und Tinnitus hin zu ausgeprägten Gang- und Standataxien. Sogar schwere komatöse Zustände wurden in einem Drittel der FHM1 Patienten beschrieben.^{91,92}

Darüber hinaus wird auch eine herabgesetzte Krampfschwelle beobachtet, die sich in vermehrtem Auftreten epileptischer Anfälle äußert, welche sowohl im Bezug zur Aura, als auch zeitlich völlig unabhängig von den Migräneanfällen auftreten können.⁹³ Diese erhöhte neuronale Erregbarkeit wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Rückbildung der Symptome Tage bis Monate in Anspruch nehmen kann und in seltenen Fällen auch bleibende zerebrale Schäden zurücklässt, so z.B. Atrophien oder Enzephalopathien.⁹⁴⁻⁹⁶ Generelle Anfallsauslöser sind neben den migränetypischen Triggern wie Stress und körperliche Verausgabung auch Bagateltraumata des Kopfes, die zur Ausbildung massiver Hirnschwellungen führen können.⁹⁷⁻⁹⁹

Erste Fälle eines Kopfschmerzsyndroms passend zur Symptomatik einer FHM wurden bereits 1910 beschrieben.¹⁰⁰ 1993 konnte dann schließlich ein pathophysiologischer Zusammenhang zu Genloci auf Chromosom 19 hergestellt werden.¹⁰¹ Nach aktuellem Wissensstand sind für die Erkrankung Mutationen in überwiegend drei Genen identifiziert (Stand 2019): CACNA1A¹⁰², ATP1A2¹⁰³, und SCN1A¹⁰⁴.

Eine fehlerhafte Funktion eines der Transportproteine, die durch diese Gene kodiert werden, kann für die Ausprägung eines Phänotyps der Familiären Hemiplegischen Migräne verantwortlich sein. So wurde die FHM, abhängig vom betroffenen Gen, in drei Unterfamilien kategorisiert (FHM1-3).⁷⁹

1.2.2.1 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 1 (FHM1)

Dem Phänotyp der FHM1 liegt eine Mutation im CACNA1A Locus auf Chromosom 19 zugrunde. Bei dem durch dieses Gen exprimierten Protein handelt es sich um die α_1 -Untereinheit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle des P/Q-Typs.^{101,102} Diese Kalziumkanäle befinden sich überwiegend in präsynaptischen Membranen glutamaterger als auch GABAerger terminaler Dendriten kortikaler Neurone. Aber auch in den Ganglien des N. trigeminus, in den Nuclei des Hirnstamms und im Kleinhirn tragen Ca_v 2.1-Kanäle maßgeblich zur synaptischen Reizübertragung bei.¹⁰⁵

In den bisher publizierten FHM1-Familien konnten mehr als 30 unterschiedliche Mutationen im CACNA1A Locus identifiziert werden.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Die Mutationen des CACNA1A Gens bewirken in den meisten Fällen ein erhöhte Offenwahrscheinlichkeit (sog. gain-of-function-Mutation) des Ca^{2+} -Kanals. Daraus ergibt sich ein erhöhter zellulärer Kalziumeinstrom, der die Ausschüttung exzitatorischer, glutamaterger Neurotransmitter verstärkt. Eine Konsequenz dieses verstärkten exzitatorischen Signals ist das vermehrte Auftreten kortikaler Streudepolarisationen.^{64,109-111}

Eine Studie von *Eickermann-Haerter et al.* bestätigte 2012 diesen Sachverhalt mithilfe von Knock-in Mäusen einer transgenen Linie für die Mutationen R583Q und S218L. Im Vergleich zu Wildtyp Tieren, zeigten Mäuse der homozygoten S218L Linie in einer 150min. elektrophysiologischen Messung ab 30 min. eine insgesamt signifikant erhöhte Anzahl an PIDs. Mäuse mit S218L Mutation zeigten darüber hinaus eine signifikant größere Gesamtzahl an PIDs im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe. Diffusionsgewichtete MRT Aufnahmen von Wildtyp Tieren und homozygoten FHM1 Mäusen (S218L, R192Q) zeigten im Versuch eine signifikant größere Schlaganfallläsion im hyperakuten ischämischen Infarkt. Das aus dem ADC (Diffusionskoeffizienten) errechnete Schlaganfallvolumen in Abhängigkeit von der Zeit unterstützte die Beobachtung.⁶⁴

1.2.2.2 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 2 (FHM2)

Bei der Familiären Hemiplegischen Migräne des Typ 2 befindet sich die zugrundeliegenden Mutationen im ATP1A2 Gen auf Chromosom 1q23. Bei dem durch das ATP1A2 Gen kodierte Protein handelt es sich um die α_2 -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase.¹⁰³

Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein Membranprotein, das aus einer α -Untereinheit, welche die katalytische Funktion einnimmt, und eine β -Untereinheit, welche als Hilfsprotein fungiert, besteht.¹¹² Vier Isoformen der α -Untereinheit α_1 - α_4 kommen dabei im Menschen vor.¹¹³ Die α_2 -Isoform findet sich hauptsächlich im ZNS (hier vor allem in Astrozyten), aber auch in kardialen Myozyten.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Die Na^+/K^+ -ATPase trägt in jedem Organ zu der Aufrechterhaltung des intra-/extrazellulären Ionengradienten bei. Die Hydrolyse eines ATP Moleküls liefert Energie für den aktiven Transport von drei Na^+ -Ionen aus und zwei K^+ -Ionen in die Zelle. Über diesen kontinuierlich aktiv aufrechterhaltenen Ionengradienten wird einerseits die Funktionsfähigkeit und Erregbarkeit, aber auch das Volumen einer Zelle reguliert.¹¹⁷ In Astrozyten ist die Na^+/K^+ -ATPase durch die Regulation des extrazellulären Kaliums auch an der Entfernung von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt beteiligt.¹¹⁸ Des Weiteren ist die intrazelluläre Na^+/K^+ -Konzentration eng mit der Funktionsfähigkeit anderer Ionentransporter verwoben. Zu nennen wären hier unter anderem der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter.^{119, 120}

Neben 45 bisher kartierten Mutationen des ATP1A2 Gens, werden regelmäßig neue Mutationen, die mit FHM2 assoziiert sind, entdeckt. Die aktuelle Anzahl der bekannten Loci beläuft sich momentan auf mehr als 60.⁸⁶

Im Fall der FHM2 resultiert die Mutation in einem Verlust der Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase (eng. loss-of-function).^{103,122} Daraus ergibt sich eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration und ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration. Es resultiert eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Auslösung kortikaler Streudepolarisationen (vgl. Kapitel 1) und eine erhöhte Erregbarkeit von Nervenzellen durch den vermehrten Influx von Ca⁺-Ionen über den kompensatorisch aktivierten Na⁺/Ca²⁺-Antiporter.^{53,123,124}

Diese Hypothese konnte 2011 anhand einer transgenen Mauslinie bestätigt werden. Heterozygote Mäuse mit einer Knock-In-Mutation (W887R) im ATP1A2 Gen, zeigten experimentell eine signifikant erhöhte Auslösewahrscheinlichkeit für CSDs. Des Weiteren war die Ausbreitungsgeschwindigkeit der gemessenen CSD im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich erhöht.¹²⁴

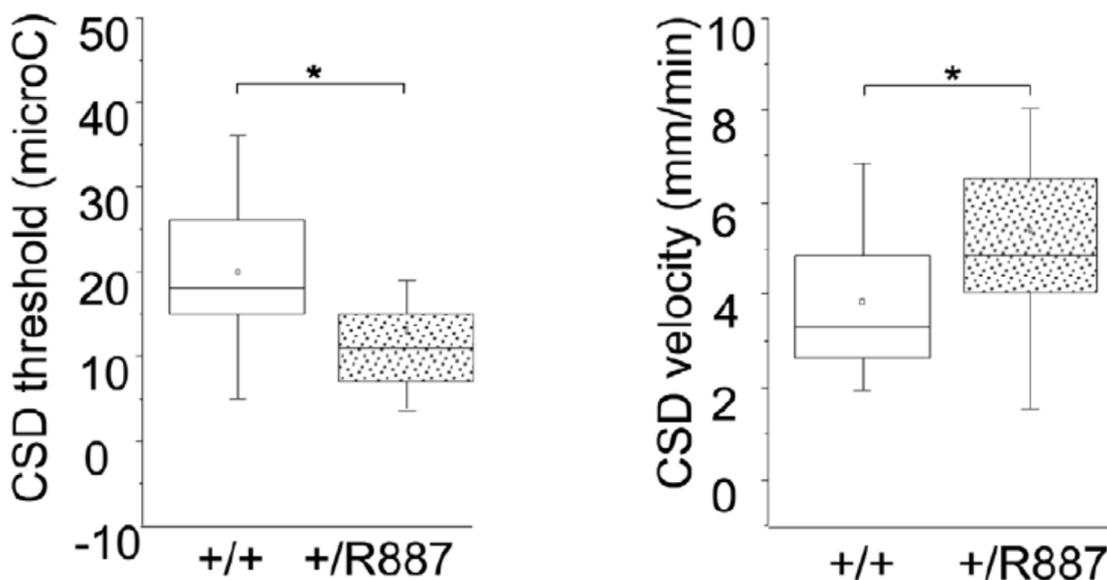


Abb. 4: CSD-Schwelle und Geschwindigkeit in einer transgenen FHM2-Mutante. Heterozygote Mäuse (+/R887) zeigten mit 13.00 ± 1.7 mC eine geringere Schwelle für das Auslösen kortikaler Streudepolarisationen als wt-Tiere (+/+ : $19,9 \pm 1.9$ mC). In wt-Mäusen ausgelöste CSDs waren im Vergleich zur +/R887-Gruppe außerdem deutlich langsamer (+/+ : 3.85 ± 0.35 mm/min, +/R887: 5.41 ± 0.41 mm/min).¹²⁴

(Abbildung aus: Leo, L. et al. 2011¹²⁴)

Diese Schlussfolgerung wurde 2018 von Unekawa *et al.* in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt. Eine transgene Mauslinie mit einer defekten α_2 -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase (C-KO, N-KO) zeigte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine erhöhte Frequenz an CSDs nach kortikaler Applikation von KCl.¹²⁵

1.2.2.3 Familiäre Hemiplegie Migräne Typ 3 (FHM3)

Die erste Mutation der FHM3, Q1489K, wurde erstmals 2005 durch *Dichgans et al.* beschrieben und konnte im SCN1a Gen auf Chromosom 2q24 kartiert werden.¹⁰⁴

Das vom SCN1a Gen kodierte Protein ist die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.1$. Dieser Na-Kanal wird im Kortex und Hippocampus, hier insbesondere von inhibitorischen Interneuronen aber auch von glutamatergen Pyramidenzellen exprimiert.¹²⁶⁻¹²⁸ Strukturell sind $\text{Na}_v1.1$ -Kanäle aus vier Domänen (DI-DIV) mit jeweils 6 transmembranalen Segmenten (α -Helices, S1-S6) aufgebaut. Funktionell ergibt sich daraus eine funktions- und porenbildende α -Untereinheit sowie zwei akzessorische β -Hilfsproteine.^{104,128,129}

Natriumkanäle spielen eine maßgebliche Rolle bei der Auslösung und Fortleitung von Aktionspotentialen.¹²⁹ Daher äußern sich Mutationen dieses Gens nicht nur als FHM3, sondern auch als schwere frühkindliche myoklonische Epilepsie, dem Dravet-Syndrom, als generalisierte Epilepsien mit Fieberkrämpfen und als Rett-Syndrom.^{130,131}

Die Anzahl der bisherig entdeckten FHM3 Mutationen beläuft sich aktuell auf mehr als 10 Loci. Abgesehen von Mutationen, die isoliert bei der FHM3 auftreten (z.B. I1498M und F1661L), stehen einige zusätzlich im Zusammenhang mit schweren epileptischen Anfällen (L263V, T1174), sowie intermittierender Blindheit (Q1489H, F1499L), welche zeitlich völlig unabhängig von den Migräneattacken auftreten können.^{127, 132-136}

Bei den SCN1a-Mutationen, die zu Epilepsien führen, handelt es sich meist um loss-of-function-Mutationen.^{128,137} Da $\text{Na}_v1.1$ -Kanäle hauptsächlich in der Membran inhibitorischer Interneurone vorkommen, fällt deren hemmende Wirkung weg und es kommt zu einer Hyperexzitabilität des neuronalen Netzwerks. Mutationen im SCN1a Gen, die für die Ausprägung einer FHM3 verantwortlich sind, wurden hingegen als gain-of-function-Mutationen charakterisiert.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Dies war anfangs unerwartet, da die FHM3 mit Auren bzw. einer erhöhten CSD-Auslösewahrscheinlichkeit vergesellschaftet ist und bis dato eine erhöhte Aktivität von inhibitorischen Interneuronen nicht mit der Auslösung CSDs in Verbindung gebracht wurde.

Ein mögliches Erklärungsmodell ist eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration durch die Hyperexzitabilität von Interneuronen. Dieser Sachverhalt konnte bereits an Interneuronen des Hippocampus demonstriert werden.¹⁴¹ Darüber hinaus konnte experimentell für GABA, abgesehen von einer inhibitorischen, auch eine exzitatorische Funktion nachgewiesen werden.¹⁴² Zuletzt betrifft die gain-of-function-Mutation der $Na_v1.1$ -Kanäle auch exzitatorische glutamaterge, pyramidale Neurone.¹³⁹ Diese Aspekte erklären vermutlich auch die Existenz epileptogener SCN1a-Mutationen, welche ebenfalls auf einer gain-of-function-Mutation basieren.¹⁴³

Die Auswirkung einer FHM3-Mutation auf die Frequenz, Schwelle sowie Ausbreitungsgeschwindigkeit von kortikalen Streudepolarisation wurde bis dato (Stand 2019) in vivo noch nicht untersucht.

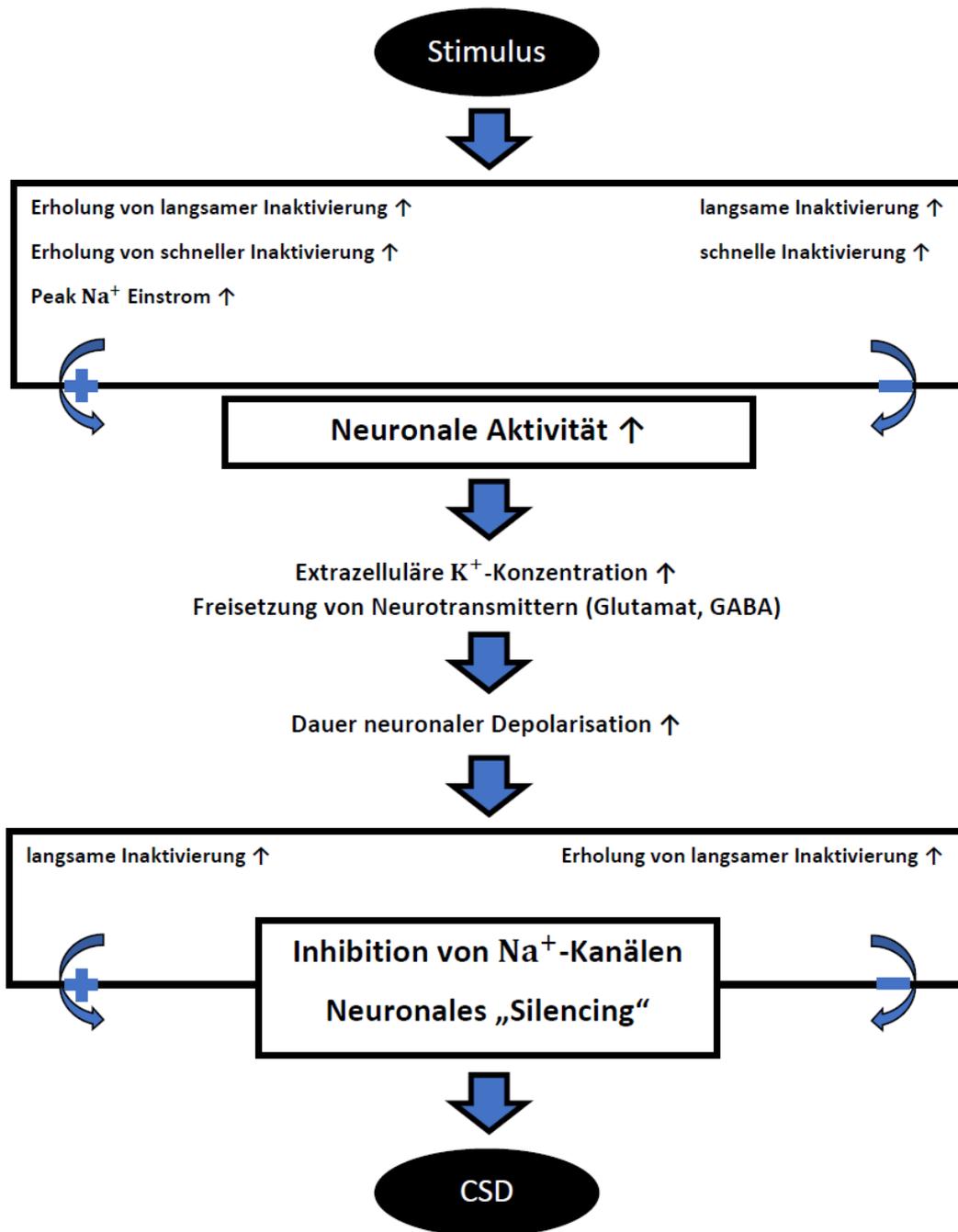


Abb. 5: Auswirkung der *SCN1a* gain-of-function-Mutation auf *Na_v1.1*-Kanäle, für den Genlocus Q1748. Basierend auf experimentellen Erkenntnissen einer TSA-201 Zelllinie (humane Nierenzell-Linie).¹³⁹

(Abbildung in das Deutsche übersetzt und modifiziert nach: Cestèle, S. et al. 2003¹³⁹)

Neuronale Zelllinien mit der Mutation im Locus Q1498K (s. Abb. 5) zeigten eine schnellere Erholung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle nach Inaktivierung. Daraus lässt sich auf eine erhöhte Rate neuronaler Aktivität schließen, die zu einer erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentration und einer erhöhten GABA-Konzentration führt. Ersteres führt wahrscheinlich direkt zu einer erhöhten Rate kortikaler Streudepolarisationen (vgl. Kapitel 1), während Letzteres durch Suppression neuronaler Signale (eng. neuronal silencing) weitere CSD-Ereignisse begünstigen kann. Ein weiterer Effekt der hohen GABA-Ausschüttung ist die verstärkte Öffnung postsynaptischer GABAerger Cl^- -Kanäle, die zu einer Erschöpfung des Cl^- -Gradienten führt und über die Verschiebung des Membranpotentials vermutlich ebenfalls die Entstehung von CSDs begünstigt. ¹³⁹

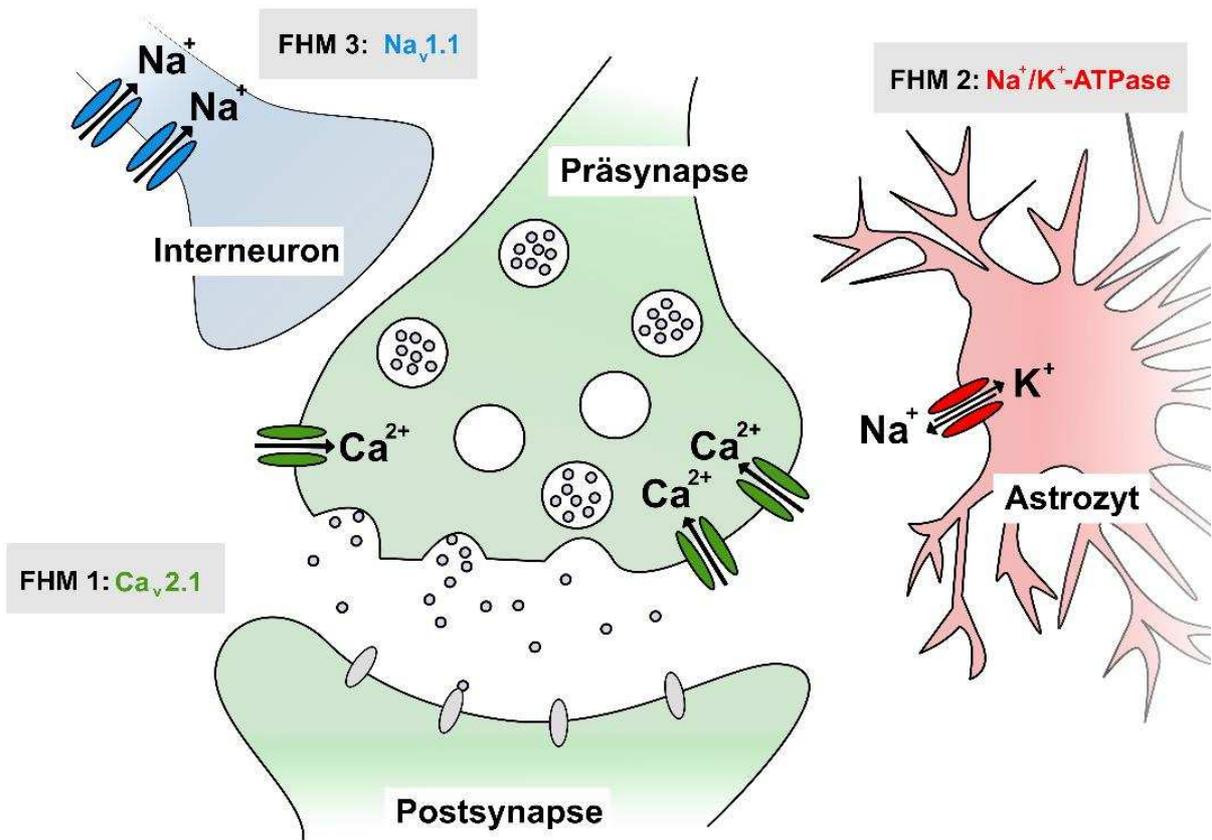


Abb. 6: Schematische Darstellung von der FHM betroffene Strukturen. **FHM1:** Die von einer gain-of-function Mutation betroffenen $\text{Ca}_v 2.1$ -Kanäle befinden sich überwiegend präsynaptisch auf exzitatorischen Neuronen. Ein vermehrter Ca^{2+} -Influx und die Freisetzung von Glutamat trägt maßgeblich zur Entstehung von CSDs bei. **FHM2:** Eine loss-of-function Mutation der astrozytären Na^+/K^+ -ATPase, erhöht signifikant die Wahrscheinlichkeit von CSDs. Dies geschieht vor allem durch eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration, sowie einer gestörten intrazellulären Ionen-Homöostase. **FHM3:** Eine gain-of-function Mutation von $\text{Na}_v 1.1$ an GABAergen Interneuronen, erhöht die Wahrscheinlichkeit von CSDs über eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration, sowie durch den Neurotransmitter GABA.

(Abbildung modifiziert nach: Russel, M. B., Ducros, A. 2011⁸⁶)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In Anbetracht der vorliegenden Datenlage stellte sich die Frage, ob eine FHM3-assoziierte gain-of-function-Mutation von $\text{Na}_v1.1$ -Kanälen, die auf GABAergen Interneuronen exprimiert werden, die Suszeptibilität des sonst gesunden Gehirns hinsichtlich kortikaler Streudepolarisationen beeinflusst. In einer weiteren Versuchsreihe wollen wir untersuchen, ob diese Mutation auch pathologische CSDs beeinflusst, die nach einem ischämischen Schlaganfall auftreten (Periinfarktdepolarisationen). Nach aktuellem Wissen, sollten mehr CSDs zu einem größeren Hirnschaden nach zerebraler Ischämie führen.

Bezüglich dieser Fragestellung wurde vor der Durchführung der experimentellen Studie folgende **Hypothese** formuliert:

Die gain-of-function Mutation von $\text{Na}_v1.1$ -Kanälen führt zu einer erniedrigten Schwelle für kortikale Streudepolarisationen im gesunden als auch im ischämischen Gehirn.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine in unserem Institut generierte SCN1a Mausmutante verwendet.

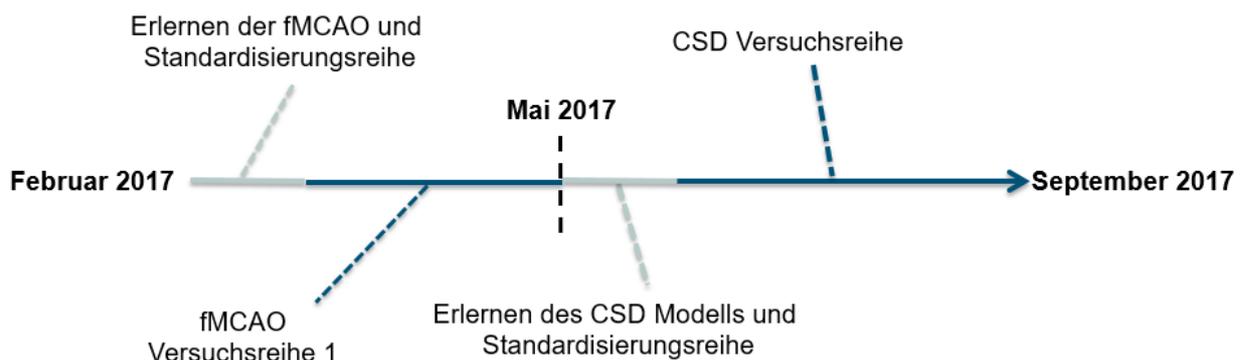


Abb. 7: Darstellung des Projektzeitplans

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche wurden 7–9 Wochen alte männliche und weibliche Mäuse mit einer heterozygoten Mutation (L1649Q) im SCN1a-Gen, sowie Wildtyp-Tiere verwendet, die in unserem Institut generiert wurden. Dieser Genlocus wurde von *Vanmolkot et al.* bereits 2007 in einem nordamerikanischen Patientenkollektiv isoliert.¹³⁸ Für die zwei Versuchsreihen verwendeten wir jeweils 20, also insgesamt 40 Versuchstiere. Hiervon wurden pro Versuchsreihe jeweils 10 heterozygote und 10 Wildtyp-Mäuse untersucht. Das Gewicht der Tiere betrug in der fMCAo-Versuchsreihe 18–27 g, in der CSD-Versuchsreihe 23–30 g.

Die im Folgenden beschriebenen Prozeduren befanden sich alle im Einklang mit den Richtlinien der Regierung von Oberbayern für die Durchführung von Tierversuchen.

2.2 Prämedikation und Narkose

Für die beiden Versuchsreihen wurden unterschiedliche Narkoseprotokolle verwendet. In beiden Fällen wurden die Mäuse zwei Stunden vor OP-Beginn mit Buprenorphin (1 mg/kg Körpergewicht s.c.) prämediziert und die Narkose in einer Narkosekammer aus Plexiglas (Aesica Queenborough Limited, Queenborough, Kent, Vereinigtes Königreich) mit 4% Isofluran in 30% Sauerstoff und 66% Stickstoff eingeleitet.

Während der Durchführung der fMCAo wurden die Mäuse mithilfe einer Maskenbeatmung mit 2% Isofluran in 50% Sauerstoff und 48% Stickstoff in Narkose gehalten. Die Versuchstiere zur Messung der kortikalen Streudepolarisationen wurden orotracheal intubiert und mit 1,5% Isofluran in 50% Sauerstoff und 48,5% Stickstoff mechanisch beatmet (s. 2.3 bis 2.5). Weitere physiologische Parameter (Körpertemperatur, Ventilationsverhältnisse, Blutdruck) wurden während der Durchführung ebenfalls kontinuierlich überwacht.

2.3 Temperaturmessung

Die Überwachung und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde durch ein rückgekoppeltes System (DC Temperature Controller, FH) bewerkstelligt. Eine rektal platzierte Messsonde hielt dabei über eine Heizmatte, auf der die Versuchstiere sich während der gesamten chirurgischen Prozedur befanden, die Temperatur konstant auf 37°C. Das Einleiten operativer Prozeduren wurde in allen Experimenten erst begonnen, nachdem eine physiologische Körperkerntemperatur von 37°C erreicht wurde.

2.4 Ventilation

Die Beatmung wurde durch zwei Methoden gewährleistet:

Um nach Durchführung einer fMCAo ein schnelles Erwachen der Tiere zu ermöglichen, wurden die Mäuse dieser Versuchsgruppe während der 30-minütigen operativen Prozedur stetig in Rücken- bzw. Bauchlage über eine Maske beatmet. Die Ventilation erfolgte hierbei über ein Zuluft-Abluftsystem passiv durch die Atembewegung der Tiere selbst.

Die orotracheale Intubation war während der etwa 3-stündigen CSD-Experimente Methode der Wahl. Nach Narkoseeinleitung wurden die Mäuse kurz in einer abgeschlossenen Anästhesiekammer mit 4% Isofluran narkotisiert (s. Kapitel 2.2) und dann zügig mithilfe eines Mikroskops laryngoskopiert und mit einer angepassten 20 G Braunüle orotracheal intubiert. Ein daraufhin angeschlossenes MiniVent-Ventilationssystem (MiniVent Type 845; HUGO SACHS ELEKTRONIK-. HARVARD APPARATUS GmbH) wurde zur Steuerung der Atemfrequenz und Atemzugvolumen verwendet. Die während der Messung angestrebten Werte von etwa 120–160 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 200 µl wurden dem Gewicht der Mäuse sowie an die jeweiligen Vitalparameter angepasst. Ferner wurde der endexpiratorische pCO₂ kontinuierlich aufgezeichnet (Capnograph Type 340; HUGO SACHS ELEKTRONIK-. HARVARD APPARATUS GmbH) und zur Steuerung der Ventilationsparameter verwendet. Angestrebt wurde ein pCO₂ von 30 mmHg. Finale Blutgasanalysen erfolgten nach Ablauf der Versuchsdauer durch Entnahme arteriellen Blutes aus einem Katheter in der A. femoralis (RapidLab 348, Siemens).

2.5 Blutdruckmessung

Die Messung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) erfolgte über einen Katheter in der rechten A. femoralis. Dabei wurde zunächst die A. femoralis von Nerv und Vene freipräpariert und anschließend distal mit einem Faden legiert (5-0, Ti-Cron, Covidien). Nach vorübergehendem proximalem Anbringen eines Clips, wurde die Arterie mit einer Gefäßschere eröffnet und mit einem zuvor präparierten, und heparinisierten Kunststoffkatheter (Innendurchmesser: 0,01“, Außendurchmesser: 0,02“) kanüliert. Der Clip wurde im nächsten Schritt entfernt, der Katheter weiter vorgeschoben und anschließend mit einem weiteren Faden und Sekundenkleber (MAXI-CURE Cyanoakrylat, Drechslein&Mehr) an der Arterie befestigt. Um den Blutdruck stabil zu halten, wurden dem Versuchstier über die gesamte Versuchsdauer 0,05–0,07 µl/min 0,9% NaCl Lösung infundiert. Der mittlere arterielle Blutdruck wurde digitalisiert und mit einer Frequenz von 2 Hz aufgezeichnet (LabChart; AD Instruments). Es wurde ein Wert von 70 mmHg angestrebt.

2.6 Messung der zerebralen Perfusion

Um den erfolgreichen Verschluss der A. cerebri media sicherzustellen, als auch die zerebrale Perfusion während der elektrophysiologischen Messungen zu quantifizieren, wurde in beiden Versuchsreihen eine Laser-Doppler-Fluxometrie (Periflux 4001; Perimed) durchgeführt. Eine etwa 20 cm lange Sonde wurde direkt auf die exponierte Kalotte oberhalb des Versorgungsgebietes der A. cerebri media aufgesetzt und mithilfe eines Sekundenklebers (MAXI-CURE Cyanoakrylat, Drechslein&Mehr) fixiert.

Absolute Messwerte über 100 Perfusionseinheiten (PU) wurden angestrebt. Ein Abfall des Messwertes nach operativem Verschluss der A. cerebri media auf ca. 10% des Ausgangswertes wurde als erfolgreiche Okklusion gewertet. In der CSD-Versuchsgruppe wurden mithilfe dieser Methode Veränderungen in der zerebralen Perfusion während der CSD-Ereignisse detektiert und aufgezeichnet.

2.7 Euthanasierung

Am Ende des Versuchs wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation in tiefer Isofluran-Narkose getötet. Die Hirne wurden entfernt und für eine spätere Analyse bei -20°C eingefroren.

2.8 Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)

Um eine zerebrale Ischämie, ähnlich der eines ischämischen Schlaganfalls beim Menschen auszulösen, bedienten wir uns im Zuge unserer Experimente der fMCAo (eng. Filamentous Middle Cerebral Artery occlusion) nach Koizumi (s. Abb. 8).¹⁴⁴

Hierfür wurde die A. cerebri media mit einem endovaskulären Faden okkludiert. Zur Durchführung der Prozedur wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Ein gerader Scherenschnitt von der Oberkante des Brustbeins bis zum M. digastricus wurde durchgeführt und die subkutan liegenden Speicheldrüsen exponiert. Das linksseitige Gefäßnervenbündel bestehend aus A. carotis communis, sowie V. jugularis und N. vagus wurde, ohne eine Blutung zu indizieren, freipräpariert. Im nächsten Schritt wurde die A. carotis communis nach kranial freigelegt und die Bifurkation sowie A. carotis externa und interna sorgfältig dargestellt. Um eine versehentliche Läsion des N. vagus zu verhindern, wurde dieser von der Arterie gelöst und aus dem Operationsfeld geschoben. Die erste Fadenligatur (5-0, Ti-Cron, Covidien) erfolgte kaudal an der A. carotis communis, eine weitere im nächsten Schritt an der A. carotis externa. Um eine gefahrlose Eröffnung der Arterie zu ermöglichen, wurde die A. carotis interna als letztmögliche Blutungsquelle vorübergehend mit einem Mikroclip abgeklemmt.

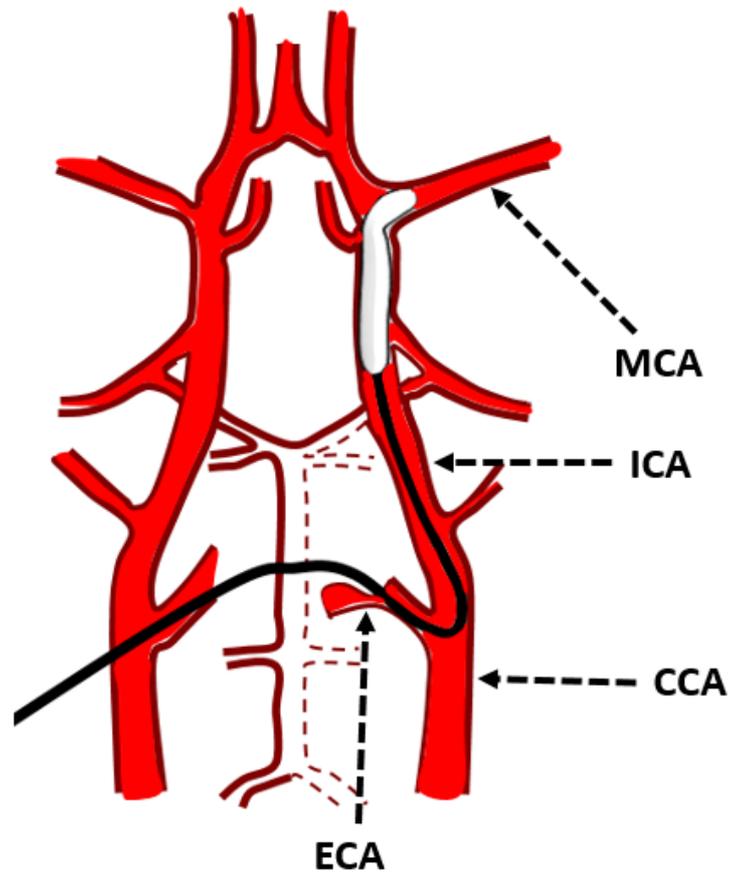


Abb. 8: Darstellung der Gefäßlage während einer fMCAo

Nach Eröffnung der A. carotis communis mit einer Gefäßschere wurde ein 12 mm langes Mikrofilament eingebracht und bis zum Aneurysma-Clip in die A. carotis interna vorgeschoben. Nachdem dieser entfernt wurde, gelang ein freies Vorschieben des Filaments bis in die A. cerebri media. Zeitgleich wurde auf einen Abfall der zerebralen Perfusion (anhand Laser-Doppler-Flux) geachtet. Ein Abfall auf unter 10% des Ausgangswertes wurde als erfolgreiche Okklusion gewertet. Nach Fixierung des Filaments mittels Fadenligatur wurde die OP-Wunde letztlich mit einer 5-0 Hautnaht (Ti-Cron, Covidien) verschlossen und die Narkose ausgeleitet. Das Versuchstier wurde anschließend in einem auf 37°C vorgeheizten Inkubator (MediHeat, ASCON Technologies) gehalten. Eine erste Untersuchung des neurologischen Defizits erfolgte nach dem Erwachen aus der Narkose.

Nach 60 Minuten wurde die Maus erneut narkotisiert und das Mikrofilament entfernt, um eine Reperfusion zu ermöglichen. Danach wurde das Versuchstier für weitere zwei Stunden in den Inkubator gelegt. Nach einer erneuten Evaluation des fokalneurologischen Defizites wurden die Mäuse 24 Stunden nach Beginn der Ischämie für histologische Untersuchungen euthanasiert.

2.8.1 Fokal-neurologisches Defizit

Um das fokalneurologische Defizit direkt nach Okklusion und 24 Stunden nach fMCAo zu quantifizieren, bedienen wir uns im Rahmen unserer Experimente der Bederson Skala.¹⁴⁵

Je nach Zustand der Versuchstiere wurden Punkte nach folgendem Schema verteilt

<u>Bederson Score</u>	<u>Bedeutung</u>
0	Kein neurologisches Defizit
1	Flexion der Vorderpfoten
2	Verminderte Abwehrreaktion*
3	Verminderte Abwehrreaktion mit „Circling“ (Kreisbewegung des Tieres)

* Es erfolgte eine Kraftausübung auf die Flanke des Versuchstieres mit einem Finger. Als verminderte Abwehrreaktion wurde ein Schieben des Versuchstiers ohne erkennbaren Widerstand gewertet.

Tab. 1: *Quantifizierung neurologischer Defizite nach Bederson*

2.8.2 Histomorphologische Aufarbeitung

Mithilfe eines Kryostaten (CryoStar Nx70, ThermoFisher Scientific) wurde ab 1500 µm vom vorderen Hirnpol entfernt alle 750 µm koronare Hirnschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Mit diesem Schnittschema wurden 12 Schnitte pro Versuchstier gewonnen. Nach Fixierung erfolgte das Anfärben der Hirnschnitte nach Nissl (s. Tab. 2).

<u>Lösung</u>	<u>Dauer</u>
70% Alkohol	2 min.
Nissl 1:5	15 min.
Aqua dest. (I)	Kurz spülen
Aqua dest. (II)	Kurz spülen
70% Alkohol	Kurz eintauchen/ spülen
96% Alkohol	Kurz eintauchen/ spülen
Abs. Alkohol	Kurz eintauchen/ spülen
100% Isopropanol	2 min. evtl. kurz eintauchen/ spülen
Rothistol (Xylol) (I)	5 min.
Rothistol (Xylol) (II)	5 min.

Tab. 2: Arbeitsschritte zur Färbung nach Nissl

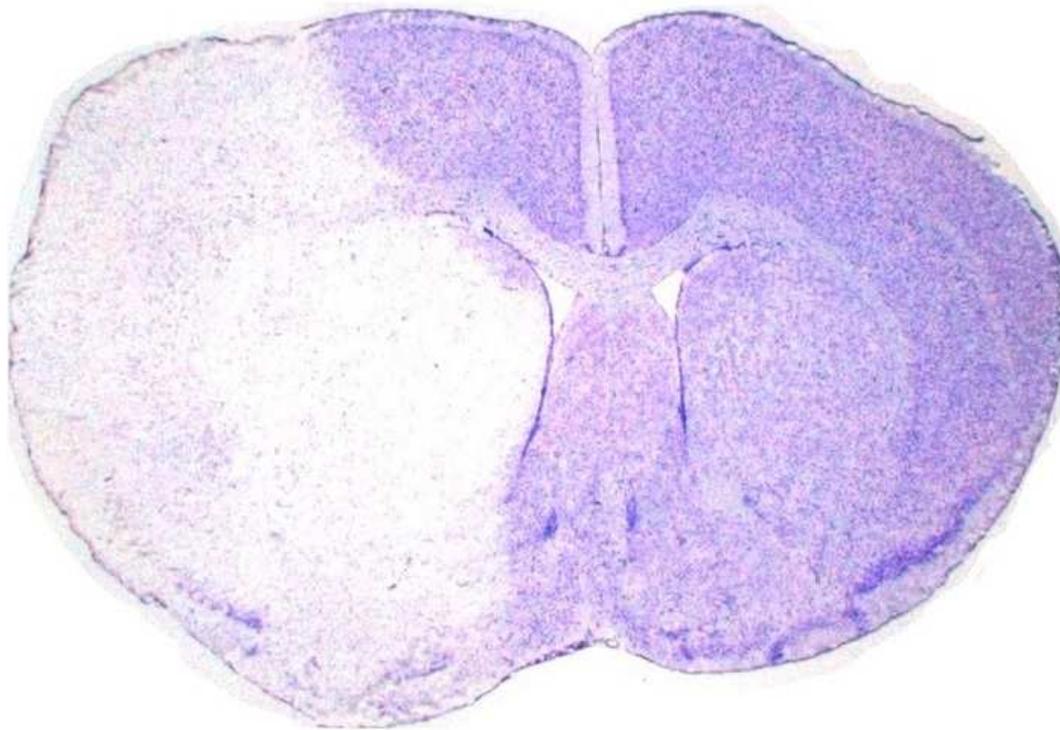


Abb. 9: *Mit Nissl-Färbung präparierter Gehirnschnitt nach fMCAo. Die Infarktfläche (weiß) zeichnet sich deutlich von gesundem Hirngewebe (violett) ab.*

2.8.3 Auswertung des Infarktolumens

Die nach Nissl gefärbten Hirnschnitte wurden in 15-facher Vergrößerung digitalisiert (AxioCam MRc, Zeiss) und softwarebasiert (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss) analysiert (s. Abb. 10). Durch manuelle Umfahrung wurde die Fläche der kontralateralen Hemisphäre (Fläche 1), der ipsilateralen Hemisphäre (Fläche 2) und des Infarkts (Fläche 3) bestimmt.

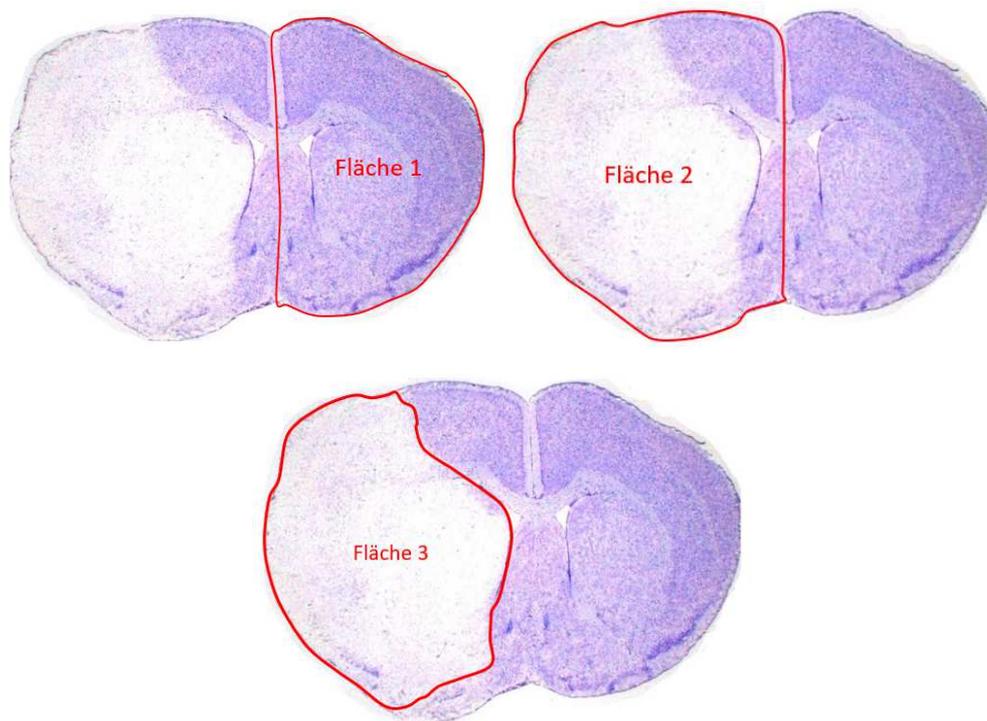


Abb. 10: Darstellung der Flächenbestimmung an einem gefärbten Gehirnschnitt.

Für die Bestimmung des Infarktolumens wurden die Infarktflächen in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{(Fläche 3}_{\text{Schnitt 1}} + \text{Fläche 3}_{\text{Schnitt 2}} + \dots + \text{Fläche 3}_{\text{Schnitt 12}}) \times 0,75 = \text{Infarktvol. in mm}^3$$

2.9 Versuchsreihe 2: Messung der CSDs

2.9.1 Versuchsdurchführung

Das Design der Versuchsreihe mit Bestimmung der Anzahl, Amplitudengrößen und Geschwindigkeit der CSDs erfolgte in zwei Schritten:

Schritt 1 war die Durchführung der fMCAo gemäß Versuchsreihe 1. Um ein nicht perfundiertes Infarktareal zu gewährleisten, wurde das Mikrofilament nicht nach 60 Minuten entfernt, sondern während der gesamten nachfolgenden Messung in der A. cerebri media belassen.

Nach fMCAo wurde die Maus sofort intubiert und die Narkose mit 1,5% Isofluran in 50% O₂ und 48,5% Stickstoff fortgesetzt. Anschließend wurde ein Femoralkatheter für die kontinuierliche Messung des MAP gelegt, das Tier für die nachfolgende elektrophysiologische Messung in einen stereotaktischen Rahmen fixiert und das Kranium freigelegt. Um Potentiale im Periinfarktgebiet ableiten zu können, wurden mithilfe eines Bohrers (Rewatronic Products, Wald-Michelbach) zwei Bohrlöcher mit den folgenden Koordinaten angelegt: 1,5 mm frontal und 1,5 mm lateral von Bregma sowie 2,5 mm occipital und 1,5 mm lateral von Bregma (s. Abb. 11).

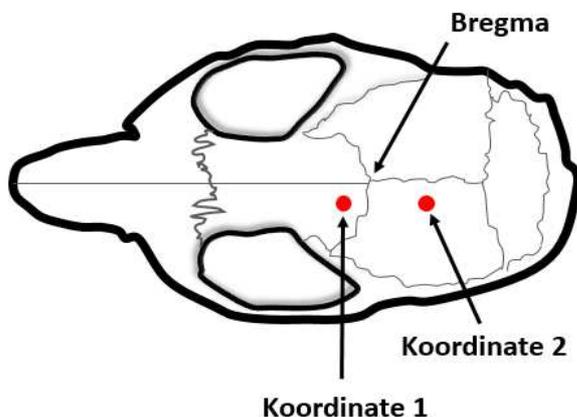


Abb. 11: *Darstellung des Schädels mit Bohrlochkoordinaten*

Auf eine Schonung der Dura mater während der Trepanation wurde genauestens geachtet. Nach Spülung der Kalotte wurden zwei mit 0,9% NaCl Lösung gefüllte Glaselektroden unter mikroskopischer Sicht bis zur Berührung der harten Hirnhaut in die Bohrlöcher platziert.

Um gleichzeitig die zerebrale Perfusion zu messen, wurde eine Laser-Doppler-Sonde auf die Kalotten-Oberfläche zwischen die beiden Glaselektroden geklebt. Die Durchführung einer artefaktarmen Messung wurde durch einen Faraday-Käfig sichergestellt, in welchem sich der stereotaktische Rahmen während der gesamten Messdauer befand.

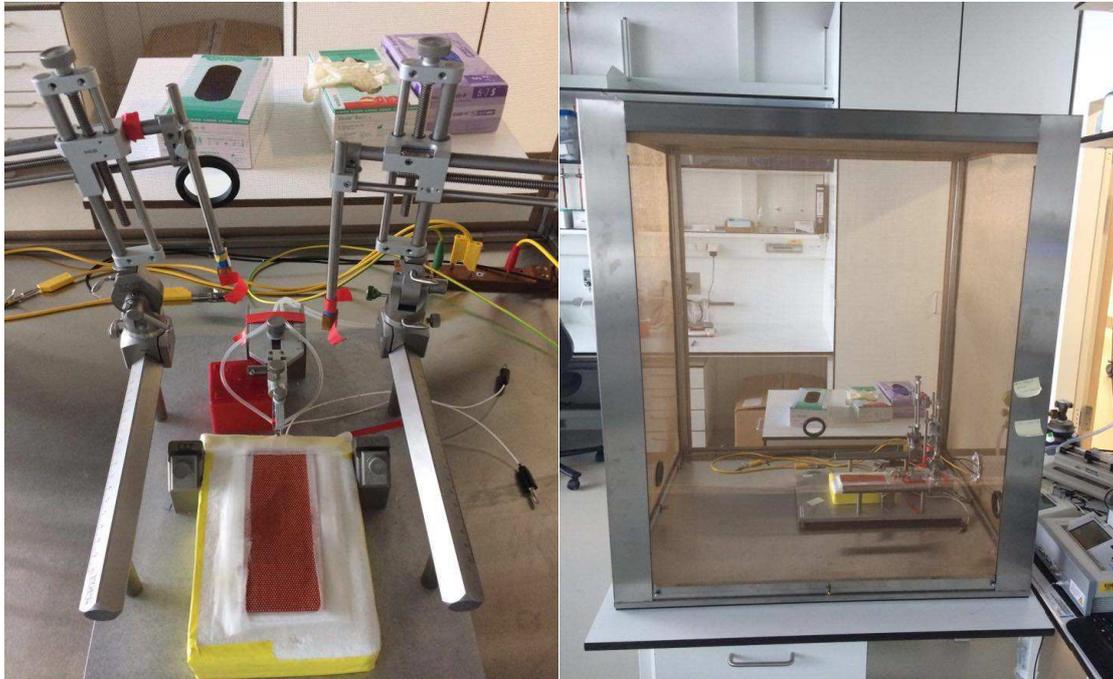


Abb. 12: links: stereotaktischer Rahmen, rechts: Farraday Käfig

Die Vorbereitung der Ag/AgCL Messelektroden erfolgte mittels sanfter Behandlung mit Sandpapier (feine Porung) und darauffolgender 30-minütiger Chlorierung (Dan Klorix Hygienereiniger). Unmittelbar vor dem Start der Messung wurden diese in die zuvor eingebrachten Glaselektroden eingetaucht. Als Referenzelektrode diente eine chlorierte Ag/AgCL-Plattenelektrode (Science Products GmbH; Diameter: 2 mm), die im subkutanen Fettgewebe im Nacken des Versuchstiers platziert wurde. Im ersten Schritt der Messung wurde der Kontakt mit der Dura mater durch ein konstant über drei Minuten abgeleitetes Potential in beiden Messkanälen bestätigt. Anschließend wurden die Elektroden 200 μm in das Hirnparenchym eingebracht. Mit Start der Aufzeichnung wurden die physiologischen Parameter, die Ableitungen der Elektroden 1 und 2, das EEG (hier EcoR, analog zu EcoG) für zwei Stunden aufgezeichnet. Nach Ende des Versuchs wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation in tiefer Narkose euthanasiert.

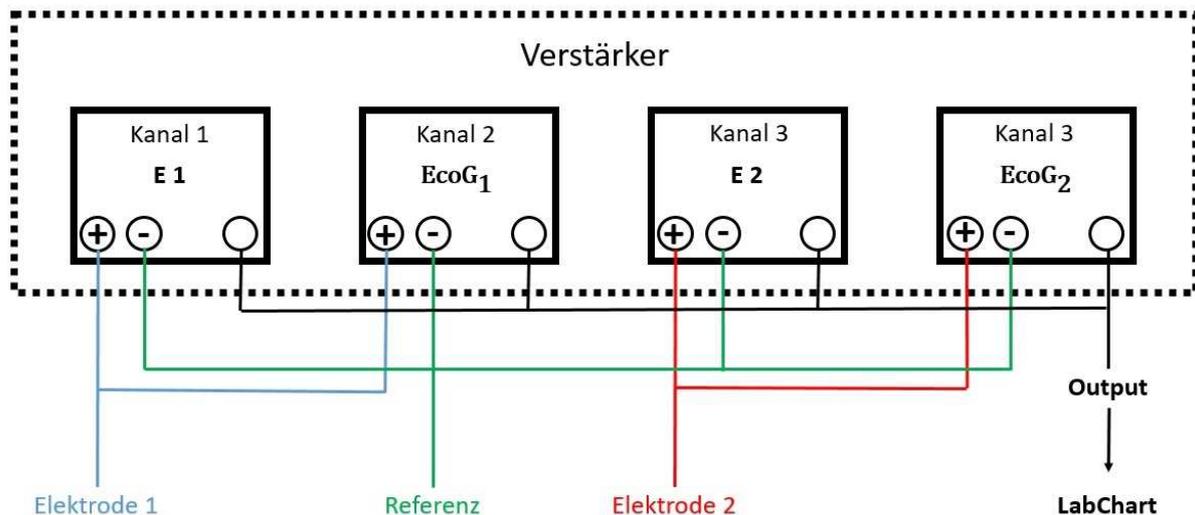


Abb. 13: Schaltskizze des Versuchsaufbaus mit abgebildetem Verstärker (DP-304A 4-Channel Amplifier; Warner Instruments). Die technischen Einstellungen der Kanäle waren wie folgt:

Kanal 1 High-Pass (Hz): DC; Low-Pass (Hz): 100, GAIN: 10

Kanal 2 High-Pass (Hz): 1.0; Low-Pass (Hz): 100, GAIN: 1K

Kanal 3 High-Pass (Hz): DC; Low-Pass (Hz): 100, GAIN: 10

Kanal 4 High-Pass (Hz): 1.0; Low-Pass (Hz): 100, GAIN: 1K

Die über Verstärker aufgenommenen Signale wurden anschließend an ein Gerät zur Messdatenerfassung (Power Lab 16/35; AD Instruments) übertragen und über ein BridgeAmp (AD Instruments) in LabChart (AD Instruments) aufgezeichnet. Jedes Experiment wurde randomisiert und verblindet durchgeführt.

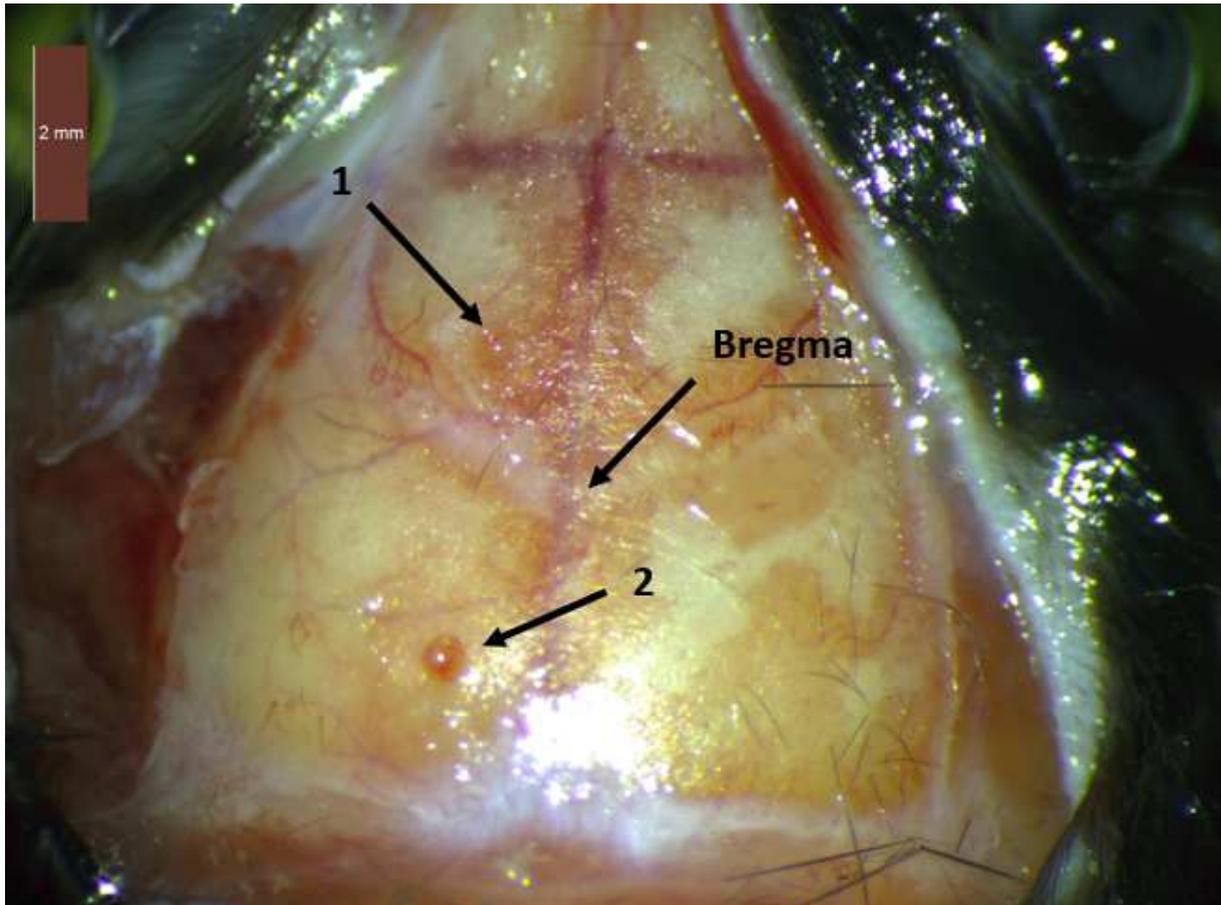


Abb. 14: Darstellung des Neurokraniums mit den zuvor mittels Trepanation gesetzten Bohrlöchern (1 und 2).

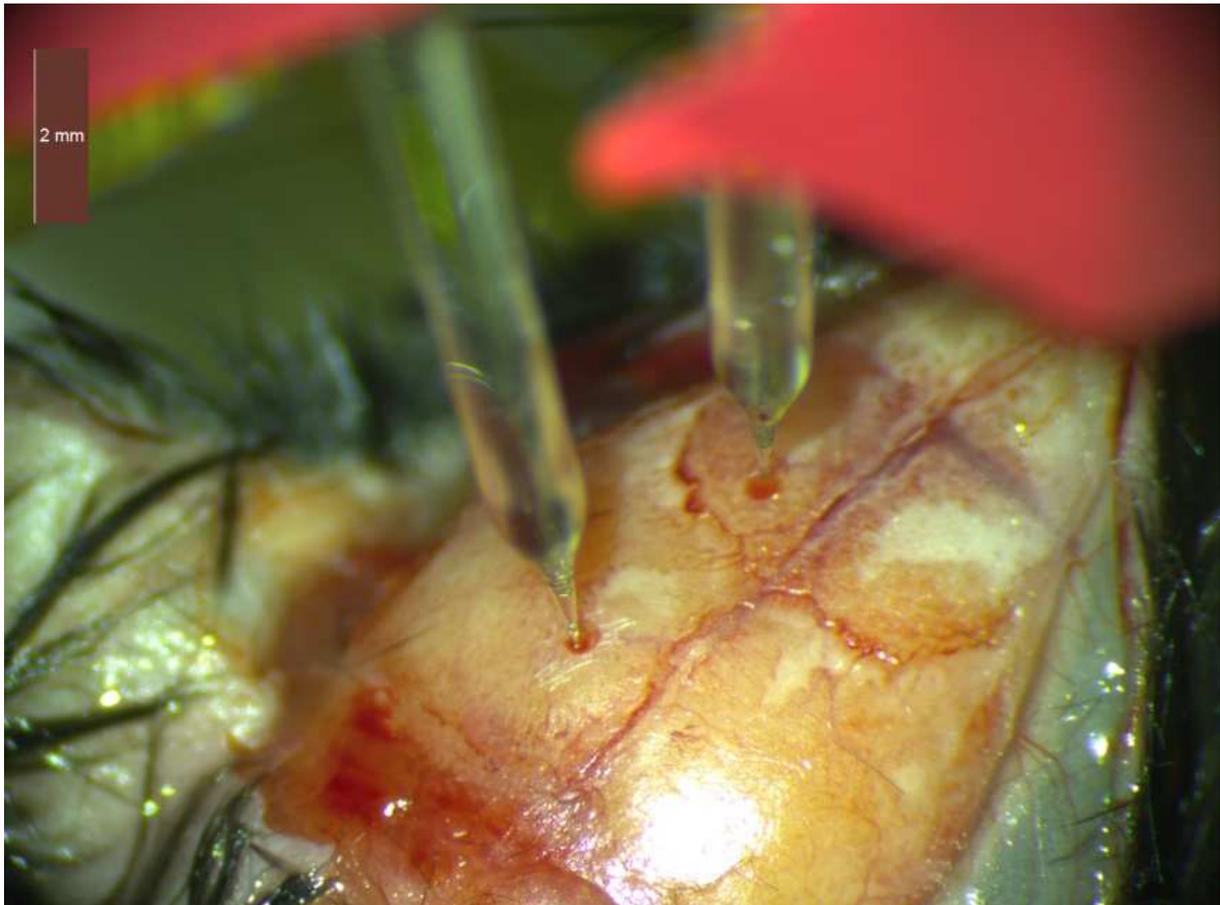


Abb. 15: Platzierung der mit 0,9% NaCl gefüllten Glaselektroden in den Bohrlöchern. Das Einbringen dieser bis zum Kontakt mit der Dura mater wurde über das Mikroskop sichergestellt. Die Tiefe des Kontaktpunktes wurde an der Mikrometer-Skala des stereotaktischen Rahmens abgelesen und vermerkt. Daraufhin wurden die Elektroden aus den Bohrlöchern entfernt, um während der anschließenden Umlagerung der Apparatur in den Faraday-Käfig eine Verletzung der harten Hirnhaut zu verhindern.

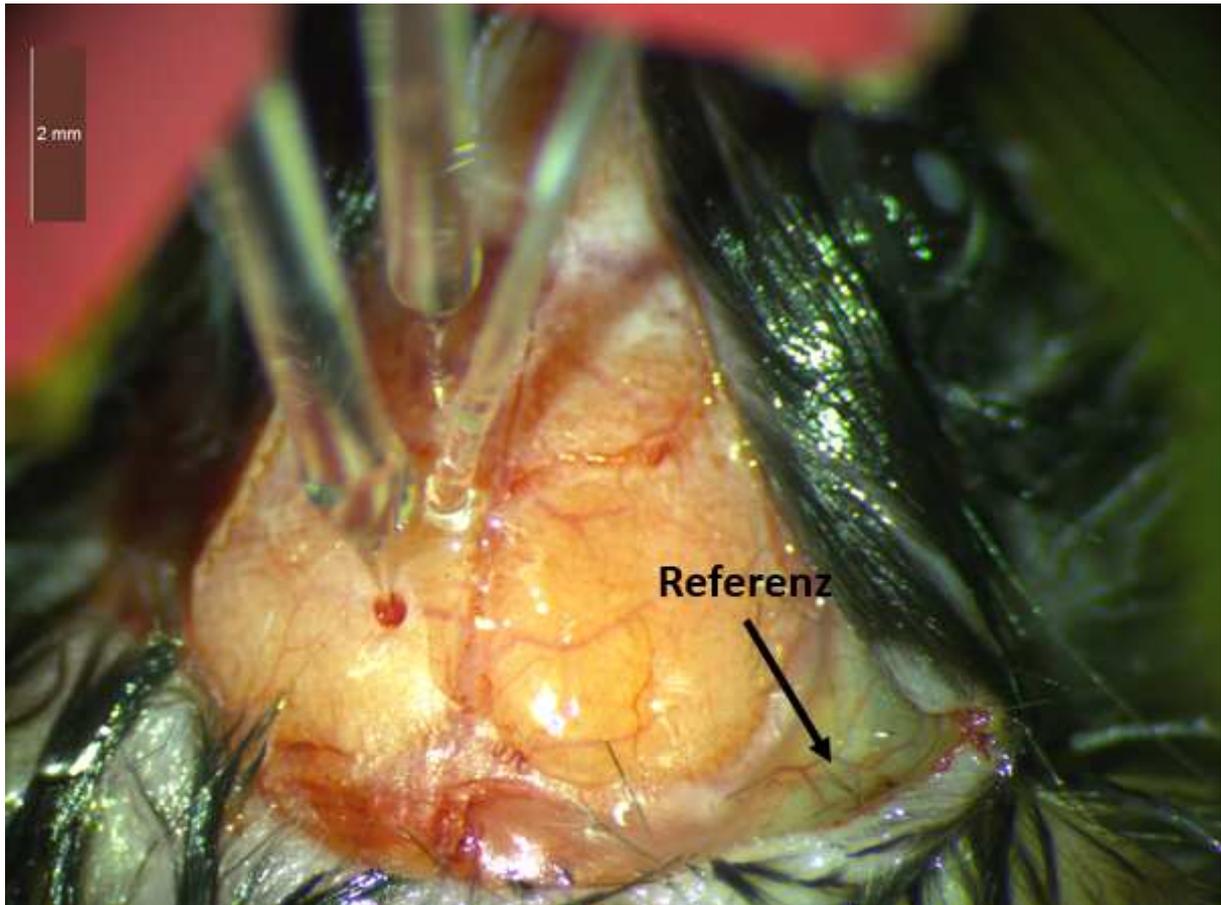


Abb. 16: Anbringung der LDF-Sonde zwischen den beiden Messelektroden. Im letzten Schritt vor Umlagerung des Versuchstieres in den Faraday Käfig wurde am rechten kaudalen Pol der Kalotte eine Hauttasche für die Referenzelektrode präpariert. Die LDF-Sonde wurde mithilfe von Sekundenkleber an der Kalotte zwischen den Glaselektroden angebracht.

2.9.2 Auswertung

Die Auswertung der elektrophysiologischen Messung erfolgte anhand von drei Parametern: Anzahl, Amplitude und Geschwindigkeit der jeweiligen CSDs.

Als CSD wurde jede signifikante, abrupte Negativierung des DC-Potentials um mindestens 10 mV mit darauffolgender langsamer Positivierung gewertet. Die Amplitude, sowie die Geschwindigkeiten der einzelnen CSDs wurden aus dem jeweiligen Messkanal ermittelt

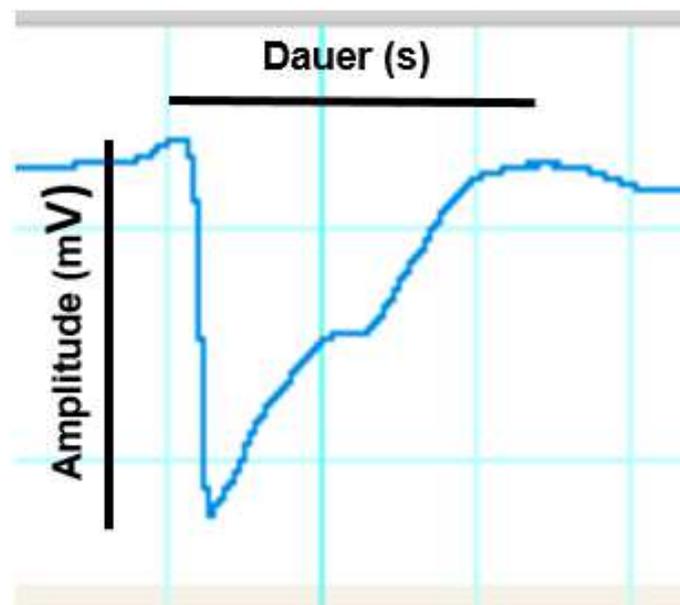


Abb. 17: CSD mit typischem abrupten DC-Shift und einer, daraufhin langsamen Repolarisation zur Baseline

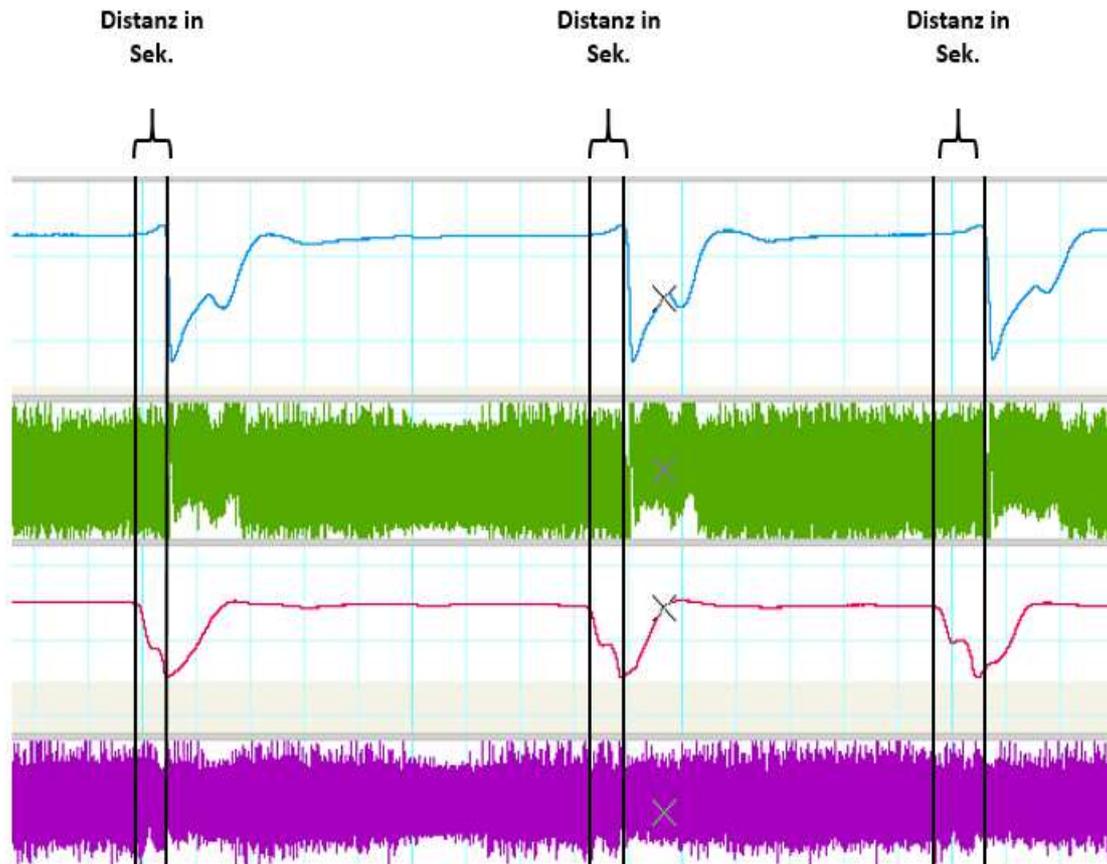


Abb. 18: Die Distanz der von beiden Elektroden aufgezeichneten CSDs in Sekunden wurde zur Berechnung der Geschwindigkeit bestimmt. Der Abstand der Messelektroden betrug aufgrund der festgelegten Bohrlochkoordinaten 4 mm. Durch die Propagation der Depolarisationswelle zeichnete eine Elektrode die CSD zuerst auf, während die zweite Elektrode den DC-Shift mit einer Latenz gemessen hat. Dieser zeitliche Unterschied erlaubte mit Einbezug der Entfernung der beiden Elektroden eine Berechnung der CSD-Geschwindigkeit.

2.10 Genotypisierung

Nach Euthanasierung wurden von jedem Tier 0,5 cm der Schwanzspitze gewonnen und bei 4°C aufbewahrt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte mithilfe eines PCR-Kits (AccuStar™ PCR Supermix, Quanta Biosciences™). Die einzelnen Schritte wurden wie im Reaktionsprotokoll beschrieben durchgeführt:

Reaktionsprotokoll

Initiale Denaturierung	94°C, 1–3 Minuten
PCR Zyklen (20–40)	94°C, 10–30 Sekunden
	55–65°C, 15–30 Sekunden
	68–72°C, 1 min. pro Kilobase
Hold	Aufbewahrung bei 4°C

Die Auftragung der Genprodukte erfolgte anschließend auf einem 3% Agarose Gel (3 g Agarose auf 100 ml TAE Puffer).

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS. Der Vergleich der Datensätze erfolgte mit Hilfe des t-Tests sowie Mann-Whitney-U-Test. Darüber hinaus wurden mehrfaktorielle Varianzanalysen (Kruskal-Wallis, ANOVA) angewandt. Sofern nicht anders beschrieben wurden sämtliche Ergebnisse als Mittelwert +/- SD angegeben. Die post-hoc Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte über Bonferroni-Korrektur. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ und einem Konfidenzintervall von 95% angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung der fMCAo

3.1.1 Infarkt volumina

Vor Durchführung der Versuchsreihen wurde zur Überprüfung der operativen Technik mit acht C57BL/6 Mäusen eine fMCAo Versuchsreihe mit 24 Stunden Überlebenszeit und nachfolgender neurologischer Evaluation durchgeführt.

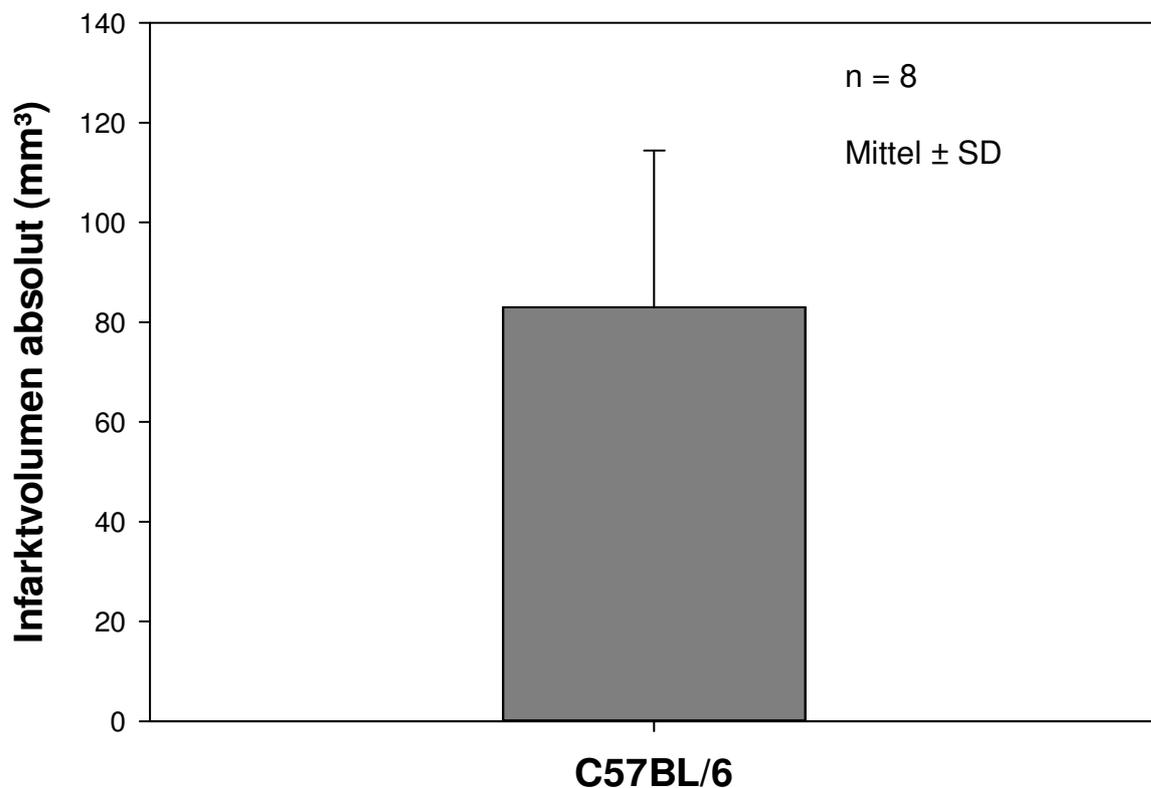


Abb. 19: *Infarktvolumen der Validierungsreihe*

Das durchschnittliche Infarktvolumen betrug 24 h nach fMCAo 83 ± 31 mm³, mit einer relativen Standardabweichung von 25% (s. Abb. 25).

3.1.2 Zerebrale Perfusion

Um eine regelrechte fMCAo zu gewährleisten, wurden die zerebrale Perfusion mittels Laser-Doppler-Fluorimetrie gemessen. Ein Abfall des LDF-Wertes auf weniger als 10% des Ausgangswertes wurde als Maß für einen vollständigen Verschluss der A. cerebri media angesehen (s. Abb. 20).

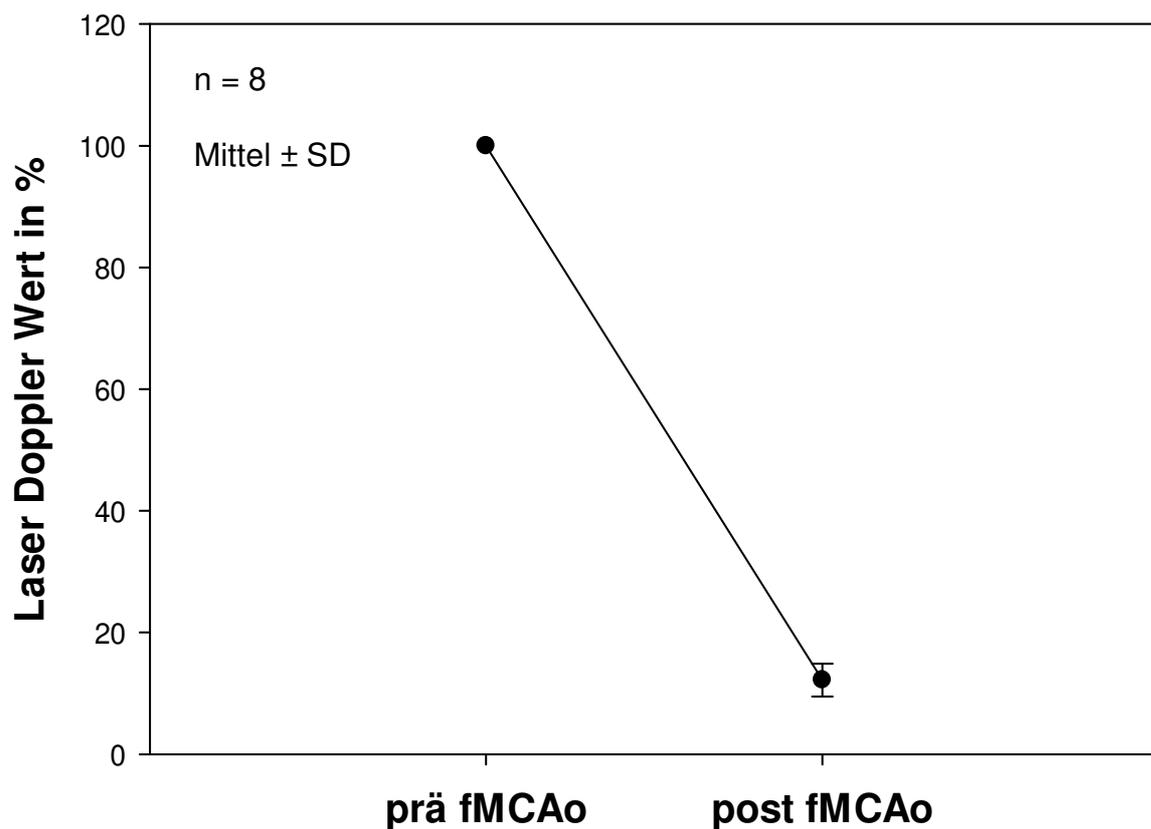


Abb. 20: Abfall des LDF nach fMCAo

Die Messwerte lagen zum Ausgangszeitpunkt durchschnittlich bei 132 ± 27 PU und fielen nach Okklusion der MCA auf 16 ± 5 PU, d.h. auf 12% der des Ausgangswertes.

3.1.3 Gewicht

Das Gewicht der Versuchstiere wurde vor und 24 Stunden nach fMCAo gemessen.

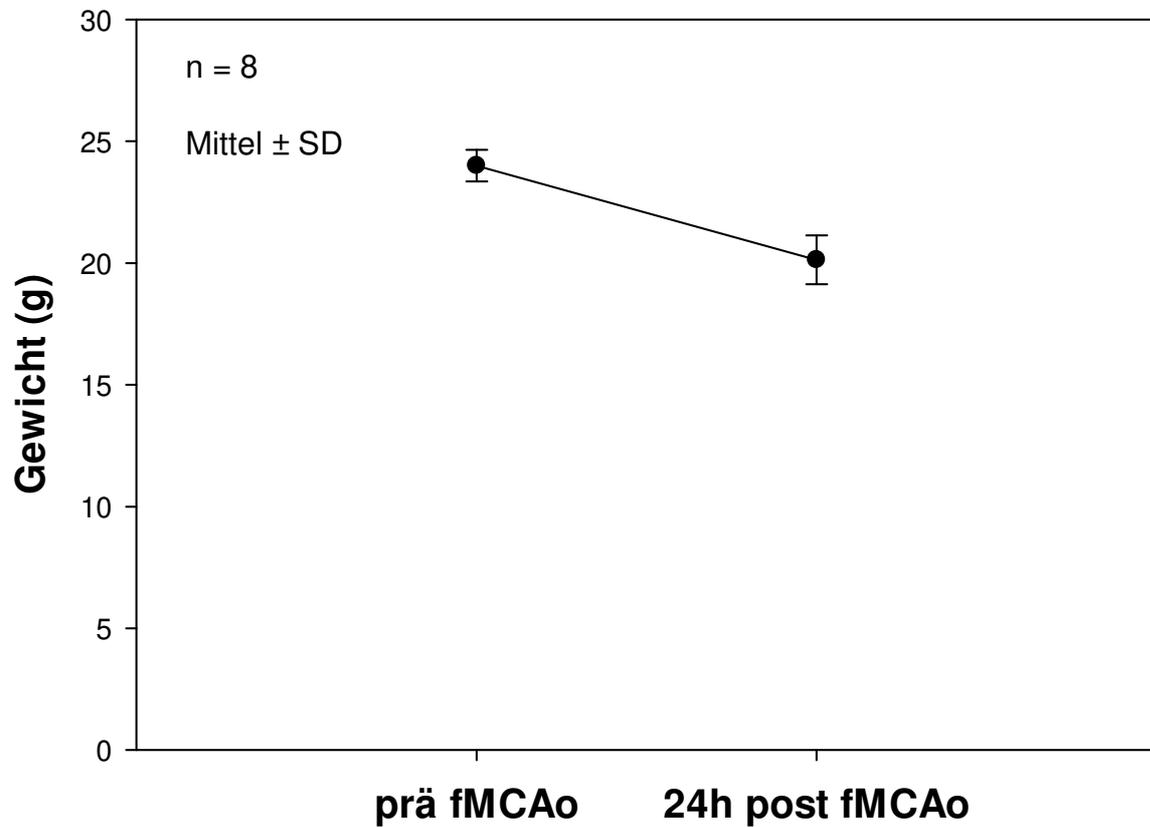


Abb. 21: Gewichtsverlust 24 Stunden nach fMCAo

Innerhalb von 24 h fiel das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere von 24 ± 1 g auf 20 ± 1 g ab. Das entsprach einem Gewichtsverlust von 16,1%. (s. Abb. 21)

3.2 Validierung der CSD-Messung

Um das experimentelle Setup zu testen, wurde ein drittes Bohrloch am okzipitalen Pol des Schädels angelegt und epidural alle 20 Minuten eine 1 M KCl Lösung appliziert (s. Abb. 22). Durch diese Prozedur können im Vergleich mit bereits publizierten Ergebnissen zuverlässig repetitive CSDs ausgelöst werden.¹⁴⁶

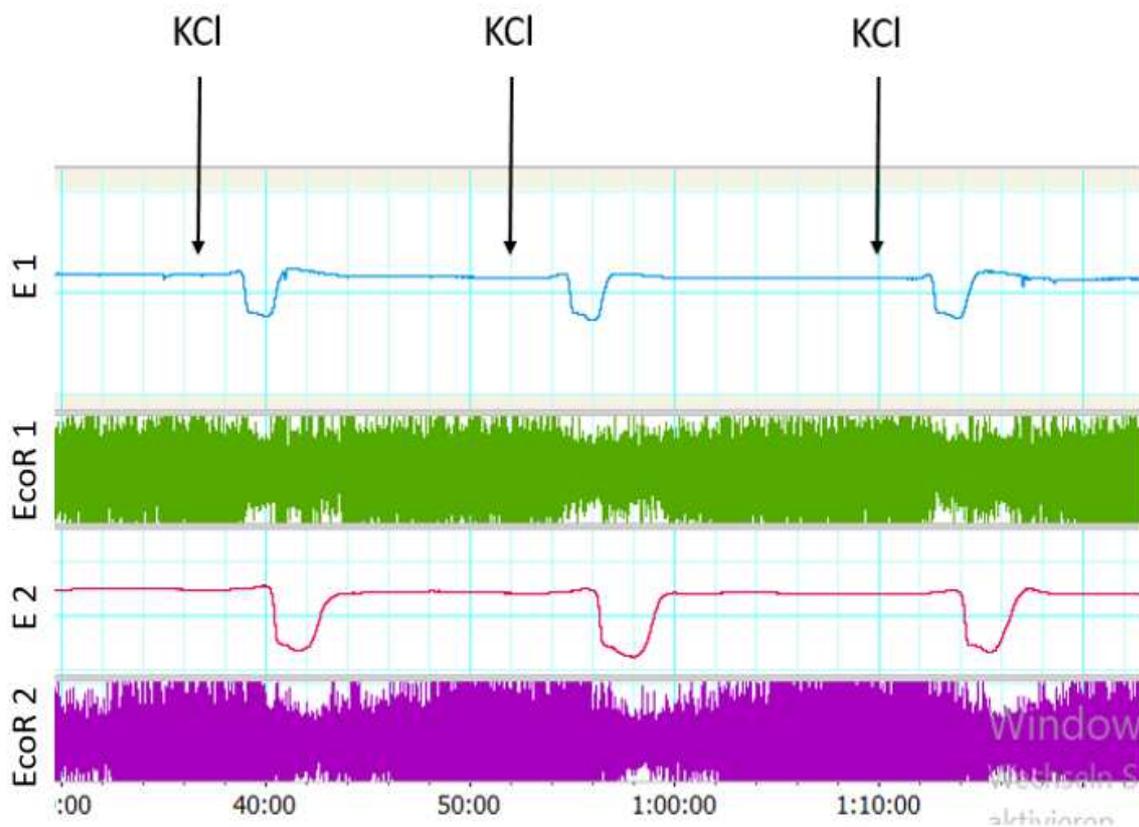


Abb. 22: DC-Potential und EcoR-Signal nach wiederholter okzipitaler Applikation von 1 M KCl. Außer dem deutlichen DC-Shift (ca. 22 mV) in beiden Elektrodenkanälen, war in beiden EcoR-Kanälen eine simultan einsetzende, charakteristische Suppression des Signals zu erkennen.

Die Geschwindigkeit der von uns ausgelösten CSDs betrug im Durchschnitt $2,8 \pm 0,6$ mm/min. Die gemessenen Amplituden betragen $22,3 \pm 0,6$ mV (s. Abb. 23). Beide Werte entsprechen bereits aus der Literatur bekannten Messergebnissen.¹⁻⁴

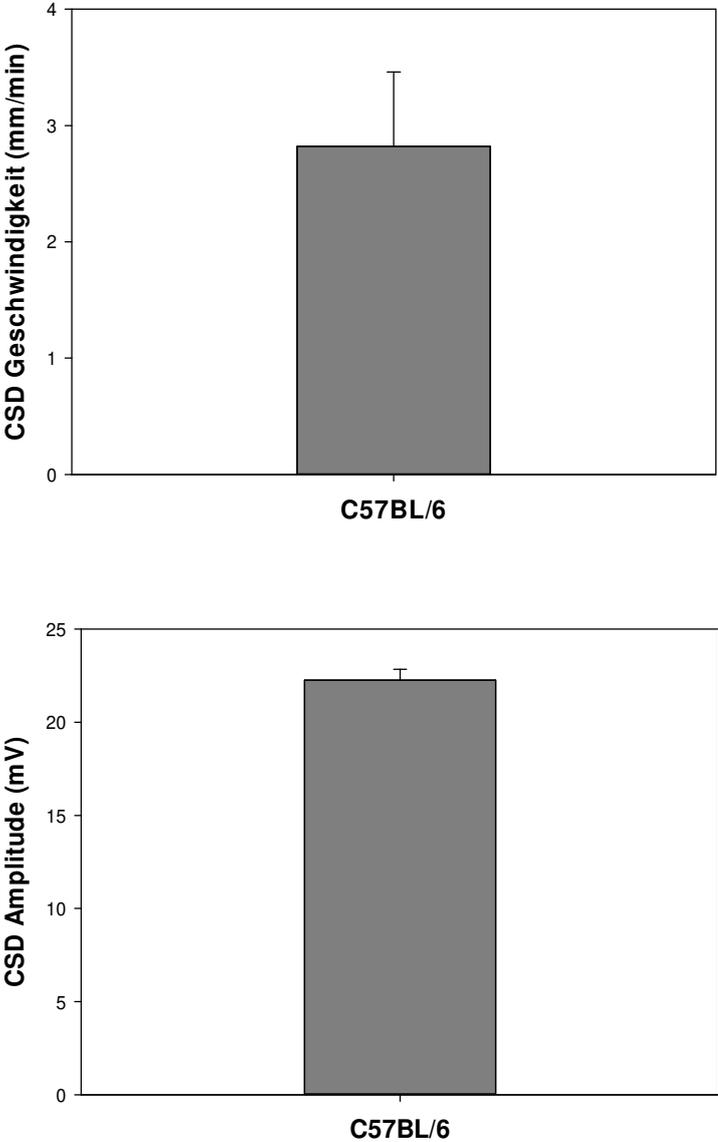


Abb. 23: *Geschwindigkeit sowie Amplitude der Validierungsmessung*

3.3 Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)

3.3.1 Infarktvolumina von SCN1a_{wt/het} Mäusen

Das mittlere Infarktvolumen der SCN1a_{wt}-Tiere betrug 24 Stunden nach fMCAo $68,5 \pm 13,6 \text{ mm}^3$ und fiel im Vergleich zu der SCN1a_{het}-Gruppe nur geringfügig kleiner aus ($72,8 \pm 14,2 \text{ mm}^3$). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (t-Test, $p = 0,531$) (s. Abb. 24).

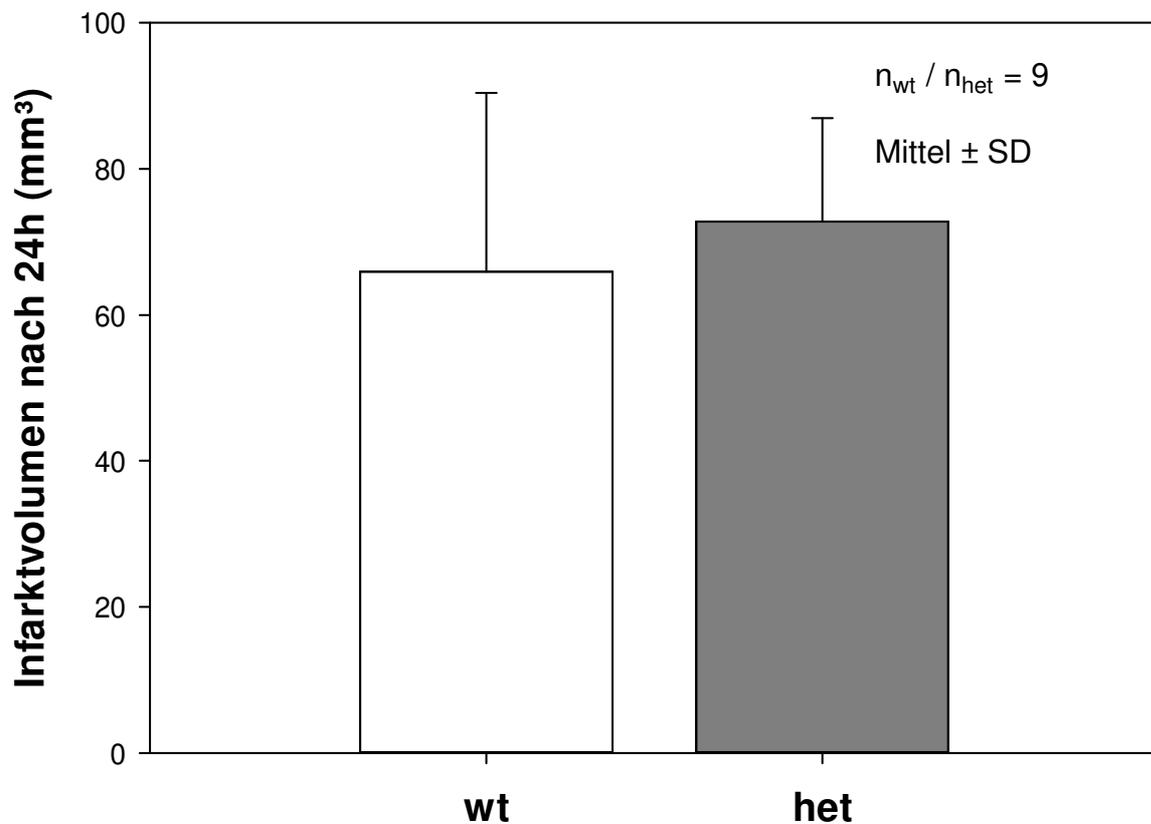


Abb. 24: Infarktvolumen 24 Stunden nach fMCAo

Zur genaueren Analyse des Ergebnisses, wurden die Infarktflächen in mm² gegen die korrespondierenden koronaren Schnitte (1–12) aufgetragen. Hierbei zeigten sich in der Gruppe der SCN1a_{het}-Tiere frontal beginnend bis parieto-temporal (s. Abb. 25; Schnitte 3–8) größere Infarktflächen als bei den SCN1a_{wt}-Tieren. Diese wiederum zeigten zum Temporalpol (s. Abb. 25; Schnitte 9–12) im Durchschnitt größere Infarktareale als die FHM3-Mäuse. Auch hier ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,376$).

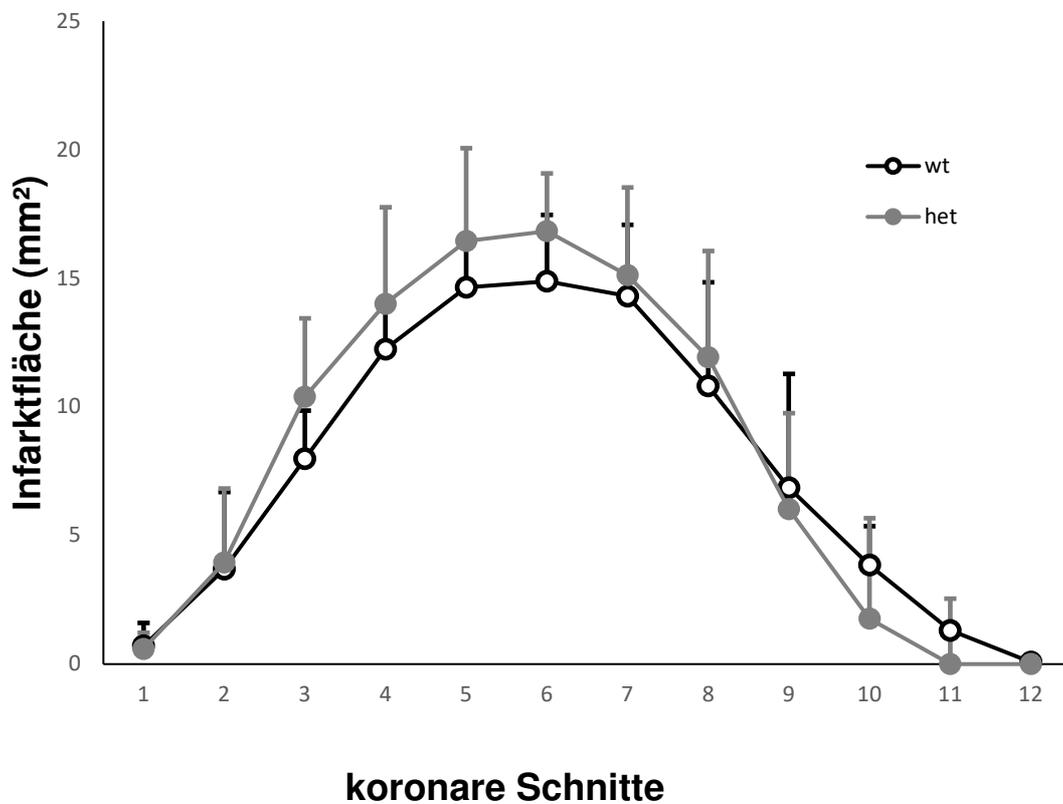


Abb. 25: Infarktflächen in Abhängigkeit der koronaren Schnitte

3.3.2 Zerebrale Perfusion

Um eine mangelnde bzw. nicht regelrechte Okklusion der MCA als Ursache dieses Resultates ausschließen zu können, wurden der Laser-Doppler-Flux vor bzw. unmittelbar nach fMCAo in beiden Gruppen miteinander verglichen. Alle Ausgangswerte bezogen sich dabei auf die LDF Werte, die vor der Ligatur der A. carotis communis gemessen wurden.

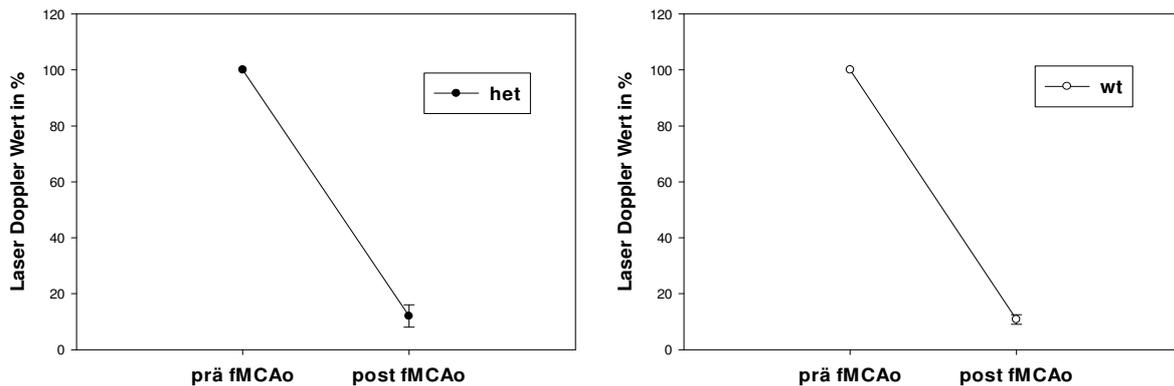


Abb. 26: LDF Abfall nach fMCAo

Im Fall der $SCN1a_{wt}$ -Gruppe, wurden vor fMCAo im Durchschnitt $154,6 \pm 39,1$ PU gemessen. Dieser Wert fiel unmittelbar nach Okklusion der MCA auf $18,4 \pm 7,0$ PU, daher auf 11% des Ausgangswertes. Bei $SCN1a_{het}$ -Mäusen wurden vor fMCAo $136,2 \pm 33,9$ PU gemessen. Unmittelbar nach fMCAo fielen diese durchschnittlich auf $14,3 \pm 2,6$ PU, d.h. auf 12% des Ausgangswerts (s. Abb. 26).

3.3.3 Gewicht

Unmittelbar vor Induktion der Anästhesie wurde in beiden Gruppen ein fast identisches Körpergewicht erhoben (wt: $22,27 \pm 2,81$ g; het: $22,01 \pm 2,20$ g). 24 Stunden nach fMCAo erlitten alle Tiere einen signifikanten Gewichtsverlust. $SCN1a_{wt}$ -Mäuse wogen im Durchschnitt $19,36 \pm 3,04$ g, $SCN1a_{het}$ -Mäuse $19,69 \pm 2,51$ g (s. Abb. 27). Der relative Gewichtsverlust war ebenfalls ähnlich (wt: 13% vs. het: 11%) (s. Abb. 27).

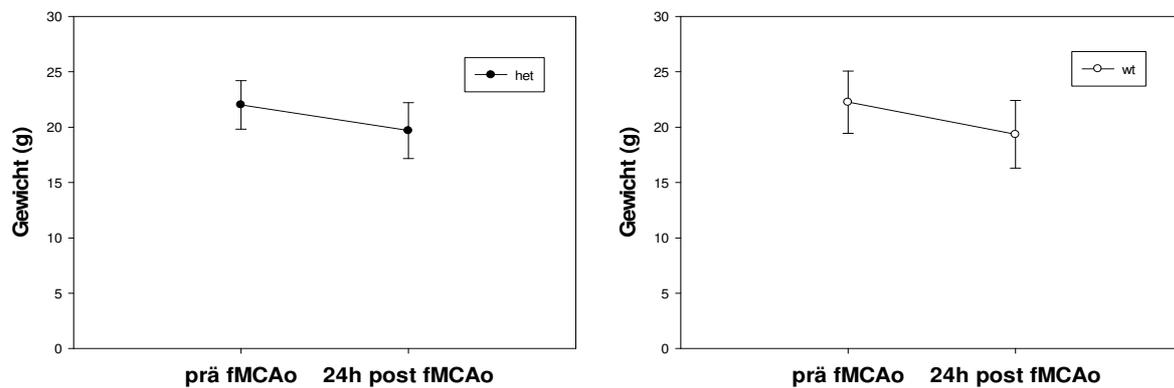


Abb. 27: Gewichtsverlust 24 Stunden nach fMCAo

3.3.4 Fokal-neurologisches Defizit

Auch eine Quantifizierung des fokal-neurologischen Defizits anhand des Bederson Score zeigte 24 Stunden nach fMCAo zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

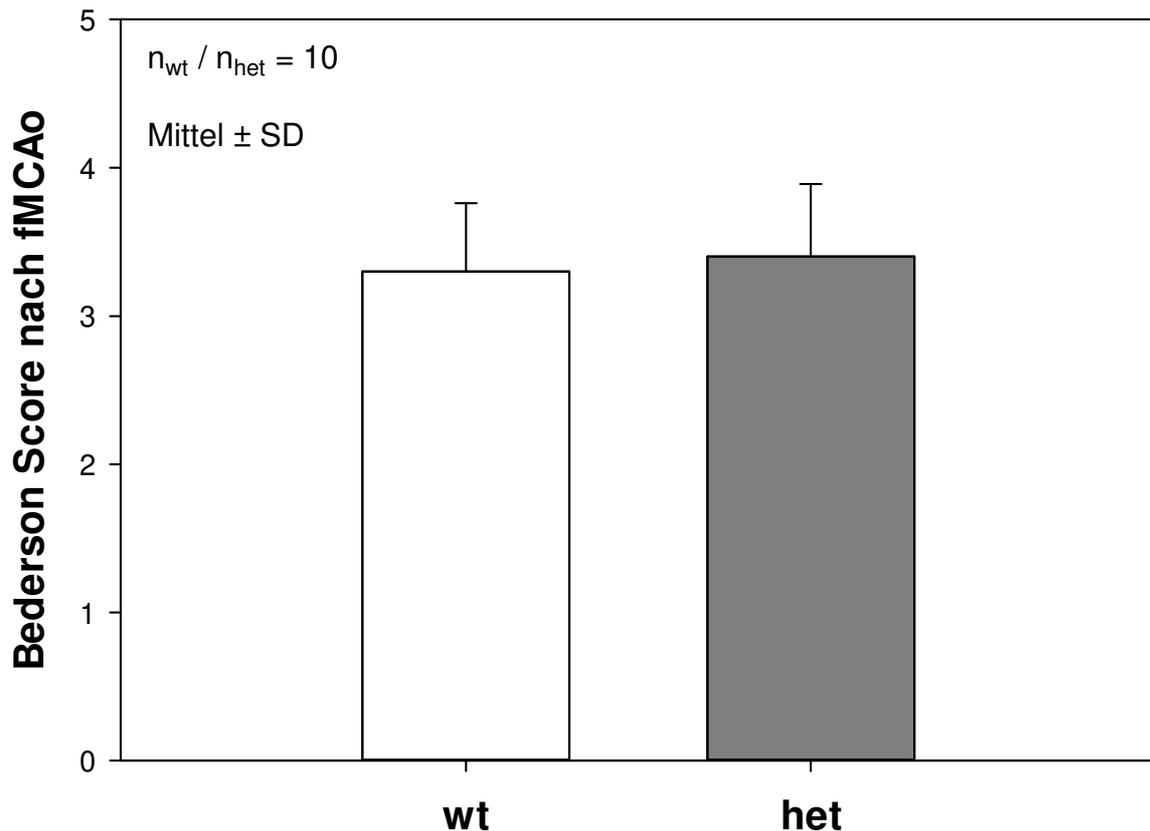


Abb. 28: *Bederson Score direkt nach fMCAo*

Alle Versuchstiere zeigten unmittelbar nach fMCAo einen Bederson Score von mindestens 3 (wt: $3,3 \pm 0,46$; het: $3,4 \pm 0,49$). Drei Tiere der Wildtyp-Gruppe und vier Mäuse der SCN1^{a_{het}}-Gruppe zeigten keine Spontanbewegung. Zwischen den beiden Versuchsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung des neurologischen Defizits (s. Abb. 28).

Nach 24 Stunden wurden die Versuchstiere erneut evaluiert um ein mögliches, durch Infarktwachstum bedingtes fokal-neurologisches Defizit zu erfassen

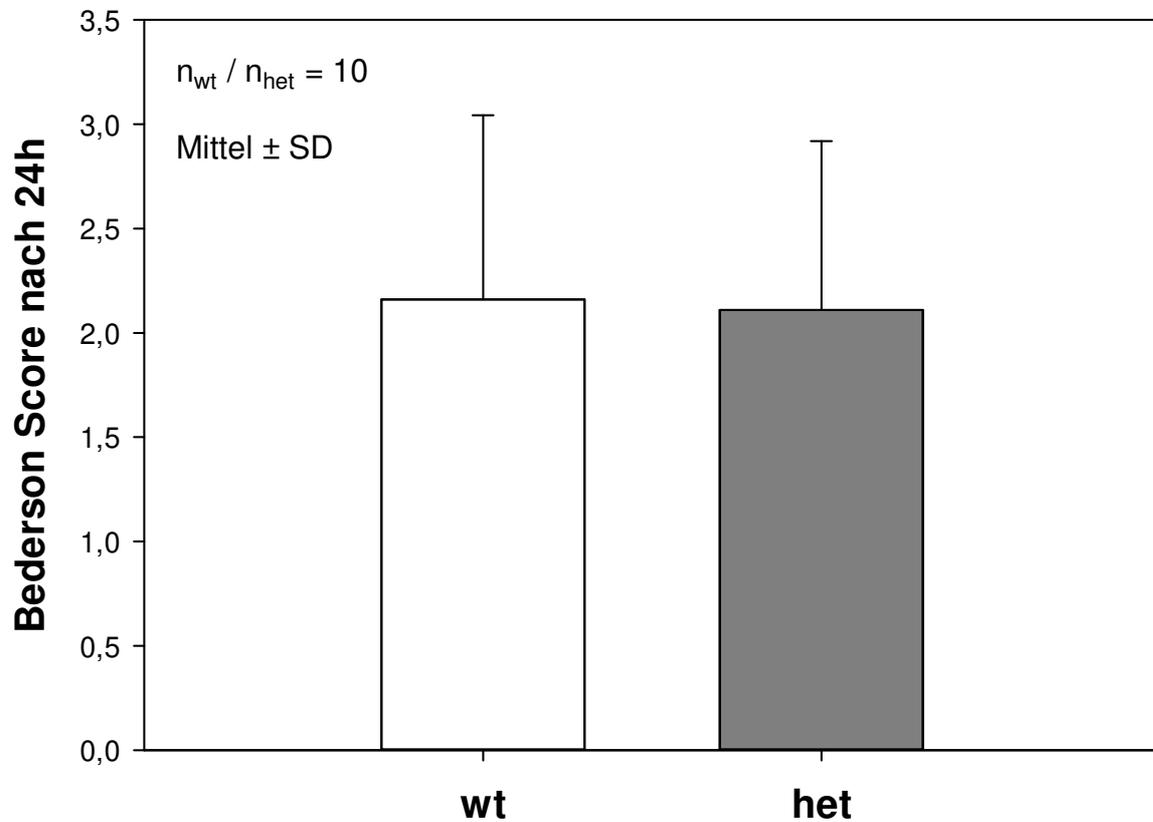


Abb. 29: *Bederson Score 24 Stunden nach fMCAo*

Auch an diesem zweiten Messpunkt zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Bederson Score zwischen den beiden Gruppen. Wt-Tiere hatten im Durchschnitt einen Score von $2,2 \pm 0,9$, während bei Versuchstieren der het-Gruppe ein Wert von $2,1 \pm 0,8$ ermittelt wurde. (s. Abb. 29)

3.4 Versuchsreihe 2: Messung der CSDs in SCN1a_{wt/het} Mäusen.

3.4.1 Kumulative Anzahl der CSDs 120 Minuten nach fMCAo.

Die Anzahl der kortikalen Streudepolarisationen zwei Stunden nach experimenteller fMCAo war in der SCN1a_{het}-Gruppe mit durchschnittlich 7 ± 3 CSDs signifikant höher als in der SCN1a_{wt}-Gruppe (3 ± 2 CSDs, $p = 0,005$) (s. Abb. 30).

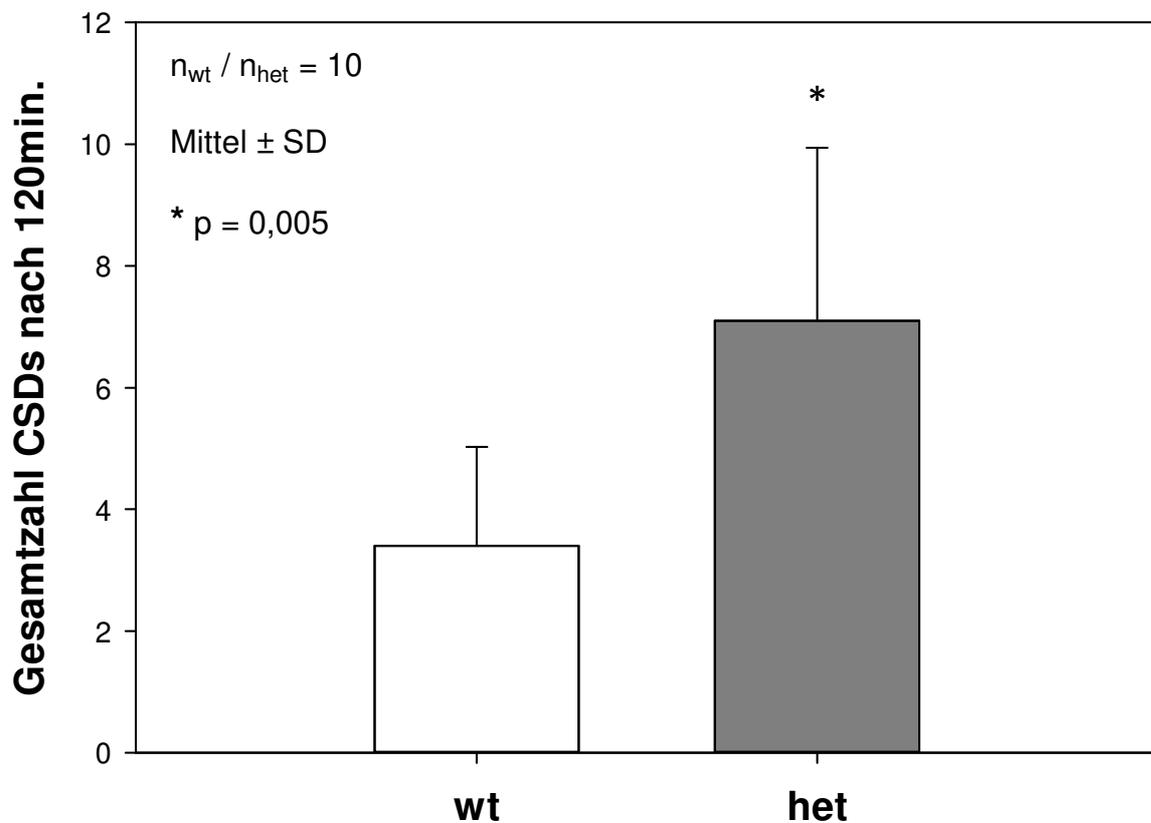


Abb. 30: Kumulative Anzahl CSDs nach 120min

Zum besseren Verständnis der Daten, wurde diese kumulative Anzahl der CSDs noch einmal in beiden Gruppen während der ersten Stunde und der zweiten Stunde einzeln ausgewertet (s. Abb. 31).

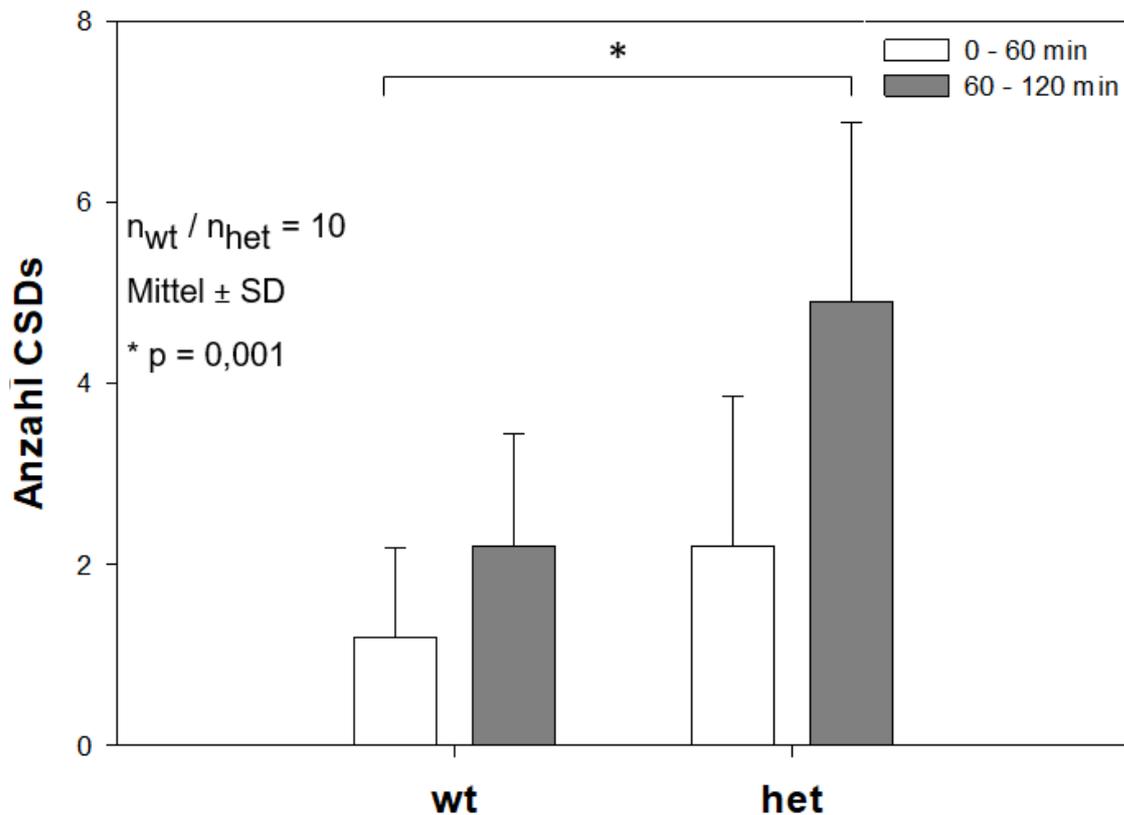


Abb. 31: Anzahl CSDs in der 1. Stunde bzw. 2. Stunde der Messung

In der Messreihe der $SCN1a_{wt}$ -Versuchsmäuse wurden im Durchschnitt während der ersten Stunde 1 ± 1 CSD Ereignisse aufgezeichnet. Im Vergleich dazu wurden in der $SCN1a_{het}$ -Gruppe in der ersten Stunde der Messung durchschnittlich 2 ± 2 , also doppelt so viele CSDs aufgezeichnet (s. Abb. 37). In beiden Versuchsgruppen kam es während der 2. Stunde zu einem Anstieg der CSD-Frequenz (CSD/Stunde). In Wildtyptieren wurden im Zeitfenster 60–120 min. 2 ± 1 CSDs gemessen (Anstieg um 100%), während die $SCN1a_{het}$ -Gruppe im Vergleich in diesem Zeitraum eine höhere CSD-Gesamtzahl, sowie höhere CSD-Frequenz aufwies (5 ± 2 CSDs; Anstieg um 150%). In der Gruppe der $SCN1a_{het}$ -Mäuse erwies sich dieser Anstieg also als stärker ($p = 0,068$). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich im Vergleich zwischen der $SCN1a_{het}$ -Gruppe in der 2. Stunde und den Wildtyp-Mäusen in der 1. Stunde ($p=0,001$).

Eine weitere Aufspaltung der Gruppen in Männchen und Weibchen ermöglichte eine geschlechtsspezifische Analyse der kumulativ gemessenen CSDs.

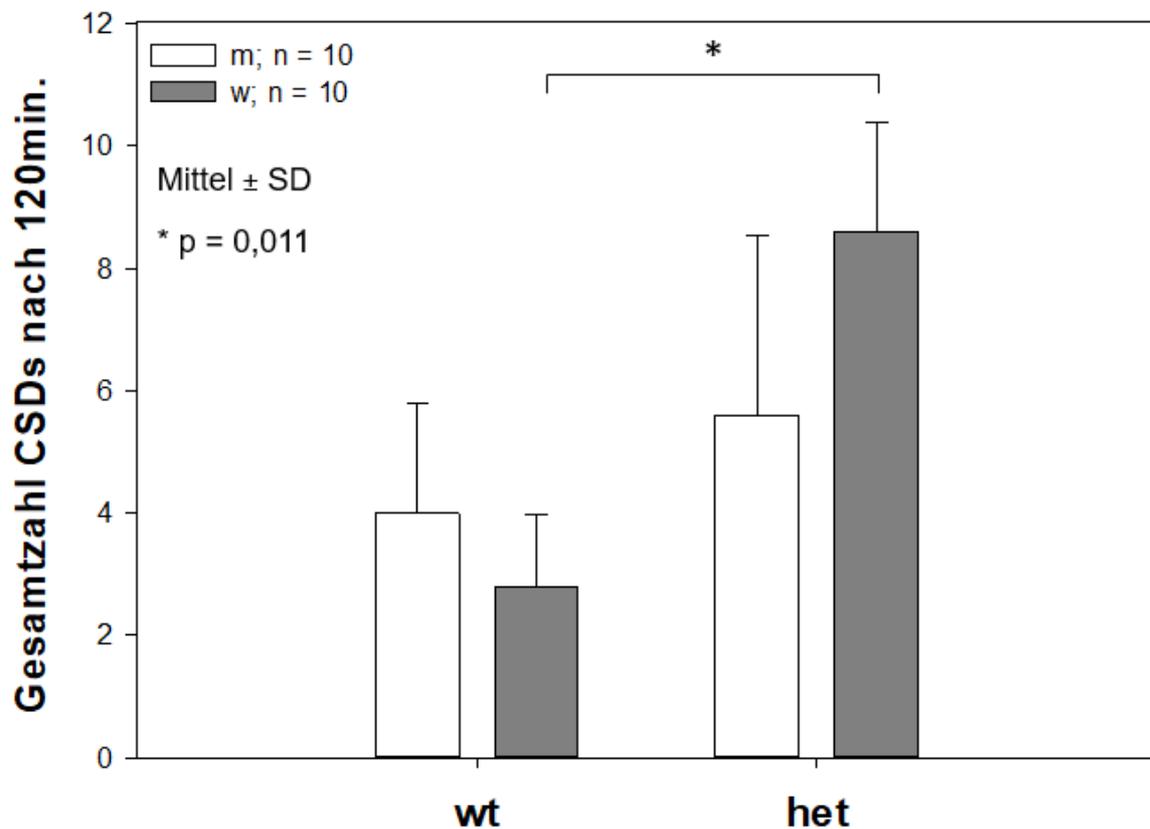


Abb. 32: Anzahl der kumulativen CSDs (120 min.) nach Geschlecht

In männlichen Mäusen der wt-Gruppe wurden im Vergleich zu den Männchen der het-Gruppe weniger CSDs aufgezeichnet ($wt_m: 4 \pm 2$; $het_m: 6 \pm 3$). Die höchste Anzahl kortikaler Streudepolarisationen nach der gesamten Messdauer zeigte die Gruppe der weiblichen $SCN1a_{het}$ -Tiere mit 9 ± 2 CSDs/120 min (s. Abb. 32). Diese war signifikant höher als die CSD-Anzahl weiblicher Wildtyp-Tiere ($wt_w: 3 \pm 1$; $p = 0,011$).

Insgesamt war nach Auswertung innerhalb der $SCN1a_{wt}$ -Gruppe kein signifikanter, geschlechtsspezifischer Unterschied zu verzeichnen ($wt_m: 4 \pm 2$, $wt_w: 6 \pm 3$). Innerhalb der FHM3 Gruppe ließ sich eine Tendenz feststellen, mit einer höheren CSD Anzahl in den Weibchen, im Vergleich zu den Männchen ($p = 0,916$) (s. Abb. 32).

3.4.2 Amplitude

Die CSDs der FHM3-Gruppe hatten im Durchschnitt eine Amplitude von 21 ± 9 mV, während die CSDs der SCN1^{wt}-Mäuse im Durchschnitt Amplituden von 26 ± 4 mV zeigten (s. Abb. 33). Ein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen wurde nicht gefunden ($p = 0,079$).

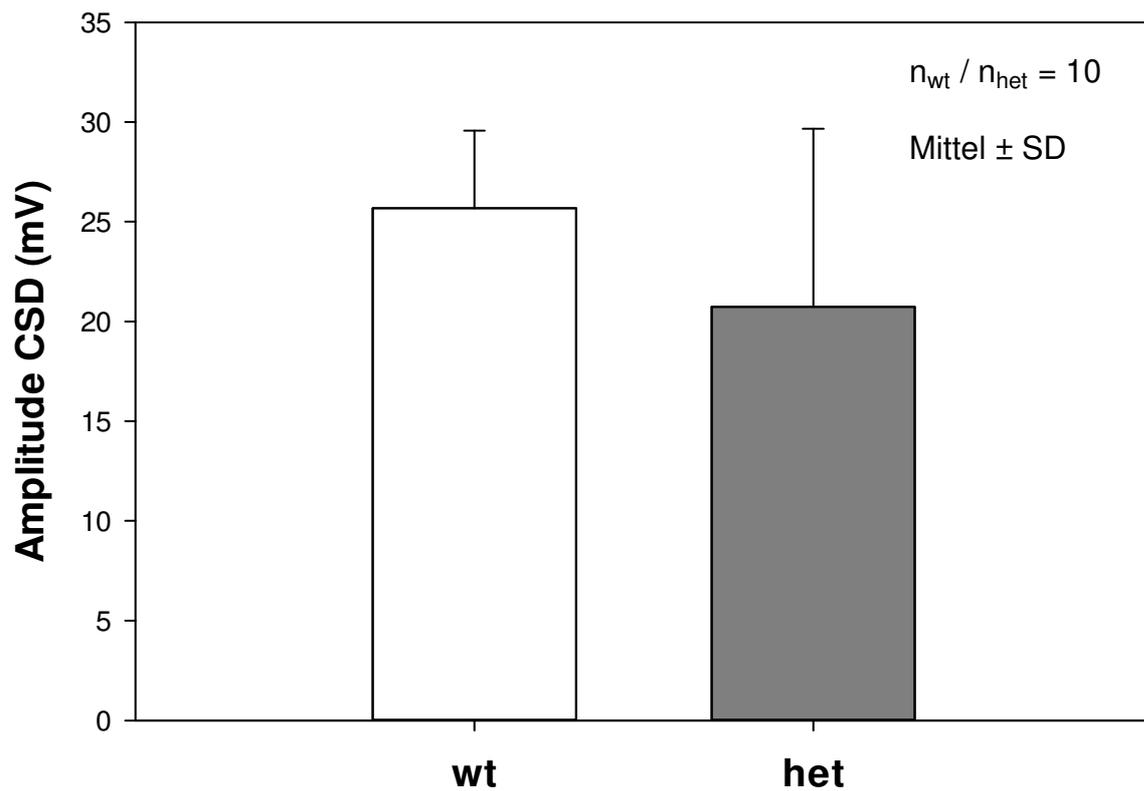


Abb. 33: Amplituden der CSDs

3.4.3 Geschwindigkeit

Um mögliche Unterschiede in der Propagationsgeschwindigkeit der aufgezeichneten kortikalen Streudepolarisationen auszuwerten, wurden die zurückgelegte Strecke zwischen den Elektroden in Millimeter, sowie die dafür benötigte Zeit (in Minuten) aller CSDs ausgemessen. Für die beiden Versuchsgruppen wurden jeweils die durchschnittliche Geschwindigkeit aller in 120 Minuten gemessenen CSDs aufgetragen.

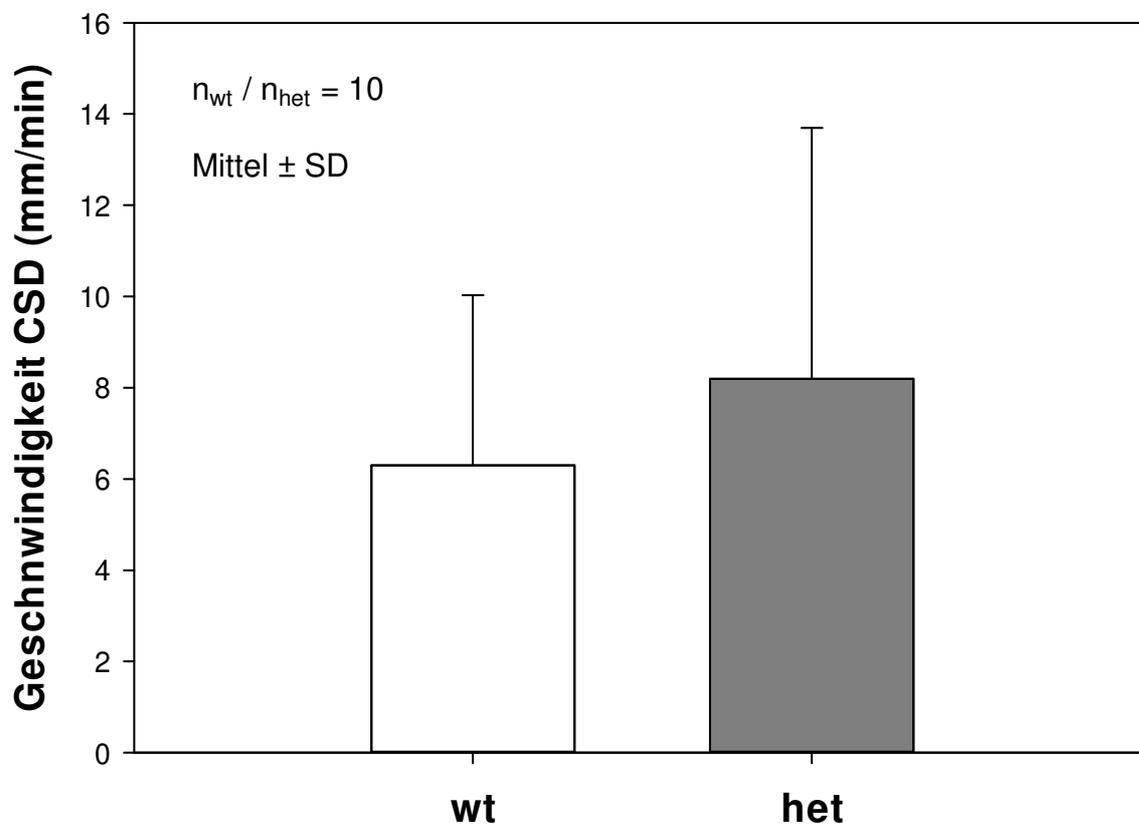


Abb. 34: *Geschwindigkeit der CSDs*

Wie durch die Messdaten ersichtlich, waren die aufgezeichneten CSDs im Durchschnitt bei Versuchstieren der het-Gruppe mit $8,2 \pm 5,5$ mm/min um 22% schneller als in der wt-Gruppe ($6,4 \pm 3,7$ mm/min; $p = 0,889$) (s. Abb. 34).

3.4.4 Zerebrale Perfusion: fMCAo

Eine sinnhafte Interpretation der elektrophysiologischen Messung forderte eine regelrechte Okklusion der MCA mit ähnlich ischämischer Infarzierung in beiden Versuchsgruppen. Zur Sicherstellung dieses Sachverhaltes wurden Messdaten der zerebralen Perfusion anhand der Laser-Doppler-Fluxometrie ausgewertet. Wie in Versuchsreihe 1 wurden Messwerte vor und unmittelbar nach fMCAo erfasst.

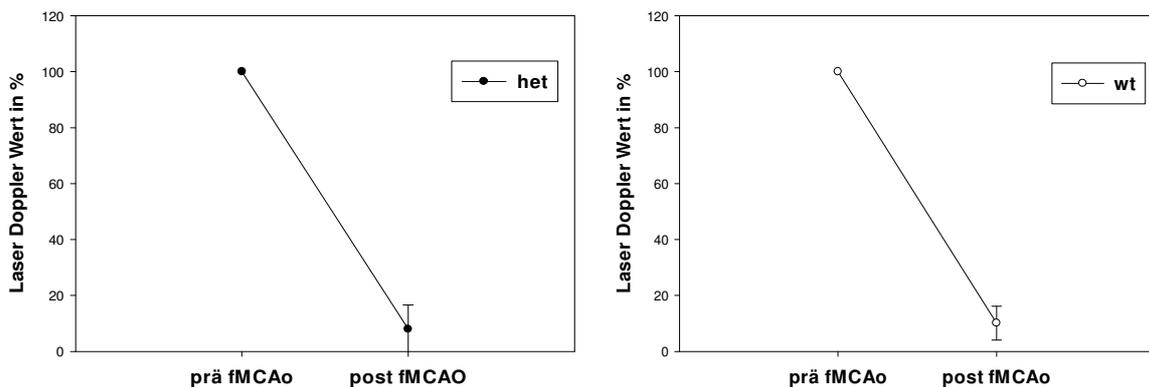


Abb. 35: LDF Abfall nach fMCAo

Analog zu Versuchsreihe 1 zeigten $SCN1a_{het}$ -Mäuse zu Beginn der operativen Prozedur anhand des Laser-Doppler-Flux (in absoluten Perfusionseinheiten) eine verminderte zerebrale Perfusion ($SCN1a_{wt}$: $185,4 \pm 97,5$ PU; $SCN1a_{het}$: $152,6 \pm 87,3$ PU). In beiden Versuchsgruppen wurde nach Okklusion der MCA im Durchschnitt ein regelrechter Abfall der Durchblutung verzeichnet. In Versuchstiere der $SCN1a_{het}$ -Gruppe fiel diese unmittelbar nach fMCAo auf 8% des Ausgangswertes ($11,9 \pm 9,2$ PU), $SCN1a_{wt}$ -Tiere verzeichneten einen Abfall auf 10% des Ausgangswerts ($15,4 \pm 6,4$ PU) (s. Abb. 35).

Diesbezüglich konnte in beiden Versuchsgruppen von einer experimentell vergleichbaren Ausgangssituation ausgegangen werden.

3.4.5 Zerebrale Perfusion: CSD

Die Platzierung der Laser-Doppler-Sonde erwies sich unter Anbetracht der stark beschränkten Platzverhältnisse im operativen Feld als technisch schwierig. Eine erfolgreiche Aufzeichnung konnte aus diesem Grund nur bei drei $SCN1a_{het}$ -Mäusen und einem $SCN1a_{wt}$ -Tier durchgeführt werden.

In allen erfolgreich durchgeführten Messungen stieg bei jedem CSD-Ereignis in der FHM3-Gruppe die zerebrale Perfusion an. Bei der Wildtyp-Maus fiel die Perfusion hingegen in drei von vier aufgezeichneten CSD-Ereignissen ab (s. Abb. 37).

Durchschnittlich stiegen während einer kortikalen Streudepolarisation die LDF Werte in den $SCN1a_{het}$ -Tieren auf $231 \pm 142\%$ der Baseline an (s. Abb. 36).

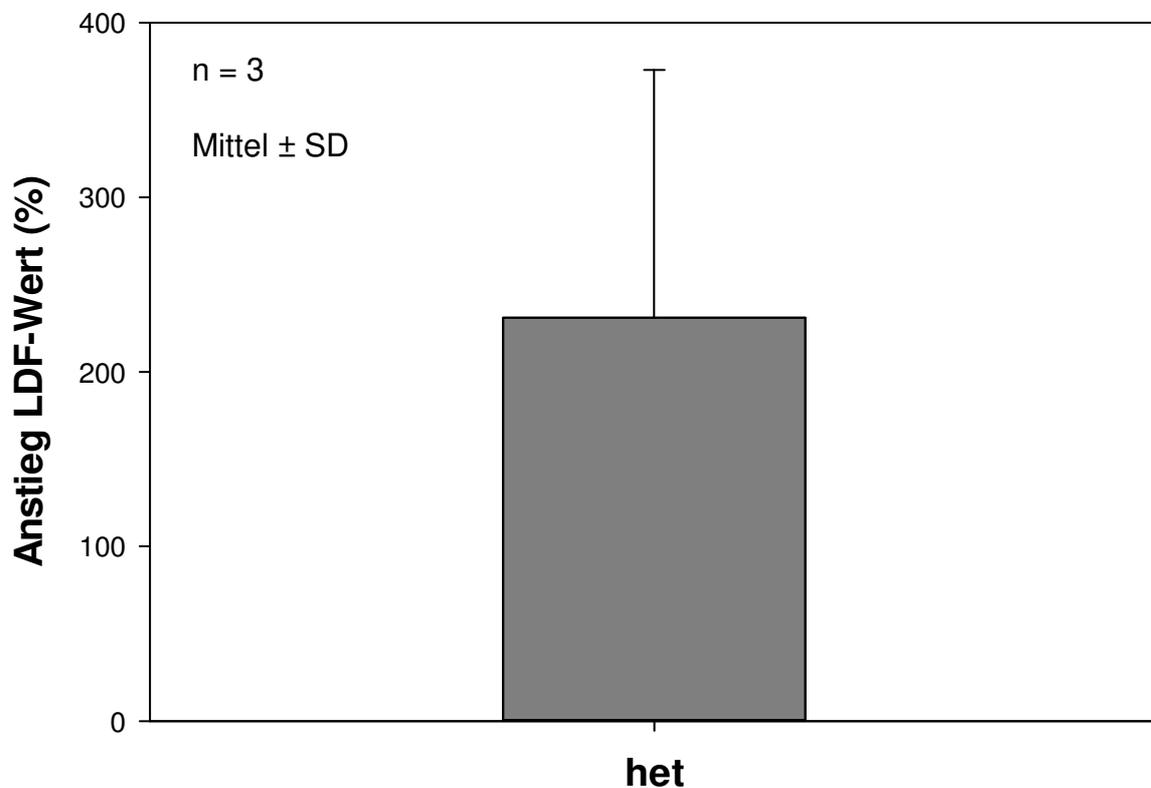
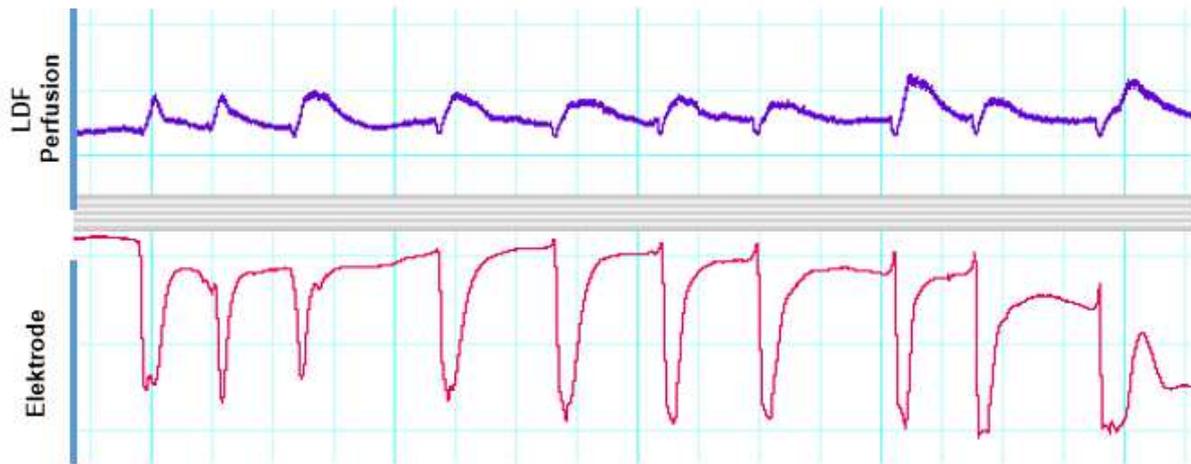


Abb. 36: Durchschnittlicher Anstieg des LDF Wertes während einer CSD in %;
 $SCN1a_{het}$

a) SCN1a_{het}



b) SCN1a_{wt}

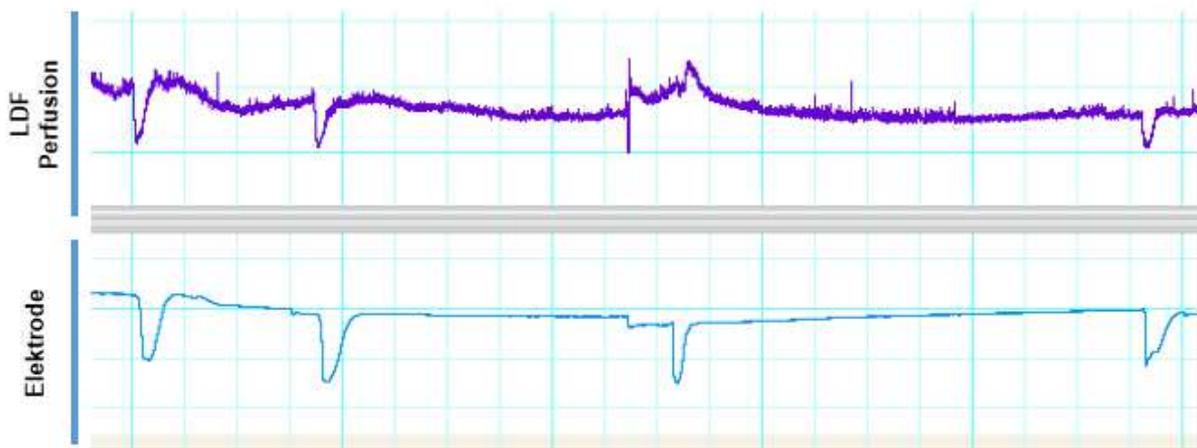


Abb. 37: Exemplarische LDF-Messung eines SCN1a_{het}- sowie eines SCN1a_{wt}-Tieres. Abgebildet sind sowohl die Aufzeichnungen einer Elektrode über eine Dauer von 120 Minuten als auch die dazu kontrollierte Messung des CBF mittels Laser-Doppler-Fluxometrie **a)** Die Messung des SCN1a_{het} Versuchstieres zeigt mit jedem CSD Ereignis einen Anstieg des gemessenen LDF Wertes. **b)** Das SCN1a_{wt}-Tier zeigt in drei von vier CSD Ereignissen einen Abfall des LDF Wertes auf durchschnittlich $12 \pm 3\%$ der Baseline und in einem CSD Ereignis einen Anstieg 163% der Baseline.

3.5 Genotypisierung

Die genetische Identifikation der Versuchstiere wurde mit Auftragung der amplifizierten DNA-Proben (vgl. Kapitel 2.11) auf ein Agarose-Gel durchgeführt.

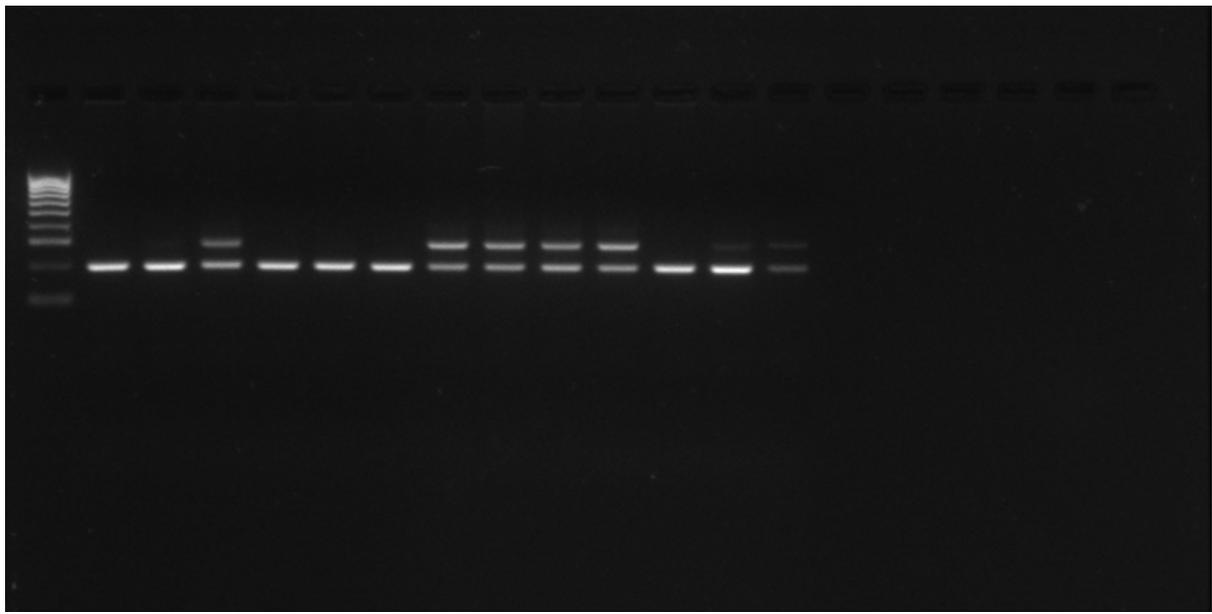


Abb. 38: Gelelektrophorese von 13 Versuchstieren zur Zuordnung des Genotyps. (wt-Kontrolle an Stelle 1). Sieben Proben sind als heterozygot (zwei Banden: 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13) zu identifizieren. Fünf Proben konnten Wildtyp Tieren zugeordnet werden (eine Bande: 2, 4, 5, 6, 11)

3.6 Physiologische Parameter

Während der elektrophysiologischen Aufzeichnung wurden bei allen Versuchstieren physiologische Parameter erhoben, um die Validität der erhobenen Daten sicherzustellen. Des Weiteren wurden die Daten zur Analyse gruppenspezifischer Unterschiede herangezogen.

	N	Gewicht (g)	Temperatur (°C)	MAP (mmHg)	pH (arteriell)	pCO₂ (arteriell)	pO₂ (arteriell)
Sum	20	28 ± 2	37,2 ± 0,1	73 ± 9	7,28 ± 0,09	42 ± 11	114 ± 25
Wt	10	28 ± 2	37,2 ± 0,1	72 ± 10	7,26 ± 0,09	40 ± 11	111 ± 21
Het	10	28 ± 2	37,1 ± 0,1	74 ± 10	7,29 ± 0,09	44 ± 11	118 ± 28

Tab. 3: Physiologische Parameter

Durchgehend überwacht wurden sowohl die rektale Temperatur als auch der mittlere arterielle Blutdruck (MAP). Die Blutgasanalyse erfolgte als letzte Maßnahme und spiegelte die Ventilationsverhältnisse und den Säure-Base-Haushalt am Ende der 120-minütigen Messung wider.

Wie in Tabelle 3 gelistet, war das durchschnittliche Gewicht der beiden Versuchsgruppen zu Beginn der operativen Prozedur identisch. Hinsichtlich Körpertemperatur und mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP) zeigte sich zwischen der Gruppe der het-Tiere und der wt-Vergleichsgruppe kein signifikanter Unterschied. Die Blutgasanalyse zeigte bei SCN1a_{het}-Tieren einen leicht erhöhten pCO₂ und pO₂ welcher sich in einem minimal basischerem pH äußert. Insgesamt zeigten die Versuchstiere beider experimenteller Gruppen am Ende der Messung mit einem durchschnittlichen pH < 7,3 einen leicht azidotischen Säure-Base-Haushalt.

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Wahl der Versuchstiere

Für die Versuchsreihen unseres Projektes wählten wir sowohl für die Validierung als auch für die Experimente Mäuse als Versuchstiere. Dieses brachte im Rahmen des Projektes mehrere Vorteile mit sich. Mäuse sind in der Haltung einfacher zu betreuen und haben abgesehen von einer schnellen Generationsfolge, pro Wurf eine ausreichend hohe Anzahl an Jungtieren, welche eine quantitativ ausreichende Anzucht heterozygoter Varianten erlaubt. Diese gezielte Anzucht transgener Linien gestaltet sich durch bereits sicher erprobte gentechnische Verfahren an Mäusen ebenfalls leicht. Die Körpergröße erlaubt eine einfache Handhabung, somit unkomplizierte Versuchsaufbauten und validierte, zügig durchführbare Eingriffe welche sich vor allem im Bereich der Schlaganfallforschung dadurch als ethisch vorteilhafter gegenüber größeren Tieren erweisen. Ein weiterer Vorteil ist die Größe des Gehirns. Diese erlaubt einfache Fixierungs- und Färbeverfahren, sowie unkomplizierte Untersuchung kompletter Schnitte mittels Lichtmikroskopie.

Als Nachteil sind in diesem Zusammenhang jedoch auch vor allem physiologischen Eigenschaften des Modellorganismus Maus zu nennen. So sind Mäuse sehr klein, was die Handhabung zwar erleichtert, die technische Durchführung der operativen Prozeduren jedoch nicht nur erschwert, sondern auch von der Verwendung eines Mikroskops abhängig macht. Des Weiteren sind Mäuse außerordentlich empfindlich und laufen mit ihrem geringen Blutvolumen von 1,5–2,5 ml Gefahr, bei kleineren Verletzungen von Gefäßen kardiovaskulär zu dekomensieren und die neurophysiologischen Ergebnisse der Experimente zu verfälschen. Diese mögliche Störquelle konnte durch kontinuierliche Überwachung der physiologischen Parameter mittels intraarterieller Blutdruckmessung, Intubation/Ventilation und rektaler Temperaturkontrolle erfolgreich kontrolliert werden. Auch eine, bei diesem Modellorganismus schnell einsetzende Austrocknung, stellte bei der Durchführung der Operationen eine zusätzliche Herausforderung dar. Diese konnte erfolgreich mithilfe eines zügigen Wundverschlusses (durch Nähte bzw. Kleber), Befeuchtung der Schädelkalotte mittels 0,9% NaCl Lösung und kontinuierlicher Infusion von 0,9% NaCl Lösung minimiert werden.

4.1.2 Schlaganfallmodell

Das Schlaganfallmodell, das wir für unser Projekt wählten, war die Faden Okklusion der A. cerebri media (fMCAo). Neben dieser intraluminalen Methode gibt es derzeit noch weitere erprobte Möglichkeiten einen Schlaganfall im Tiermodell experimentell zu induzieren. Als besonders relevant gelten hier neben der fMCAo das Modell der distalen Okklusion sowie die sog. Photothrombosen.

Bei der Durchführung der distalen Okklusion wird die MCA nach Kraniotomie visuell dargestellt und anschließend mittels Elektrokoagulation oder reversibel mit Aneurysmaclip/ Ligaturen okkludiert.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Das Modell der Photothrombose macht sich den Mechanismus intravasaler Photooxidation zunutze. Dem Versuchstier wird hierbei ein photoaktiver Farbstoff (z.B. Erythrosin B) intraperitoneal oder intravenös injiziert. Durch Bestrahlung des Schädels mit Laserlicht bilden sich in den Hirngefäßen Sauerstoffradikale, welche durch Endothelschädigung und der Aktivierung von Gerinnungsprozessen einen Gefäßverschluss induzieren.^{150,151}

Die Wahl der fMCAo war letztlich nicht nur in der schnellen und einfachen Durchführbarkeit begründet. So ist das Modell relativ leicht zu erlernen. Eingriffe durch geübte Operateure dauern im Durchschnitt nicht länger als 15 Minuten und erlauben so die zügige Durchführung mehrerer Eingriffe pro Tag. Des Weiteren ahmt die fMCAo einen Embolie-bedingten Schlaganfall im menschlichen Gehirn samt Penumbra durch die Natur der mechanischen Okklusion besonders gut nach. Die Dauer in der das Filament im Gefäß verbleibt, kann exakt bestimmt werden und das Modell erlaubt nicht zuletzt den Verzicht auf eine Kraniotomie, welche eine unnötige Schädigung der Dura mater sowie des Parenchyms nach sich ziehen würde.¹⁵² Ein Aspekt, der vor allem in Anbetracht der elektrophysiologischen Messungen unserer Ansicht nach äußerste Wichtigkeit besaß.

Das fMCAo-Modell besitzt einige Nachteile, die experimentell miteinbezogen werden mussten. Vor allem was die Infarktgrößen betrifft, zeigt das Modell eine große Varianz. Diese gründet sich auf nur schwer zu standardisierende technische Aspekte bei der Durchführung der Experimente (Filament Durchmesser, exakte Lage des Filaments etc.) sowie der Variabilität der Versuchstiere bezüglich Kollateralkreisläufen, dem Alter und dem Gewicht der Tiere.^{152,153} Diesem Problem begegneten wir durch die Durchführung einer Standardisierungsreihe sowie Verwendung von Versuchstieren mit ähnlichem Gewicht und Alter.

Ein weiteres Problem, vor das uns das Modell stellte, war eine postoperative Hypothermie, die durch eine Erniedrigung des zerebralen Metabolismus das Outcome nach zerebraler Ischämie bekanntermaßen beeinflusst.¹⁵⁴ Dieser Störfaktor konnte mittels genau temperierter Brutkästen, sowie intraoperativ verwendeter Heizmatten weitgehend ausgeschaltet werden.

Bei der distalen Okklusion der A. cerebri media kann eine erfolgreiche Durchführung des Gefäßverschlusses visuell leicht erkannt werden. Beim fMCAo Modell erfolgt das Vorschieben des Filaments blind, so dass es durch Gefäßverletzungen zu einer subarachnoidalen Blutung kommen oder der Gefäßverschluss durch unkorrekte Lage des Filaments ganz ausbleiben kann. In dem von uns verwendeten Versuchsprotokoll haben wir mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie die zerebrale Perfusion im Versorgungsgebiet der A. cerebri media gemessen und konnten so einen korrekten Verschluss der MCA sicherstellen.¹⁵⁵

4.1.3 Histomorphometrische Aufarbeitung

Zur Auswertung der Infarktgröße nach fMCAo bedienen wir uns der Nissl-Färbung mit darauffolgender computergestützter Berechnung der Infarktvolumina an koronaren Schnittpräparaten. Die Anfärbung der Gehirnschnitte mittels Nissl ist eine sicher erprobte und etablierte Methode zur visuellen Darstellung infarzierter Hirnareale. Eine sichere Darstellung und Abgrenzung des Infarktes ist 24 Stunden nach Reperfusion gewährleistet.¹⁵⁶ Beide Methoden, sowohl die Herstellung der Hirnschnitte mittels Kryostaten als auch die Färbung und Auswertung können jedoch maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis haben.

So können schockgefrorene Gehirnpräparate vor ihrer Kältefixierung durch Druck verformt werden. Dieses, als auch die Verletzungen der Hirnschnitte durch stumpfe Kryostat-Klingen, können die Infarktgröße verfälschen. Diese Fehlerquellen können durch visuelle Kontrolle der Schnittpräparate, sowie Training im Umgang mit dem Hirngewebe minimiert werden. Der Nachteil der Nissl-Methode ist die Notwendigkeit eines guten visuellen Kontrasts zwischen geschädigtem und gesundem Hirngewebe sowie die manuelle und somit interindividuell schwankende manuelle Bestimmung des Infarktvolumens. Vorteile der Methode ist deren kostengünstige Anwendung, ihr hoher Probendurchsatz und ihre kurze Prozessierungszeit.

Eine weitere Möglichkeit zur Infarktquantifizierung bei Mäusen ist die Durchführung einer MRT. Diese Methode stellt ischämischen Areale in vivo zuverlässig dar, erfordert jedoch eine entsprechend teure technische Ausrüstung.¹⁵⁷

4.1.4 CSD-Modell

Im Fall der elektrophysiologischen CSD Messung galt in unserer Arbeitsgruppe die durch Ag/AgCl Glaselektroden gestützte Ableitung als Modell der Wahl. Die Messung/Ableitung kortikaler Streudepolarisationen ist derzeit mit mehreren Methoden möglich. Neben dieser invasiven Methode ist es möglich CSDs nicht invasiv mittels Laser-Speckle-Blutflussmessung (LSF) aufzuzeichnen. Diese Methode wird aufgrund einer sehr sensitiven, zweidimensionalen Darstellung von Perfusionsverhältnissen im Gehirn oft zusätzlich zur elektrodengestützten Ableitung verwendet, hat allerdings den Nachteil fehlender elektrophysiologischer Daten, die ein Aufzeichnen der Amplitude, der Geschwindigkeit und des potenziellen Herkunftsorts von CSDs ermöglichen. Alternativ zur LSF kann die Durchblutungsantwort von CSDs auch mithilfe von Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) aufgezeichnet werden.^{158,159} Die hier örtlich begrenzt gemessenen Perfusionsverhältnisse können ebenfalls Aussagen über das Auftreten einer kortikalen Streudepolarisation erlauben. Sonst entsprechen die Nachteile der LDF denen der LSF.

Seit 2018 wird auch OIS-WL (optical intrinsic signal imaging – white light) zur Detektion von CSDs erprobt, welches erfolgreich im Tiermodell validiert werden konnte. Die praktischen Verwendungsmöglichkeiten diese Methode bleibt bis dato allerdings noch ungeklärt.¹⁵⁸

Um sowohl eine sichere Aussage über ein eingetretenes CSD-Ereignis treffen zu können (sowohl durch Evaluation der Potentiale und Geschwindigkeit der Depolarisation) als auch Daten bezüglich CBF zu erhalten, wählten wir für unser Modell eine Messung mittels intraparenchymaler Ag/AgCl-Elektroden in Kombination mit LDF. Letztere diente dabei vor allem der Untersuchung der Perfusion betroffener Hirnareale während der kortikalen Streudepolarisationen. Größere Verletzungen der Dura mater sowie des Parenchyms wurden durch vorsichtiges, Mikroskop-gestütztes Arbeiten minimiert. Die Austrocknung des Kraniums, während der 2-stündigen Messungen wurde durch regelmäßige Applikation von physiologischer 0,9% NaCl Lösung verhindert.

Als nur schwer lösbares Problem stellten sich die sehr begrenzten Platzverhältnisse im Operationsfeld dar. Nach stereotaktischer Platzierung der zwei Messelektroden war eine zusätzliche Verklebung der LDF-Sonde am Kranium bei einigen Tieren auf Grund fehlenden Platzes nicht bzw. nur mit wenig Kleber möglich. Letzteres führte in vielen Experimenten zum Lösen der LDF-Sonde während des Versuchs. Somit war – trotz vorhandener technischer Fähigkeiten – nur bei vier Versuchstieren eine Messung der zerebralen Perfusion parallel zur CSD möglich.

Um eine möglichst interferenzfreie Aufzeichnung zu gewährleisten, erfolgte die Versuchsdurchführung in einem Faraday Käfig. Dazu mussten die Versuchstiere nach der chirurgischen Präparation von der OP-Station an den elektrophysiologischen Messplatz umgelagert werden. Um Hypoxien, die CSDs begünstigen können, zu vermeiden, wurden die Tiere in weniger als zehn Sekunden umgelagert.²¹

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Versuchsreihe 1: Faden-Okklusion der MCA (fMCAo)

Das durchschnittliche Infarktvolumen der Validierungsreihe betrug 24 Stunden nach fMCAo $82,96 \pm 31,43 \text{ mm}^3$ und befand sich im Bezug bisheriger Datenerhebungen unseres Labors im erwarteten Rahmen von etwa 70–100 mm^3 . Die relative Standardabweichung lag mit 25% im Rahmen der laborintern festgelegten 20–30%. Die Voraussetzung für die Durchführung der Versuchsreihe war damit gegeben.

Während unserer Versuche zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Infarktvolumina 24 Stunden nach fMCAo. Die Ergebnisse der Versuchsreihe waren in Anbetracht einer relativen Standardabweichung von 20% valide. Auch im neurologischen Defizit nach ischämischem Schlaganfall zeigte sich keinen Unterschied zwischen SCN1a_{het}- und SCN1a_{wt}-Mäusen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Annahme, dass mehr CSDs zu größeren Infarktvolumina führen, wie u.a. von *Eikermann-Haerter et al.* an transgenen FHM1 Mäusen gezeigt wurde.⁶⁴ Als Erklärung unserer Daten vermuten wir einen ausbleibenden vasokonstriktiven Effekt der heterozygoten SCN1a-Mutation auf das zerebrale Gefäßnetzwerk, welcher vor allem in der Penumbra für eine Ausbreitung des ischämischen Areal und damit vergrößertem Infarktkern verantwortlich ist.^{68,71-73} Sowohl in der SCN1a_{wt}-Gruppe, als auch in SCN1a_{het}-Mäusen scheinen die vaskulären Strukturen im gleichen Maße auf die Ischämie zu reagieren, oder im Falle der heterozygoten Mutante nicht für eine messbare Ausprägung einer spreading ischaemia zu sorgen (s. Kapitel 4.2.2.1).⁷⁵ Ein signifikanter Effekt der SCN1a_{het}-Mutation auf die Größe des Infarkts und das neurologische Outcome nach Induktion einer fMCAo bleibt somit vermutlich aus.

4.2.2 Versuchsreihe 2: Messung der CSDs in SCN1a_{wt/het} Mäusen

Die signifikant höhere Anzahl kortikaler Streudepolarisation in der kumulativen Messung über 120 min. in SCN1a_{het}-Mäusen deckt sich gut mit bisher erschienenen Publikationen, welche sowohl für transgene Linien der FHM1 als auch FHM2 veröffentlicht wurden, die ebenfalls eine niedrigere Auslöseschwelle für CSDs bei diesen Tieren aufzeigen.^{64,124,160}

Mit dem bereits postulierten Mechanismus¹³⁹ der FHM3 lässt sich eine verstärkte neuronale Erregbarkeit erklären, welche selbst unter physiologischen Bedingungen zu einer vermehrten Anzahl kortikaler Streudepolarisationen geführt haben kann. Mögliche Mechanismen sind eine durch Interneuronen vermittelte, erhöhte extrazellulären K⁺-Konzentration, die durch eine beschleunigte Erholung der Na_v1.1 aus ihrem refraktären Zustand verstärkt wird oder durch die bereits diskutierte Kumulation von exzitatorisch wirkendem GABA und der daraus folgenden Erschöpfung des zellulären Cl⁻-Gradienten.¹³⁹ Im Falle einer zusätzlichen Ischämie vermuten wir bei SCN1a_{het}-Mäusen einen „additiven Effekt“: Untergegangene Neurone, vor allem in der Penumbra, und das vorliegende metabolische Mismatch mit hier ebenfalls supraphysiologischen K⁺-Konzentrationen, begünstigt die Entstehung von CSDs. Dieser Prozess wird durch die SCN1a-Mutation verstärkt.⁶⁷ Dadurch kommt es zu einem Absenken der CSD-Schwelle und zu einem vermehrten Auslösen von kortikaler Streudepolarisationen (hier auch Periinfarktdepolarisationen). Somit konnten wir zeigen, dass die SCN1a-Mutation nicht nur physiologische, sondern auch pathologische CSDs vermehrt auszulösen vermag.

Der von uns beobachtete signifikante Geschlechtsunterschied, d.h. die weitaus höhere Rate von CSDs bei weiblichen FHM3 Versuchstieren, lässt sich ebenfalls mit bereits publizierten Daten vereinbaren. Auch Weibchen einer transgenen FHM2 Mauslinie (G301R) zeigten im Vergleich zu Männchen eine erhöhte Rate kortikaler Streudepolarisationen.¹⁶⁰ Ein ähnlicher CSD-Phänotyp zeigte sich auch bei der FHM1 Weibchen mit der R192Q Mutation.¹⁶¹ Diese Befunde legen eine androgenvermittelte Hemmung kortikalen Streudepolarisationen nahe.¹⁶¹ Die Annahme wird durch Experimente an weiblichen Ratten gestützt, bei denen nach topischer Applikation von Östrogenen/Progesteronen eine Verkürzung der Dauer und eine Erhöhung der Amplitude kortikaler Streudepolarisationen gezeigt werden konnte.¹⁶²

Auch beim Menschen ist die Migräne bei Frauen doppelt so häufig wie bei Männern und die Frequenz von Migräneanfällen kann sich während der Menopause oder der Schwangerschaft ändern.^{163,164} Insofern sind unsere Ergebnisse gut mit der Literatur und den Befunden beim Menschen vereinbar.

Zu vermerken ist, dass in beiden Gruppen die CSD Geschwindigkeit größer war als die in der Literatur angegeben 3–5 mm/min.⁴ Diese Geschwindigkeit bezieht sich jedoch auf unter physiologischen Bedingungen ablaufende CSDs. So haben Messungen an Migränepatienten CSD-Geschwindigkeiten von $3,5 \pm 1,1$ mm/min ergeben, während eine Studie an Schlaganfallpatienten Ausbreitungsgeschwindigkeiten mit einer großen Varianz von 1,1–9,2 mm/min angibt.^{55,165} Diese Werte stimmen mit Messungen in experimentellen Schlaganfalluntersuchungen an FHM2 Mäusen überein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die in der aktuellen Arbeit gemessenen Werte der Realität entsprechen.^{124,160}

Die Amplituden der CSDs entsprechen in allen Gruppen den in der Literatur genannten 10–30 mV.⁴ Das interessante an diesem Parameter ist, dass er positiv mit der Schwere der Gewebeschädigung nach Schlaganfall korreliert. N-Palmitoylethanolamin, welches im Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion der Läsionen nach ischämischem Schlaganfall führte, zeigte auch eine Reduktion der CSD-Amplituden.¹⁶⁶ Experimente an Ratten zeigten nach Applikation von TNF-alpha (Tumornekrosefaktor alpha) ebenfalls eine signifikante Reduktion der CSD-Amplituden.¹⁶⁷ Dadurch, dass in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied der Amplituden beobachtet wurde, kann im Umkehrschluss gefolgert werden, dass die beiden Gruppen vermehrt aufgetretenen CSDs nicht zu einer Vergrößerung des post-ischämischen Gewebeschadens geführt haben.

4.2.2.1 Zerebrale Perfusion

Die CBF-Messungen in den FHM3 Mäusen zeigen zu Beginn jeder CSD eine reflektorische Hyperämie. Dies entspricht nicht den Beobachtungen von *Eickermann-Haerter et al.* 2012 an FHM1 Mäusen sowie anderen Studien, die eine inverse neurovaskuläre Kopplung, größere Infarktvolumen und ein schlechteres funktionelles Outcome nach Schlaganfall beobachtet haben.^{64,68,69,124,160}

Die Funktionsfähigkeit der neuro-vaskulären Kopplung spielt für die Auswirkungen von CSDs eine zentrale Rolle.^{44-46,68,69,75} Da diese bei FHM3 erhalten ist, wird klar, warum wir bei diesen Tieren keine größeren Infarktvolumen nach zerebraler Ischämie beobachtet haben. Trotz einer erhöhten Zahl von CSDs, folgte diesen immer eine regelrechte Durchblutungsantwort und keine „spreading ischaemia“, d.h. eine inverse neuro-vaskuläre Kopplung. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die betroffenen Na⁺-Kanäle nicht nur auf Interneuronen exprimiert werden, sondern auch im Endothel zerebraler Gefäße zu finden sind. Tatsächlich werden spannungsabhängige Natriumkanäle als wichtige Komponente von Endothelfunktion, Angiogenese und vasodilatatorischer Mechanismen diskutiert.^{168,169}

Die gain-of-function-Mutation bei FHM3 Mäusen könnte somit zu einer erhöhten Rate von kortikalen Streudepolarisationen führen, aber durch eine erhöhte Gefäßreaktivität gleichzeitig die zerebrale Perfusion erhöhen. Gestützt wird diese Erklärung, durch die bei Wildtyp-Tieren fast durchgängig nach post CSD beobachtete Hypoperfusion.

Eine weitere, eher technische Erklärungsmöglichkeit für diese Ergebnisse ist, dass die Messelektroden bei FHM3 Tieren nicht in ischämischem, sondern in gesundem Hirngewebe positioniert wurden. Da die Gefäßantwort von der Entfernung zum Infarktkern abhängig ist, könnte damit eine inverse NV-Kopplung übersehen worden sein.⁶⁹ Diese Erklärung kann allerdings so gut wie sicher ausgeschlossen werden, da in allen Versuchstieren die Elektroden an die gleiche Stelle platziert wurden und die Infarktgrößen in beiden Versuchsgruppen gleich waren.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel unserer Studie war es, mithilfe neurophysiologischer Messungen den Einfluss der FHM3 Phänotyps auf die Suszeptibilität hinsichtlich kortikaler Streudepolarisationen sowie deren Ausbreitungsgeschwindigkeit und Amplitude zu untersuchen. Darüber hinaus sollten potenzielle Unterschiede im Outcome nach experimentellem ischämischen Schlaganfall aufgezeigt werden. Mithilfe unserer Experimente wird die Theorie bestärkt, dass eine gain-of-function Mutation in Na⁺-Kanälen GABAerger Interneurone die Schwelle für kortikale Streudepolarisationen im Mausmodell signifikant herabsetzt. Darüber hinaus ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit erhöht. Hinsichtlich der zerebralen Perfusion während CSDs zeigt sich bei FHM3 Mäusen eine unerwartete physiologische Gefäßreaktion mit Hyperperfusion. Diese scheint für das Fehlen eines negativen Effekts auf das Infarktvolume, sowie das neurologische Outcome nach ischämischen Schlaganfall verantwortlich zu sein. Weitere Studien mit einer höheren Tieranzahl müssen in Zukunft diesen Befund weiter untersuchen.

Nichtsdestotrotz ordnet sich die Schlussfolgerung unserer Ergebnisse in die bisherige Datenlage der genetischen Migräneerkrankungen ein und zeigt den potenziellen Stellenwert kortikaler Streudepolarisationen in der Krankheitsentstehung, -behandlung sowie -prävention.

Die Möglichkeit des Monitorings von CSDs, ihre Auswirkung auf den zerebralen Stoffwechsel, sowie ihre Rolle in der Migräne aber auch akuten Schlaganfall- und Trauma-Geschehen zeigen ihr hohes Potential und Bedeutung in zukünftigen Studien. Insbesondere die Möglichkeit nicht-invasiver CSD-Messungen mittels funktioneller Bildgebung, erlaubt eine Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen.

Die Weiterentwicklung wirkungsvoller Therapiestrategien zur direkten Hemmung kortikaler Streudepolarisationen (wie bereits mit Migräneprophylaktika gezeigt)⁵⁹ bietet eine Möglichkeit die sekundäre Ausbreitung geschädigter Hirnareale zu verhindern und damit das neurologische Outcome von Patienten maßgeblich zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Leao, A. A. P. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 7: 359–390.
2. Ayata, C., Lauritzen, M. (2015). Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev*, 95(3): 953–93.
3. Somjen, G. G. (2001). Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression like depolarization. *Physiol Rev*, 81: 1065–1096.
4. Ayata C. (2009) Spreading depression: from serendipity to targeted therapy in migraine prophylaxis. *Cephalgia*, (10): 1095–114.
5. Leao, A. A. P. (1947). Further observations on spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 10(6): 409–14.
6. Leao, A. A. P., Morison, R. S. (1945) Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*, 8: 33–45,
7. Libet, B., Gerard, R. W. (1939). Control of the potential rhythm of the isolated frog brain. *J Neurophysiol*, 153–169.
8. Lauritzen, M. et al. (1988). Quisqualate, kainite and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res*, 475(2): 317–27.
9. Mayevsky, A. et al. (1996). Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res*, 740(1-2): 268–74.
10. Rodgers, Cl. et al. (2007). Stress preconditioning of spreading depression in the locust CNS. *PLoS One*, 2(12): e1366.
11. Rounds, H. D. (1967). KC1-induced 'spreading depression' in the cockroach. *J Insect Physiol*, 13(6): 869–72.

12. Yokata, C. et al. (2002). Unique profile of spreading depression in a primate model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(7): 835–42.
13. Fujita, S. et al. (2016). Cytoarchitecture- Dependent decrease in propagation velocity of cortical spreading depression in the rat insular cortex revealed by optical imaging. *Cereb Cortex*, 26(4): 1580–1589
14. Tang, Y. T. et al. (2014). Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol*, 112(10): 2572–2579.
15. Sramka, M. et al. (1977). Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. *Appl Neurophysiol*, 40: 48–61.
16. Ebersberger A., et al. (2001). Is there a correlation between spreading depression, neurogenic inflammation, and nociception that might cause migraine headache? *Ann Neurol*, 49(1): 7–13.
17. Hosseini-Zare, M. S. et al. (2017). Effects of experimental traumatic brain injury and impaired glutamate transport on cortical spreading depression. *Exp Neurol*, 295: 155–161.
18. Koroleva, V. I., Vykhodtseva, N. I., Elagin, V. A. (1986). Spreading depression in the cortex and subcortical structures of the brain of the rat induced by exposure to focused ultrasound. *Neirofiziologiya*, 18: 55–61.
19. Raymond, S. B. et al. (2007). Multiphoton imaging of ultrasound/ Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 393–403.
20. Sato, S. et al. (2014). Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia. *PLoS One*, 9: e82891.
21. Somjen, G. G. (2001). Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depressionlike depolarization. *Physiol Rev*, 81: 1065–1096.

22. Balestrino, M., Young, J., Aitken, P. (1999). Block of Na⁺/K⁺-ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res*, 838: 37–44.
23. Gerich, F. J. et al. (2006). Mitochondrial inhibition prior to oxygen withdrawal facilitates the occurrence of hypoxia-induced spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 96: 492–504.
24. Rex, A. et al. (1999). Cortical NADH during pharmacological manipulations of the respiratory chain and spreading depression in vivo. *J Neurosci Res*, 57(3): 359–70.
25. Hansen, A. J., Quistorff, B., Gjedde, A. (1980). Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular K⁺ during spreading depression. *Acta Physiol Scand*, 109(1): 1–6.
26. Nicolson, C. et al. (1978), Calcium and potassium changes in extracellular microenvironment of cat cerebellar cortex. *J Neurophysiol*, 41(4): 1026–39.
27. Nicholson, C., Kraig, R. P. (1975). Chloride and potassium changes measured during spreading depression in catfish cerebellum. *Brain Res*, 96(2): 384–9.
28. Van Harreveld, A., Schade, J. P. (1959). Chloride movements in cerebral cortex after circulatory arrest and during spreading depression. *J Cell Comp Physiol*, 54: 65–8.
29. Smith, J. M. et al. (2006) Physiological studies of cortical spreading depression. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 81(4): 457–81
30. Van Harreveld, A., Khattab, F. I. (1967). Changes in cortical extracellular space during spreading depression investigated with the electron microscope. *J Neurophysiol*, 30(4): 911–29.

31. Fabricius, M., Jensen, L. H., Lauritzen, M. (1993). Microdialysis of interstitial amino acids during spreading depression and anoxic depolarization in rat neocortex. *Brain Res*, 612(1-2): 61–9.
32. Molchanova, S. et al. (2004). Interstitial concentrations of amino acids in the rat striatum during global forebrain ischemia and potassium-evoked spreading depression. *Neurochem Res*, 29(8): 1519–27.
33. Cruz, N. F., Adachi, K., Dienel, G. A. (1999). Rapid efflux of lactate from cerebral cortex during K-induced spreading cortical depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 380–392.
34. Lauritzen, M. (1990). Cortical spreading depression is associated with arachidonic acid accumulation and preservation of energy charge. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10(1): 115–22.
35. Csiba, L., Paschen, W., Mies, G. (1985). Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain. *Brain Res*, 336: 167–170.
36. Scheller, D., Kolb, J., Tegtmeier, F. (1992). Lactate and pH change in close correlation in the extracellular space of the rat brain during cortical spreading depression. *Neurosci Lett*, 135: 83–86.
37. Sun, X. et al. (2011). Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. *Neuroimage*, 57: 873–884.
38. Sakadzic, S. et al. (2009). Simultaneous imaging of cerebral partial pressure of oxygen and blood flow during functional activation and cortical spreading depression. *Appl Opt*, 48: D169–177.
39. Takano, T. et al. (2007). Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci*, 10: 754–762.

40. Fordsmann J. C. et al. (2013). Increased 20 HETE synthesis explains reduced cerebral blood flow but not impaired neurovascular coupling after cortical spreading depression in rat cerebral cortex. *J Neurosci*, 33(6):256–270.
41. Leybaert, L. (2005). Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(1):2-16
42. Koehler, R. C. et al. (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*, 100(1):307-17.
43. Read, S. J. et al. (1997). The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neurosci Lett*, 232: 127–130.
44. Colonna, D. M. et al. (1994). Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke*, 25: 2463–2470.
45. Meng, W. et al. (1995). Nitric oxide and prostaglandins interact to mediate arteriolar dilation during cortical spreading depression. *Am J Physiol*, 269: H176–H181.
46. Shibata, M., Leffler, C. W., Busija, D. W. (1990). Cerebral hemodynamics during cortical spreading depression in rabbits. *Brain Res*, 530: 267–274.
47. Nielsen, A. N., Fabricius, M., Lauritzen, M. (2000) Scanning laser-Doppler flowmetry of rat cerebral circulation during cortical spreading depression. *J Vasc Res*, 37: 513–522.
48. Obrenovitch, T. P., Chen, S., Farkas, E. (2009). Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods. *Neuroimage*, 45: 68–74.

49. Dunn, A. K. et al. (2001). Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21: 195–201.
50. Florence, G. et al. (1994). Spreading depression reversibly impairs autoregulation of cortical blood flow. *Am J Physiol*, 266: R1136–R1140.
51. Lauritzen, M. et al. (1982). Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol*, 12(5): 469–74.
52. Richter, F., Lehmenkühler, A. (2008). Cortical spreading depression (CSD): a neurophysiological correlate of migraine aura. *Schmerz*, 22(5): 544–6, 548–50.
53. Lauritzen, M. (1994). Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117 (Pt 1): 199–210
54. Olesen, J., Larsen, B., Lauritzen, M. (1981). Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol*, 9(4): 344–52.
55. Hadjikhani, N. et al. (2001). Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4687–92
56. Lauritzen, M. et al. (1983). Changes in regional cerebral blood flow during the course of classic migraine attacks. *Ann Neurol*, 13: 633–41.
57. Olesen, J. (1991). Cerebral and extracranial circulatory disturbances in migraine: pathophysiological implications. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 3: 1–28.
58. Moskowitz, M. A., Nozaki, K., Kraig, R. P. (1993). Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci*, 13: 1167–77.

59. Ayata, C. et al. (2006). Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*, 59:652–61.
60. Eikermann-Haerter, K. et al. (2009). Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest*, 119: 99–109.
61. van den Maagdenberg, A. M. et al. (2004). A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*, 41: 701–10.
62. Branston, N. M., Strong, A. J., Symon, L. (1977). Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex. *J Neurol Sci*, 32: 305–321.
63. Nedergaard, M., Hansen, A. J. (1993). Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 568–574.
64. Eikermann-Haerter, K. et al. (2012). Migraine mutations increase stroke vulnerability by facilitating ischemic depolarizations. *Circulation*, 125: 335–345.
65. Astrup, J., Siesjo, B. K., Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke*, 12: 723–725.
66. Heiss, W. D. (2012). The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci*, 1268: 26–34.
67. Von Bornstädt, D. et al. (2015). Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origin of spreading injury depolarizations *Neuron*, 85(5): 1117–31.
68. Shin, H. K. et al. (2006). Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 1018–1030.

69. Strong, A. J. et al. (2007). Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain*, 130: 995–1008.
70. Takeda, Y. et al. (2011). Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31: 1863–1873.
71. Branston, N. M., Strong, A. J., Symon, L. (1982). Kinetics of resolution of transient increases in extracellular potassium activity: relationships to regional blood flow in primate cerebral cortex. *Neurol Res*, 4: 1–19.
72. Luckl, J. et al. (2012). Peri-infarct flow transients predict outcome in rat focal brain ischemia. *Neuroscience*, 226: 197–207.
73. Dijkhuizen, R. M. et al. (1999). Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain. *Brain Res*, 840: 194–205.
74. Shin, H. K. et al. (2007). Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain*, 130: 1631–1642.
75. Lauritzen, M. et al. (2011) Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(1): 17–35.
76. Dreier, J. P. et al. (2009). Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*, 132(Pt 7): 1866–81.
77. Helbok, R. et al. (2017). Spreading depolarizations in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Association with perihematomal edema progression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(5): 1871–1882.

78. Hinzman, J. M. et al. (2014). Inverse neurovascular coupling to cortical spreading depolarizations in severe brain trauma. *Brain*, 137(Pt 11): 2960–72.
79. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) (2018). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalgia*, 38(1): 1–211.
80. Bigal, M. E. et al. (2008). Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: a longitudinal population-based study. *Headache*, 48(8): 1157–68.
81. GBD 2016 Neurological Disorders Collaborator Group (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390: 1211–59.
82. Natoli, J. L. et al. (2010). Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia*, 30(5): 599–609.
83. Yoon, M. S., et al. (2012). Prevalence of primary headaches in Germany: results of the German Headache Consortium Study. *J Headache Pain*, 13: 215–223.
84. Buse, D. C. et al. (2010). Sociodemographic and comorbidity profiles of chronic migraine and episodic migraine sufferers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, (4): 428–32.
85. Meletiche, D., Lofland, J. H., Young, W. B. (2001). Quality of life differences between patients with episodic and transformed migraine. *Headache*, 41(6): 573–8.
86. Russel, M. B., Ducros, A. (2011). Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*, 10(5): 457–70

87. Terwindt, G. M. et al. (1996). Familial hemiplegic migraine: a clinical comparison of families linked and unlinked to chromosome 19. *Cephalgia*, 16(3): 153–5.
88. Kors, E. E. et al. (2003) Expanding the phenotypic spectrum of the CACNA1A gene T666M mutation: a description of 5 families with familial hemiplegic migraine. *Arch Neurol*, 60(5): 684–8.
89. Jurkat-Rott, K. et al. (2004) Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology*, 62(10):1857–61.
90. Thomson, L. L. et al. (2002). A population based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria. *Brain*, 125(Pt 6): 1379–91.
91. Ducros, A. et al. (2001). The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N Engl J Med*, 345(1): 17–24.
92. Thomson, L. L. et al (2003). Evidence for a separate type of migraine with aura: sporadic hemiplegic migraine. *Neurology*, 60(4): 595–601.
93. Prontera, P. et al. (2018). Epilepsy in hemiplegic migraine: Genetic mutations and clinical implications. *Cephalgia*, 38(2): 361–373.
94. Hayashi, R. et al. (1998). Familial hemiplegic migraine with irreversible brain damage. *Intern Med*, 37(2): 166–8.
95. Vanmolkot, K. R. et al. (2006) Severe episodic neurological deficits and permanent mental retardation in a child with a novel FHM2 *ATP1A2* mutation. *Ann Neurol*, 59(2): 310–4.
96. Takahashi, T. et al. (2005). Autopsy case of acute encephalopathy linked to familial hemiplegic migraine with cerebellar atrophy and mental retardation. *Neuropathology*, 25(3): 228–34.

97. Razavi, M. et al. (2000). Hemiplegic migraine induced by exertion. *Arch Neurol*, 57(9): 1363–5.
98. Malpas, T. J. et al. (2010). Sporadic hemiplegic migraine and delayed cerebral edema after minor head trauma: a novel de novo *CACNA1A* gene mutation. *Dev Med Child Neurol*, 52(1): 103–4.
99. Kors, E. E. et al. (2001). Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the *CACNA1A* calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol*, 49(6): 753–60.
100. Clarke, J. M. (1910). On recurrent motor paralysis in migraine, with report of a family in which recurrent hemiplegia accompanied the attacks. *Brit Med J*, 1: 1534–1538.
101. Joutel, A. et al (1993). A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat Genet*, 5(1): 40–5.
102. Ophoff, R. A. et al. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene *CACNL1A4*. *Cell*, 87(3): 543–52.
103. De Fusco, M. et al. (2003). Haploinsufficiency of *ATP1A2* encoding the Na^+/K^+ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*, 33(2): 192–6.
104. Dichgans, M. et al. (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel *SCN1A* in familial hemiplegic migraine. *Lancet*, 366(9483): 371–7.
105. Westenbroek, R. E. et al. (1995). Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci*, 15(10): 6403–18.

106. Riant, F. et al. (2010). De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. *Neurology*, 75(11): 967–72
107. Freilinger, T. et al. (2011). A novel mutation in *CACNA1A* associated with hemiplegic migraine, cerebellar dysfunction and late-onset cognitive decline. *J Neurol Sci*, 300: 160–163.
108. de Vries, B. et al. (2008) *CACNA1A* mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalgia*, 28: 887–891.
109. de Vries, B. et al. (2009). Molecular genetics of migraine. *Hum Genet*, 126(1): 115–32.
110. Tottene, A. et al. (2005). Specific kinetic alterations of human Ca_v 2.1 calcium channels produced by mutation s218l causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J Biol Chem*, 280: 17678–86.
111. Tottene, A. et al. (2009). Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca_v 2.1 knock-in migraine mice. *Neuron*, 61: 762–773.
112. Kaplan, J. H. (2002), Biochemistry of Na⁺/K⁺-ATPase. *Annu Rev Biochem*, 71: 511–35
113. Isaksen, T. J., Lykke-Hartmann, K. (2016). Insights into the Pathology of the α2-Na⁺/K⁺-ATPase in Neurological Disorders; Lessons from Animal Models *Front Physiol*, 7: 161.
114. Blanco, G. et al. (1999). Functional characterization of a testes- specific alpha subunit isoform of the sodium/potassium adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, 38(41): 13661–9

115. Larsen, B. R. et al. (2014). Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. *Glia*, 62(4): 608–22.
116. Shattock, M. J. et al. (2015). Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J Physiol*, 593(6): 1361–82
117. Friedrich, T., Tavraz, N. N., Junghans, C. (2016). ATP1A2 Mutations in Migraine: Seeing through the Facets of an Ion Pump onto the Neurobiology of Disease. *Front Physiol*, 7: 239.
118. Grewer, C., Rauen, T. (2005). Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. *J Membr Biol*, 203(1): 1–20.
119. James, P. F. et al. (1999) Identification of a specific role for the Na⁺/K⁺-ATPase α2 Isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell*, 3(5): 555–63.
120. Kiedrowski, L. et al. (1994). Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron*, 12(2): 295–300.
121. Barrett, C. F. et al. (2008) Familial hemiplegic migraine. *Adv Genet*, 63: 57–83.
122. Koenderink, J. B. et al. (2005). Na⁺/K⁺-ATPase mutations in familial hemiplegic migraine lead to functional inactivation. *Biochim Biophys Acta*, 1669(1): 61–8.
123. Tottene, A. et al. (2002). Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca²⁺ influx through single human Ca_v 2.1 channels and decrease maximal Ca_v 2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20): 13284–9.
124. Leo, L. et al. (2011). Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet*, 7(6): e1002129.

125. Uekawa, M. et al. (2018). Enhanced susceptibility to cortical spreading depression in two types of Na⁺,K⁺-ATPase α 2 subunit-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine 2. *Cephalgia*, 38(9): 1515–1524.
126. Trimmer, J. S., Rhodes, K. J. (2004). Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol.*, 66: 477–519.
127. Fan, C. et al. (2016) Early-onset familial hemiplegic migraine due to a novel SCN1A mutation. *Cephalgia*, 36(13): 1238–1247.
128. Hedrich, U. B. (2014). Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J Neurosci*, 34(45): 14874–89.
129. Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1): 13–25.
130. Meng, H. et al. (2015). The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationship among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat*, 36(6): 573–80.
131. Henriksen, M. W. et al. (2018). De novo mutations in SCN1A are associated with classic Rett syndrome: a case report. *BMC Med Genet*, 19(1): 184
132. Zhang, Y. et al. (2017). A novel SCN1A mutation identified in a chinese family with familial hemiplegic migraine: A casereport. *Cephalgia*, 37(13): 1294–1298.
133. Dhifallah, S. et al. (2018). Gain of Function for the *SCN1A*/hNav1.1-L1670W Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine. *Front Mol Neurosci*, 11: 232.
134. Weller, C. M. et al. (2014). Two novel SCN1A mutations identified in families with familial hemiplegic migraine. *Cephalgia*, 34(13): 1062–9.

135. Castro, M. J. et al. (2009). First mutation in the voltage-gated Nav1.1 subunit gene SCN1A with co-occurring familial hemiplegic migraine and epilepsy. *Cephalgia*, 29(3): 308–13.
136. Vahedi, K. et al. (2009). Elicited repetitive daily blindness: A new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations. *Neurology*, 72(13): 1178–83.
137. Ogiwara, I. et al. (2007). Na_v 1.1 localizes to axon of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: A circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an SCN1A gene mutation. *J Neurosci*, 27(22): 5903–14.
138. Vanmolkot, K. et al. (2007). The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: Genetic and functional studies. *Hum Mutat*, 28(5): 522.
139. Cestèle, S. et al. (2008). Self-limited hyperexcitability: Functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Na_v 1.1 (SCN1A) channel. *J Neurosci*, 28: 7273–7283.
140. Cestèle, S. et al. (2013). Nonfunctional NaV1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 17546–17551.
141. Avoli, M. et al. (1996). Synchronization of rat hippocampal neurons in the absence of excitatory amino acid-mediated transmission. *Brain Res.*, 735(2): 188–96.
142. Marty, A., Llano, I. (2005). Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci.*, 28(6):284-9.
143. Spampinato, J. et al. (2003). Generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 mutation W1204R alters voltage-dependent gating of Na_v 1.1 sodium channels. *Neuroscience*, 116(1):37-48.

144. Koizumi, J. et al. (1986). Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, (8): 1–8.
145. Bederson, J. B. et al. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17(3): 472–6.
146. Godukhin, O. V., Obrenovich, T. P. (2001). Asymmetric propagation of spreading depression along the anteroposterior axis of the cerebral cortex in mice. *J Neurophysiol*, 86(4): 2109–11.
147. Tamura, A. et al. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1(1): 53–60.
148. Shigeno, T. et al. (1985). Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg*, 63(2): 272–7.
149. Llovera, G. et al. (2014). Modeling stroke in mice: permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. *J Vis Exp.*, (89): e51729.
150. Watson, B. D. et al. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17(5): 497–504.
151. Kleinschnitz, C. et al. (2008). Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway–driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis. *Stroke*, 39(4): 1262–1268.
152. Fluri, F., Schuhmann, M. K., Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*, 9: 3445–54.

153. Chu, P-L., Keum, S., Marchuk, D. A. (2013). A novel genetic locus modulates infarct volume independently of the extent of collateral circulation. *Physiol Genomics*, 45(17): 751–763.
154. Lee, J. H. et al. (2016). Improved therapeutic benefits by combining physical cooling with pharmacological hypothermia after severe stroke in rats. *Stroke*, 47(7): 1907–1913.
155. Schmid-Elsaesser, R. et al. (1998). Critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry. *Stroke*, 29(10): 2162–2170.
156. Popp, A. et al. (2009). Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*, 4(3): e4764.
157. Ding, G. L. et al. (2014). Magnetic Resonance Imaging of Stroke in the Rat. *Chinese Journal of microwave & radio-frequency spectroscopy*, 31(1): 116–132.
158. Obrenovitch, T. P., Chen, S., Farkas, E. (2009). Simultaneous, live imaging of cortical spreading depression and associated cerebral blood flow changes, by combining voltage-sensitive dye and laser speckle contrast methods. *Neuroimage*, 45(1): 68–74.
159. Oka, F. et al. (2017). Requisite ischemia for spreading depolarization occurrence after subarachnoid hemorrhage in rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(5): 1829–1840.
160. Kros, L., Lykke-Hartmann, K., Khodakhah, K. (2018). Increased susceptibility to cortical spreading depression and epileptiform activity in a mouse model for FHM2. *Sci Rep*, 8(1): 16959.
161. Eikermann-Haerter, K. et al. (2009). Androgenic suppression of spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *Ann Neurol*, 66(4): 564–8.

162. Accioly, N. E., Guedes, R. C. A. (2019). Topical cortical application of ovarian hormones and modulation of brain electrical activity: analysis of spreading depression in well-nourished and malnourished female rats. *Nutr Neurosci*, 31: 1–9.
163. Burch, R. C. et al. (2015). The prevalence and burden of migraine and severe headache in the United States: Updated statistics from government health surveillance studies. *Headache*, 55(1): 21–34.
164. Ferrari, M. D. et al. (2015). Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol*, 14(1): 65–80.
165. Woitzik, J. et al. (2013). Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology*, 80(12): 1095–102.
166. Richter, F., Koulen, P., Kaja, S. (2016). N-Palmitoylethanolamine prevents the run-down of amplitudes in cortical spreading depression possibly implicating proinflammatory cytokine release. *Sci Rep*, 6: 23481.
167. Richter, F. et al. (2014). Tumor necrosis factor reduces the amplitude of rat cortical spreading depression in vivo. *Ann Neurol*, 76(1): 43–53.
168. Figueroa, X. F. et al. (2007). Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(3): H1371–83.
169. Andrikopoulos, P. et al. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Biol Chem*, 286(19): 16846–60.
170. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2010). Biochemie. *Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6. Auflage*, S. 416

Danksagung

Ohne die große Unterstützung vieler Personen, wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. Nikolaus Plesnila**, für die Möglichkeit mich an der Forschung beteiligen zu dürfen, für die Überlassung des Themas und eine ausgezeichnete Betreuung.

Dr. med. Eva Auffenberg für die geduldige Einarbeitung in die komplexe Methodik.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten **Arbeitsgruppe Plesnila** bedanken, welche mich vom ersten Tag an mit offenen Armen in Ihren Reihen begrüßte. Hier insbesondere zu erwähnen:

Uta Mamrak, welche mein Projekt von Anfang an mit Professionalität und Hilfsbereitschaft verfolgte.

Rebecca Siemel und **Susanna Valero Freitag** für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinem guten und langjährigen Freund **Orlando Wanninger** für seine überragende Expertise bei der Erstellung einiger Abbildungen dieser Arbeit.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, **Biljana, Vojislav** und **Andrej Saicic** für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre kontinuierliche Unterstützung in meinem Werdegang.

Eidstattliche Versicherung

Ich, Stefan Saicic, geboren am 04.12.1990 erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Rolle neuronaler Na_v 1.1. Kanäle für die Auslösung von Periinfarktdepolarisationen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 14.07.2021

Stefan Saicic, geb. 04.12.1990, Belgrad