

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
-Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape-

**Wirkung vom Fieber als Auslöser epileptischer Aktivitäten
in kombinierten Hirnschnitten von juvenilen Ratten.**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Macht, Alexandra
aus Omsk (Russland)

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ. -Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ali Gorji

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Greiner

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
-Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape-
Referent: Prof. Dr. med. Ali Gorji
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Christoph Greiner

ZUSAMMENFASSUNG

Wirkung vom Fieber als Auslöser epileptischer Aktivitäten in kombinierten Hirnschnitten von juvenilen Ratten.

Alexandra Macht

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit eine künstlich herbeigeführte Hyperthermie, also auch Fieber, in juvenilen Ratten vom unterschiedlichen Alter zu einer Veränderung zellulärer Erregbarkeit führen kann. Akuter (sofortiger) und chronischer (vier Wochen nach Fieber- Auslösung) Effekt eines Fieberkrampfes sollte in Bezug auf die Schwelle der Auslösbarkeit der SD und epileptiformer Feldpotentiale beobachtet werden. In unserem Experiment demonstrierten Tiere im Alter von 18 bis 24 Tagen eine signifikant höhere Epilepsiebereitschaft sowohl direkt, als auch vier Wochen nach dem Fieber im Vergleich zu den anderen Altersgruppen. Als Zeichen einer leichteren Auslösbarkeit von SD nach der Hyperthermiebehandlung fand sich eine Abnahme der Latenz. Bezüglich der elektrophysiologischen Charakteristika von SD zeigte sich eine signifikante Zunahme der Dauer des negativen Feldpotentials. Die zunehmende Dauer von SD und die damit einhergehenden Ionenverschiebungen weisen auf eine pathologische Veränderungen hin. Als Zeichen einer neuronalen Störung konnte eine Abnahme der Feldpotentialamplitude beobachtet werden. Nach dem bisher dargestellten konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit bzw. Bereitschaft zum Auslösen epileptischer Aktivität altersabhängig und während der Ontogenese der Hirngewebe bei den Ratten hoch ist. Und eine Hyperthermie bzw. Fieber, kann vor allem während der Ontogenese zu einer Veränderung zellulärer Erregbarkeit führen. Die neuronalen Veränderungen, die auch lang anhaltend auftreten, tragen zur Manifestation einer Temporallappenepilepsie bei.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2011

Die tierexperimentelle Arbeit wurde vom Regierungspräsidenten Münster im Schreiben von 19.02.2002 (Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 79/2002)) genehmigt.

***In Liebe
meinem Ehemann und meinen Eltern***

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Entdeckung der Cortical Spreading Depression.....	1
1.1.1 Theoretische Aspekte zu Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen der Spreading Depression.....	3
1.1.2 Allgemeine Eigenschaften der SD.....	6
1.1.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD.....	7
1.1.4 Ionenverteilung während der SD.....	9
1.1.5 Klinische Relevanz von SD.....	11
1.1.6 Interaktion zwischen SD und epileptischen Entladungen.....	12
1.1.7 Hyperthermie induziert epileptische Entladungen und SD.....	14
1.2 Fieberkrampf.....	15
1.2.1 Definition.....	15
1.2.2 Pathogenese.....	16
1.2.3 Symptomatik.....	18
1.2.4 Temporallappenepilepsie.....	19
1.2.5 Pathologie der Ammonshornsklerose.....	20
1.3 Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Hyperthermiemodell.....	23
2.2 Präparationsmethode.....	24
2.3 Versuchsaufbau.....	26

2.3.1 Interface-Messkammer.....	26
2.3.2 Extrazelluläre Signalleitung.....	28
2.4 Versuchsprotokolle.....	29
2.4.1 Methode 1.....	30
2.4.2 Methode 2.....	30
2.4.3 Versuchsreihe 1 (ohne Hyperthermie).....	31
2.4.4 Versuchsreihe 2.....	31
2.4.5 Versuchsreihe 3.....	32
2.5 Auswertung.....	34
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Kontrollversuche.....	37
3.2. Wirkung der akuten und chronischen Hyperthermie auf die Erregbarkeit des Hirngewebes von juvenilen Ratten.....	46
3.2.1 Auslösung der SD und EFP durch Superfusion von reduziertem NaCl (50%) in ACSF-Lösung.....	46
3.2.1 Auslösung der SD und EFP durch extrazelluläre Tropfenappli- kation einer 2mmol/l KCl-Lösung.....	59
3.3 Ausbreitung von SD.....	70
4. Diskussion.....	71
5. Zusammenfassung.....	79

6.Literaturverzeichnis.....	81
7.CurriculumVitae.....	99
8. Anhang.....	I
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	I
8.2 Tabellenverzeichnis.....	V
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	VI
9. Danksagung.....	VII

1. Einleitung

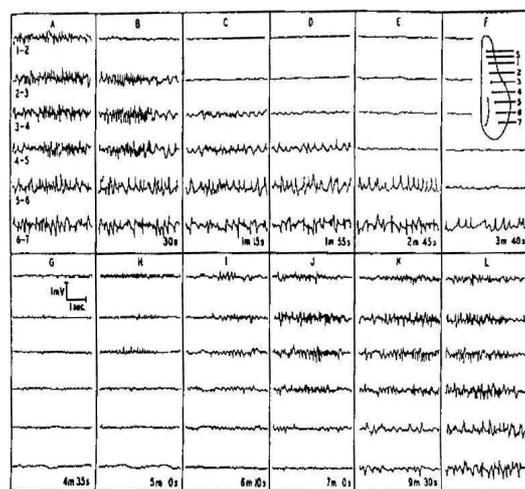
1.1 Entdeckung der Cortical Spreading Depression

Das zentrale Nervensystem ist sehr komplex und erfüllt in einem Lebewesen verschiedene Aufgaben:- Integration aller sensiblen Reize, die ihm von innerhalb oder außerhalb des Organismus zugeleitet werden (sogenannten Afferenzen), -Koordination sämtlicher motorischer Eigenleistungen des Gesamtorganismus, -Regulation aller dabei parallel ablaufenden Abstimmungsvorgänge zwischen den organismeigenen Subsystemen oder Organen, die im Körper von großer Notwendigkeit sind. Alle komplexeren Lebewesen benötigen ein System mit diesen Funktionen. Zugleich gibt es aber auch Phänomene, bei denen man bis heute nicht genau weiß welchen Zweck sie haben. Ein Beispiel für ein bekanntes Phänomene ist die Spreading Depression (SD). Nach allen bis heute bekannten Fakten ist die SD eine Antwort des Nervensystems auf einen pathologischen Stimulus. Die genaue Untersuchung der Mechanismen der SD-Entstehung kann sehr hilfreich für die Behandlung von Patienten mit Epilepsie, Migräne oder nach Schlaganfall sein.

Im Jahre 1941 beschrieb der amerikanische Neuropsychologe Lashley seine eigenen visuellen Migräneaura, welche sich typischerweise vor dem Auftreten von Migränekopfschmerzen entwickelten. Die Symptome, die er beschrieb begannen im Zentrum des Sehens und breiteten sich von dort in die Peripherie seines Gesichtsfeldes aus, innerhalb von einem Zeitraum von 10 bis 40 Minuten und mit einer Ausbreitungsgeschwindigkeit mit etwa 2-3 mm/min. Er interpretierte dieses Phänomen als eine Welle neuronaler Überregungen, gefolgt von neuronaler

Inhibition, die sich mit 3 mm/min über den visuellen Cortex ausbreitet (Lashley, 1941).

Der Begriff der Spreading Depression wurde erst 1944 durch den brasilianischen Wissenschaftler Aristides A. P. Leão geprägt. Während seiner Experimente, bei denen er die epileptische Aktivität im Kortex des Kaninchens untersuchte, beobachtete er nach elektrischer Stimulation des Kortex eine Welle intensiver neuronaler Erregungen, gefolgt von einer Depression der elektrokortikographischen Aktivität („*cortical spreading depression of electrocorticographik activity*“ (CSD)), die sich ebenfalls mit 2-5 mm/min vom Ort der Stimulation in alle Richtungen in der Hirnrinde des Kaninchens wanderte (Leão, 1944). Es sah so aus, als ob simultan alle kortikalen Antworten auf elektrische oder physiologische Stimuli verschwinden würden (Grafstein, 1956). Leão zeigte, dass SD ein reproduzierbares Phänomen ist und sich unter bestimmten Bedingungen gut analysieren lässt.



A

B

Abb. 1-1: A: Aristides Azevedo Pacheco Leão. Journal of Neurophysiology, 1944

B: Änderungen physiologischer Parameter während einer Spreading Depression (SD).

Leão's originale Illustration einer SD, 1944. Die Spuren zeigen eine räumliche und zeitliche aufgelöste elektrokortikographische Ableitung vom Kaninchenkortex nach elektrischer Stimulation. Im Schema rechts oben sind die Positionen der Stimulations-

(S) und Ableitelektroden eingezeichnet.

1945 brachten Leão und Morison die Klinik der Migräneaura des Menschen mit der SD in Experimenten mit den Tieren in Verbindung und formulierten hiermit die „Spreading Depression“ - Theorie der Migräneaura (Leão, 1945). Mittlerweile sind eine Vielzahl weitere Erkrankungen mit SD in Zusammenhang gebracht worden, zu denen solche Erkrankungen wie das Schädelhirntrauma (Mayevsky, 1996; Oka et al., 1977), der ischämische Hirninfarkt (Branston et al., 1977; Nedergaard, 1986; Strong et al., 1983), die Hypoglykämie (Astrup and Norberg, 1976) und die Epilepsie (Leão, 1944; Avoli et al., 1991) gehören.

1.1.1 Theoretische Aspekte zu Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen der Spreading Depression

Bis heute sind die Mechanismen, die zur Entstehung von SD führen, nicht ausreichend aufgeklärt. Der erste Erklärungsversuch *van Harreveld's* Asphyxie-Hypothese wurde unmittelbar wieder verworfen. *Harreveld's* Vermutungen waren, dass Spreading Depression durch eine sich wellenförmig über den Kortex ausbreitende Vasodilatation verursacht wird, die durch Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks zum Stillstand der kortikalen Aktivität führt (*van Harreveld*, 1952). Später wurden zwei weitere Theorien entwickelt: *van Harreveld's* Glutamat-Hypothese und *Grafstein's* Kalium-Hypothese. *Grafstein* postulierte basierend auf einer Reihe von Experimenten, dass es initial durch starke Aktivität der

Neuronen zu einem massiven Anstieg der extrazellulären K⁺-Konzentration kommt, welche zu einer weiteren Depolarisation und Inaktivierung der Neuronen führt, aus denen K⁺ freigesetzt wurde. Gleichzeitig diffundiert ein Teil des akkumulierten K⁺ zu benachbarten Zellen und bewirkt deren Depolarisation, usw. (Grafstein, 1956). Drei Jahre später wurde die Glutamat-Hypothese durch van Harreveld aufgestellt (van Harreveld, 1959). Seine Vermutungen waren, dass Glutamat als exzitatorische Substanz zur Ausbreitung von SD einen Beitrag leistet. Diese Hypothese wird durch Studien gestützt, die zeigen konnten, dass es durch SD zu einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration kommt (van Harreveld, 1970) und dass sich SD's durch NMDA- Rezeptorantagonisten blockieren lassen (Lauritzen, 1992; Willette et al., 1994). Beide Vorstellungen sind bis heute allgemein akzeptiert, ein gemeinsames Wirken ist sehr wahrscheinlich (IHCD, 2004). Neuerdings wird ein transzellulärer Ausbreitungsmechanismus über *gap junctions* diskutiert (Nedergaard et al., 1995; Martins-Ferreira et al., 1995). Basierend auf diesen und neueren Arbeiten (Kunkler et al., 1988; Kraig 2002), entwickelte Nedergaard ein Modell, welches die Beteiligung von Kalziumwellen an der Initiation und Ausbreitung von SD beschreibt (Martins-Ferreira et al. , 2000).

Die SD ist bereits in verschiedenen Tiermodellen (u.a. Ratte, Maus, Kaninchen, Katze, Hund, Affe), in unterschiedlichen Hirnregionen (z.B. Kortex, Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus) ausgelöst worden. Im humanen Hirngewebe ist die SD *in vitro* im Hippocampus (Avoli et al., 1991) und *in vivo* im Striatum (Sramka et al., 1977) sowie im Kortex (Mayevsky et al., 1996) beobachtet worden.

Die SD wird im Tierversuch durch elektrische, chemische und mechanische Stimuli ausgelöst und kann als relativ stereotype,

pathologische Reaktion des astroglial-neuronalen Netzwerks auf unterschiedliche Noxen angesehen werden (Somjen et al., 1992). Die experimentell am häufigsten verbreitete Methode der SD-Auslösung ist die kortikale Applikation von Kaliumchlorid, wobei die Schwellenkonzentration bei subduraler Kaliumapplikation bei etwa 80 mmol/l (Bures et al., 1974; Dreier et al., 2001) liegt. Bei der intrakortikalen Injektion ist eine circa acht mal geringere Kaliumkonzentration von 10-12 mmol/l ausreichend (Nicholson et al., 1981), während bei der epiduralen Applikation eine wesentlich höhere Konzentration notwendig ist. Alternativ zur Kaliumapplikation gibt es die Möglichkeit, mit einer dünnen Nadel in die äußerste Kortexschicht zu stechen, den sogenannten *pin-prick*, als lokale Verletzung von Neuronen mit Ausfluss von K⁺ und Neurotransmittern. Diese Methode ist relativ sicher, hat jedoch den Nachteil, nicht beliebig oft wiederholbar zu sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Implantation von bipolaren Elektroden in den Kortex, die zum Auslösen von SD's bei Experimenten mit nicht-narkotisierten Tieren durchgeführt wurde (Duckrow, 1993). Weitere Möglichkeiten, eine SD auszulösen, sind die lokale Applikation exzitatorischer Aminosäuren (NM-DA) zur Aktivierung glutamaterger Rezeptoren, das Herabsetzen der interstitiellen Chloridkonzentration, das Erzeugen einer Hypoglykämie, die Hemmung der cerebralen Na⁺-K⁺-Pumpen sowie das lokale Kühlen des Kortex (Marshall, 1959; Bures et al., 1974; Hansen 1984). Es gibt einzelne Berichte über hochfrequente elektrische Stimulation kombiniert mit Verabreichungen von SD-auslösenden pharmakologischen Substanzen (Smith et al., 2006). Auslöser der SD sind Vorgänge, die die neuronal-gliale Homöostase lokal stören und zur Freisetzung von K⁺ und/oder Glutamat führen (Bures et al., 1974).

Der Anstieg der extrazellulären K⁺-Konzentration gilt seit Grafstein

(Grafstein, 1956) als ein wesentlicher Propagator der SD. Aber auch verschiedene spannungsabhängige Kalziumkanäle („voltage-gated calcium channels“, VG-CCs) sind für die Ausbreitung der SD wichtig. So kommt in Tiermodellen zu einer Verschlechterung der SD-Auslösbarkeit und Verminderung der SD-Anzahl, wenn der P/Q-Kalziumkanal genetisch verändert ist (Ayta et al., 2000) bzw. dieser Kanal spezifisch blockiert wird. Auch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren durch MK-801 beendet die Ausbreitung der Spreading Depression (Marranes et al., 1988).

1.1.2 Allgemeine Eigenschaften der SD

Die Spreading Depression gehört zu der Gruppe von selbst-organisierten erregbaren Wellen (Wellen sind räumlich und zeitlich periodische Bewegungen, bei denen Energie und Impuls, aber keine Masse von einem Ort zu einem anderen übertragen wird (Tipler, 1994)), die in einem erregbaren Medium propagieren. SD-Wellen können, wie oben bereits erwähnt wurde, durch mechanische, elektrische, chemische und thermische Stimuli produziert werden. Zwischen den Bereichen des ZNS reduziert sich die Anfälligkeit für SD in folgender Reihenfolge: Hippokampus (besonderes CA 1 Region), Neokortex, subkortikale Nuclei, graue Substanz des Hirnstamms, Zerebellum (Bures, 1984) und Rückenmark (Czeh and Somjen, 1990). SD propagiert mit einer

Geschwindigkeit von 3-5 mm/min durch die graue Substanz. SD propagierte auch, wenn Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin (TTX) blockiert wurden (Sugaya et al., 1975). Je höher ein Tier in der phylogenetischen Skala steht, desto komplexer ist der Kortex und desto schwieriger ist es eine SD zu erzeugen. So wurde z.B. in Experimenten mit Kaninchen und Ratten beobachtet, dass SD dort leichter zu erzeugen war als in Experimenten mit Katzen und Affen [(McLachlan, 1994). Man erklärt diese Eigenschaft damit, dass in diesem Fall die Menge der myelinisierten Fasern erhöht und die Dichte der neuronalen Membranen reduziert ist, weshalb der SD- Prozess blockiert werden kann (Bures et al., 1969).

1.1.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD

Die „cortical spreading depression“ (CSD) ist definiert als ein regelmäßig auftretendes neurologisches Phänomen, das durch eine transiente (60-120 s) Depolarisation der Nerven- und Gliazellen der Hirnrinde, die sich mit 3-5 mm/min über die Kortexhemisphäre ausbreitet und dabei eine Verschiebung des kortikalen Gleichspannungspotential um 20-35 mV erzeugt. Eine SD breitet sich ähnlich wie eine Wasserwelle über die Hirnoberfläche aus. Dieses Phänomen kann mit mehreren, räumlich versetzten Elektroden auf der Hirnoberfläche oder im Neokortex registriert werden (Abb.1-2).

Aufgrund der massiven Depolarisation der Zellen des Hirnparenchyms kommt es während der SD zu einer Negativierung des Gleichspannungspotentials (DC) um 5 bis 35 mV (Leão, 1944; Grafstein, 1956). Dieses kehrt sich nach 1-2 min um (Repolarisation) und geht in eine schwache, 3-5 min dauernde Positivierung über. Gelegentlich geht der Negativierung eine kleine positive Welle voran (Leão, 1947; Bures et al., 1974). Am Anfang der DC-Potentialänderung steht gewöhnlich ein Anstieg der neuronalen Aktivität (*populations spikes, burst of single unit activity*), der nur 2-3 s dauert (Grafstein, 1956), gefolgt von 1-2 min absoluter „Stille“ (Bures et al., 1974). Damit verbunden tritt eine temporäre Depression der spontanen EEG-Aktivität ein, die erst nach etwa 5-10 min vollständig wiederhergestellt wird (Leão, 1944).

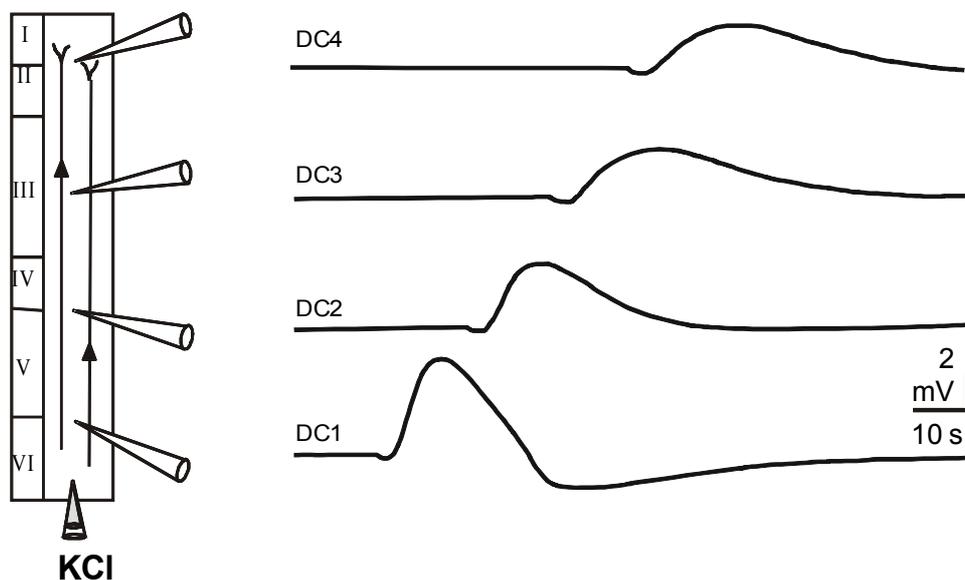


Abb. 1-2: Darstellung einer DC-Potentialwelle nach Injektion von KCl (3M) am menschlichem Neocortex. Die Anordnung der Injektions- und der Feldpotentialelektroden (DC1-DC4): wie gezeigt (Gorji et al., 2001).

1.1.4 Ionenverteilung während der SD

Während der SD-Ausbreitung sind Neuronen und Gliazellen in der Hirnrinde temporär depolarisiert. Die Depolarisation der Hirnrinde geht mit einer drastischen Veränderungen der Ionenverteilung zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum einher. Für das Auslösen der SD spielt das Kalium eine entscheidende Rolle. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zur Depolarisation von präsynaptischen Nervenendigungen, die ausreicht, spannungsabhängige Kanäle zu öffnen. Natrium-, Kalzium- und Chlorid-Ionen mit Wasser strömen in die Zelle ein, Extrazellulärraum schrumpft dabei transient um bis zu 57%. Das Ergebnis ist eine Zellschwellung. Mit einer extrazellulären kaliumselektiven Mikroelektrode kann nachgewiesen werden, dass parallel zur DC-Verschiebung, Kalium die Zellen verlässt, und Konzentrationen von bis zu 60mM/l im Extrazellulärraum erreicht (Kraig *et al.*, 1978; Grafstein, 1963; Hansen *et al.*, 1981). Der Natrium- und Kalzium-Einwärtsstrom in die Zelle führt zur Freisetzung exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter. Dabei freigesetztes Glutamat öffnet postsynaptische rezeptorgebundene Kationenkanäle an Dendriten der Nachbarzellen, wodurch Natrium- und Kalzium-Ionen einströmen, und führt somit zu einer Depolarisation der Zellmembran. Die Inhibitorischen Transmitter öffnen Anionenkanäle und verursachen dadurch einen Einwärtsstrom von Chlorid. Hierbei ist für die Wiedereinstellung des Kaliumgleichgewichts im Extrazellulärraum die Pufferkapazität der Gliazellen von großer Bedeutung (Nicholson,1981; Paulson,1987). Außerdem wird eine extrazelluläre pH-Verschiebung beobachtet. Es kommt, beginnend mit der Negativierung des DC-Potenzials, zunächst zu einer Alkalisierung des pH-Wertes um 0,3. Diese dauert etwa so lange wie die Auslenkung des DC-Potenzials an und geht dann in eine Verschiebung des pH-Wertes zu sauren Werten über, die das

Ausgangsniveau um 0,05 – 0,1 unterschreitet (Lehmenkühler *et al.*, 1981). Für die Rückbildung der Depolarisation und Wiederherstellung des Ausgangszustands sind energieabhängige Pumpmechanismen in den Zellmembranen der Neurone und Gliazellen (Na⁺/K⁺-ATPase) verantwortlich. Die SD ist somit ein energieverbrauchender Vorgang, der aber vom mit Blut versorgten gesunden Hirngewebe ohne permanente Schädigung bewältigt wird (Somjen *et al.*, 1992). Parallel zur neuronalen Depolarisation kommt es zur einer kurz anhaltenden temporären Vasodilatation in pialen und kortikalen Blutgefäßen, die einen Anstieg des regionalen Blutflusses (>100% Anstieg) bewirkt und in eine anhaltende Reduktion des kortikalen Blutflusses bis zur restitutio ad integrum nach ca. 30 min mündet. Die zerebrale Hyperperfusion erscheint elementar für die Wiederherstellung der Homöostase des Gehirns zu sein. Sofern die Hyperperfusion tierexperimentell durch lokal hohe Kalium-Konzentrationen und eine Inhibition der Stickstoffmonoxid generierenden Enzyme blockiert wird, kommt es zur Ausbildung einer kortikalen zerebralen Ischämie im Rahmen der SD (Dreier *et al.*, 1998). Diese Untersuchung unterstreicht eindeutig, dass es sich bei den zerebralen SD- assoziierten Blutflussveränderungen (Hyperperfusion) um kein unbedeutendes Phänomen, sondern um ein elementares Mechanismus zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Homöostase des Gehirns während und nach der Aura handelt. Die Messung der Änderung von Gefäßdurchmessern in der Pia mater bzw. lokaler Änderungen der zerebralen Durchblutung gaben außerdem Hinweise auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Stickstoffmonoxid, aber auch von Serotonin (Gold *et al.*, 1998) während einer SD.

Es gibt zur Zeit noch keine ausreichende Erklärung für den wandernden Mechanismus der SD. Es scheint jedoch, als ob dies mit der Diffusion von

Kaliumionen (Grafstein, 1963; Scheller, 1991; Nicholson, 1993) und Glutamat (Avoli, 1991; Gorelova, 1987; Lauritzen, 1994) im Extrazellulärraum zusammenhängt. Es ist nachgewiesen worden, dass sich die extrazelluläre Glutamatkonzentration etwa um den Faktor 20 erhöht (Scheller, 1991) und über die NMDA-Rezeptoren zur Propagation der SD beiträgt. Weiterhin gibt es Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass Kalziumwellen innerhalb von Gliazellen und Neuronen mit der SD assoziiert sind (Basarsky et al., 1998; Kunkler, 1998; Nedergaard, 1994).

1.1.5 Klinische Relevanz von SD

Die Physiologie der SD und ihre Bedeutung für die Funktion des Gehirns sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt und wird kontrovers diskutiert. Es wurde lange vermutet und besonders in den letzten 20 Jahren verdichten sich die Erkenntnisse, dass SD mit einer Reihe neurologischer Erkrankungen, solche wie der Epilepsie, der Migräne, dem Schädel-Hirn-Trauma, den zerebrovaskulären Erkrankungen, dem ischämischen Infarkt und der transienten globalen Amnesie assoziiert sind. Es bleibt jedoch nach wie vor unklar, inwieweit SD zur Pathophysiologie dieser Krankheiten beiträgt.

1.1.6 Interaktion zwischen SD und epileptiformen Entladungen

Nach den Schlaganfällen gehört Epilepsie zu den zweit- häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Browne, 2001). Die Epilepsie zeichnet sich klinisch durch das wiederholte und spontane Auftreten von Krämpfen zentralen Ursprungs (Löscher et al., 2002). Jeder Mensch kann unter entsprechenden Bedingungen einen epileptischen Anfall erleiden. Bei 5% der Gesamtbevölkerung tritt ein mal im Leben ein unprovoked epileptischer Anfall auf. Als Auslöser im jungen Erwachsenenalter kommen zahlreiche zerebrovaskuläre Erkrankungen, Tumoren oder Schädel-Hirn-Trauma oder äußere Noxen, wie Schlafentzug oder Alkoholentzug in Betracht. Zu den häufigsten Ursachen im Kindesalter beginnenden Epilepsien gehören perinatale Hirntrauma, angeborene Entwicklungsstörungen, Enzephalitis, Fieberkrämpfe, genetische und neurometabolische Schädigungen (Wolf et al., 2003).

Ein epileptischer Anfall stellt die klinische Manifestation einer abnormen und exzessiven Entladungen von Neuronenverbänden im Gehirn dar. Epileptische Anfälle können sich sehr vielfältig darstellen, die gemeinsame Merkmale sind das plötzliches Auftreten und die zeitliche Begrenzung auf Sekunden bis Minuten (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981). Die konventionellen Hypothesen zu den Mechanismen der Entstehung epileptischer Aktivität umfassen im wesentlichen zwei Ansätze: Zum einen Theorien basierend auf Veränderungen der Eigenschaften spannungsabhängiger Kanäle, zum anderen Konzepte, die eine Verschiebung des Gleichgewichtes hemmender und erregender

synaptischer Transmission postulieren (Köhling, 2007). Das Entstehen abnormer Entladungsmuster kann durch erworbene pathologische Veränderungen oder genetische Faktoren bedingt sein. Im epileptischen Anfall können neben Bewusstseinsänderungen sensorische, autonome, motorische oder psychische Symptome auftreten.

Gleichzeitiges Auftreten von SD und epileptischer Aktivität wurde in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Epilepsie-Modellen beobachtet sowohl in unterschiedlichen Tiermodellen (Van Harreveld and Stamm, 1953; Koroleva and Bures, 1983), als auch in humanen Gehirnschnitten (Avoli et al., 1991; Gorji and Speckmann, 2004). SD ist ein bekanntes Phänomen im Tiermodell der experimentellen Epilepsie. Allerdings bleibt, trotz der Untersuchungen in verschiedenen Studien, das Zusammenspiel der SD mit epileptiformen Feldpotentialen im menschlichen neuronalen Hirngewebe weiter unklar. Vermehrte hypersynchrone Entladungen können „Spreading Depression“ auslösen (Lauritzen, 1994). Ebenso kann die Ausbreitung von SD über einen epileptischen Bereich im Gehirn einen epileptischen Anfall bei einigen Patienten auslösen (Gorji et al., 2004). Man nimmt an, dass SD die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes möglicherweise durch Änderungen in der Aktivität des synaptischen Netzwerkes verstärkt (Berger et al., 2008; Wernsmann et al., 2006; Dehbandi et al., 2008).

Epileptiforme Feldpotentiale und SD können experimentell auf unterschiedliche Wege ausgelöst werden, z.B. durch:

- Aktivierung von NMDA-Rezeptoren,
- Erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration,
- Blockierung der K⁺-Kanäle; wie z.B. von 4-aminopyridine,
- Blockierung von Na⁺-K⁺-ATPase; z.B. durch Ouabain,
- Blockierung von Ca²⁺-Kanäle; z.B. durch NiCl₂,
- Verringerung der extrazellulären Mg²⁺-Konzentrationen,

-Blockierung der GABA-Rezeptoren (Gamma-aminobutyric acid); z.B. durch Picrotoxin (Balestrino *et al.*, 1999; Gorji *et al.*, 2000, 2001; Leão, 1944; Petsche *et al.*, 1973; Psarropoulou *et al.*, 1992; Traynelis *et al.*, 1988).

SD kann im empfindlichen Bereich durch eine einzelne Entladung eines epileptischen Fokus ausgelöst werden (spike triggered SD). In der Regel werden epileptiforme Feldpotentiale während der SD unterdrückt und erscheinen in wenigen Minuten wieder. Wie experimentelle Studien zeigen kann SD epileptische Entladungen nicht nur auslösen sondern auch sie blockieren (Van Harreveld and Stamm, 1953; Gorji *et al.*, 2003) jedoch kann SD wiederum durch epileptische Aktivität ausgelöst bzw. blockiert werden (Van Harreveld and Stamm, 1955; Bures *et al.*, 1974).

1.1.7 Hyperthermie induziert epileptische Entladungen und SD

Wie tierexperimentelle Studien belegen, kann Hyperthermie SD (Wu *et al.*, 2000) und epileptische Entladungen (Tancredi *et al.*, 1991; Köhling, 2008) induzieren. Die Studien zeigten, dass sowohl die epileptiforme Aktivität als auch die SD durch eine vorübergehende Körpertemperaturerhöhung induziert werden kann und dass das Alter der Tiere eine wichtige Rolle beim Auftreten dieser Phänomene spielt. Demnach wurde keine epileptische Aktivität nach der Hyperthermie in

Schnittpräparaten von Tieren junger als 4 Tage oder älter als 28 Tage beobachtet. Allgemein ist für die Auslösung der SD das Hirngewebe von juvenilen Tieren wesentlich anfälliger als das von älteren Tieren (Luhmann and Kral, 1997).

1.2 Fieberkrampf

1.2.1 Definition

Ein Fieberkrampf ist ein epileptischer Anfall, der im Kindesalter jenseits des ersten Lebensmonats, in Verbindung mit einer fieberhaften Erkrankung auftritt, die nicht durch eine ZNS-Infektion verursacht ist, ohne vorangegangene Neugeborenenkrämpfe, ohne einen vorangegangenen afebrilen Anfall und auf den die Kriterien eines anderen akuten symptomatischen Anfalls nicht zutreffen (*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, ILAE, 1985*).

Als Fieber wird in der Regel eine Körpertemperatur von mindestens 38°C angesehen. Es ist unklar, welche Bedeutung, die Höhe des Fiebers, die Geschwindigkeit des Fieberanstiegs und die Ursache des Fiebers für die Auslösung der Fieberkrämpfe haben (Millichap, 1968; Minichom, 1984). In einer Studie wurden Kinder mit Fieberkrämpfen untersucht, so hatten

75% der Kinder eine Körpertemperatur über 39°C, und 25% hatten eine Temperatur über 40°C (Langenstein, Stahnke, 1984). Veränderungen der Osmolarität und Natriumkonzentration im Blut und im Liquor scheinen bei der Entstehung von Fieberkrämpfen mitzuwirken (Rutter, 1978; Kiviranta et al., 1996).

Fieberkrämpfe sind von Epilepsien abzugrenzen, welche durch das wiederholte Auftreten afebriler Krampfanfälle gekennzeichnet sind. Die ersten epileptischen Anfälle einiger Epilepsien können sich als febrile Anfälle manifestieren (Siemes et al. 2001).

1.2.2 Pathogenese

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Fieberkrämpfe bleiben weiterhin ungeklärt. Epileptische Anfälle sind häufige neurologische Störungen im Kindesalter. Betroffen sind 3 bis 5% der überwiegend normal entwickelten Kinder zwischen dem 6. Monat und 5. Lebensjahr. (Brazier et al., 1976; French; Lennox-Buchthal, 1973). Der Manifestationsgipfel liegt im zweitem Lebensjahr (Aicardi, 1994; Nelson et al., 1976). Unkomplizierte Fieberkrämpfe ziehen ein geringes Epilepsie-Risiko von 2,5 - 4 % nach sich und führen weder zu Entwicklungsstörungen, noch zu bleibenden neurologischen Defiziten der betroffenen Kinder (Püst et al. 2000). Die häufigsten auslösenden Erkrankungen sind virale (seltener eine bakterielle Infektion) Infekte der

oberen Luftwege, Dreitagesfieber, akute Mittelohrentzündungen, Harnwegsinfekte und Fieberreaktionen nach Impfungen. Bei 31% der Kinder zwei Jahren verursacht das Human-Herpesvirus vom Typ 6 einen Fieberkrampf (Kimberlin, 1998).

Das Auftreten von Fieberkrämpfen ist per Definition mit den beiden ätiologischen Faktoren Fieber und Lebensalter verknüpft. Allerdings ist nicht bekannt, warum nicht alle Kinder von Fieberkrämpfen betroffen sind. Ebenfalls noch unbekannt sind die für einen Fieberkrampf verantwortlichen kindlichen Gehirnstrukturen. Als dritter Faktor spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle. In den Studien von Aicardi und Tsuboi wird es angenommen, dass autosomal dominante Vererbung mit reduzierter Penetranz sowie ein polygenetischer Vererbungsmodus für die Entstehung von Fieberkrämpfen relevant sind (Tsuboi, 1976; Aicardi, 1994).

Experimente an Tiermodellen zeigten, dass die altersabhängige Empfänglichkeit für Fieberkrämpfe in Beziehung zu Neurochemischen- und Neurotransmitterveränderungen in Verbindung mit genetisch determinierten Enzymdefiziten im Gehirn stehen. Daraus resultieren ionische und metabolische Veränderungen, die zur erhöhten Anfälligkeit für Krampfanfälle beitragen (Glaser, 1982).

1.2.3 Symptomatik

Der Krampfanfall tritt in der Regel Initial zu Beginn des Infektes im ersten Anstieg des Fiebers auf. Häufig ist der Krampfanfall und nicht das Fieber das erste Zeichen der Infektion. (Wolf et al., 1977).

Der Fieberkrampf kann mit einem plötzlichen Bewusstseinsverlust beginnen, gefolgt von einem Zusammenziehen der gesamten Muskulatur (tonische Versteifungen). Nach 10-30 Sekunden folgen regelmäßige (klonische) Zuckungen. Die tonische Phase kann fehlen, und es kommen auch atonische Anfälle vor, bei denen die Muskulatur ihre Spannung verliert und die Kinder vollkommen schlaff sind (Siemes et al., 2001). Gelegentlich können postkonvulsive Paresen entstehen, die sich in der Regel innerhalb weniger Stunden vollständig zurückbilden. Bleibende Paresen nach Fieberkrämpfen sind eher selten.

Gewöhnlich sind die Anfälle kurz und selbstlimitierend. In der Studie von Nelson und Ellenberg betrug die Dauer bei 72% unter 5 Minuten. 7,6% der Fieberkrämpfe hielten länger als 15 Minuten und 4,3% länger als 30 Minuten an (Nelson, Ellenberg, 1978). Die Anfälle können sich im Verlauf des Infektes mehrfach wiederholen.

1.2.4 Temporallappenepilepsie

Die Temporallappenepilepsie (TLE) repräsentiert die häufigste Form fokaler Epilepsien mit einem hohen Anteil pharmakoresistenter Patienten. Auffallendstes neuropathologisches Merkmal der TLE sind schwere neurodegenerative Veränderungen im Bereich des Hippokampus (Ammon's Horn-Sklerose) und angrenzender Hirnareale (Amygdala, entorhinaler Kortex). Untersuchungen in Tiermodellen der TLE und an Gewebe, das bei epilepsiechirurgischen Eingriffen von Patienten gewonnen wurde, haben in den letzten Jahren Erkenntnisse zur Pathophysiologie der TLE erbracht. Der epileptische Hippokampus imponiert durch eine Vielzahl neurochemischer und morphologischer Veränderungen. Als primäre Ursachen einer TLE werden vor allem das Auftreten starker frühkindlicher Fieberkrämpfe in den ersten Lebensjahren, oder eines Status epilepticus (SE) in einem späteren Alter angesehen (Harbord et al., 1987; Maher et al., 1995; Lee et al., 1981). Sekundär kommt es vermutlich zu direkter Excitotoxizität und hypoxischen Schädigungen im Bereich des Hippokampus. Das klinische Bild einer TLE, ausgelöst durch frühkindliche Fieberkrämpfe, wird meist erst während oder nach der Pubertät manifest. Der Prozess der Entstehung der Epilepsie während dieser Latenzzeit wird als Epileptogenese bezeichnet und ist heute Gegenstand intensiver Grundlagenforschung. Zusätzlich werden auch genetische Komponenten diskutiert, welche etwa die Entstehung von Fieberkrämpfen oder den Prozess der Epileptogenese fördern könnten (Ounsted et al., 1966; Nelson, 1990).

Therapieresistenten Patienten steht heute die Option einer einseitigen Resektion des epileptischen Hippokampus zur Verfügung, welche zu

einer signifikanten Besserung der Erkrankung oder Anfallsfreiheit der Patienten führt.

1.2.5 Pathologie der Ammonshornsklerose

Der Hippokampus befindet sich im Temporallappen an der medialen Wand des Seitenventrikels und ist eine zentrale Schaltstation des limbischen Systems. Der Hippokampus besteht aus dem so genannten Ammonshorn (Cornu ammonis), mit den vier zytologischen Zonen C1-C4, aus dem durch die hippokampale Fissur davon getrennten Gyrus dentatus, und aus dem Subiculum. Diese Elemente sind durch komplexe intrinsische Verbindungen miteinander verschaltet.

Der massive Neuronenverlust im Hippokampus von Patienten mit TLE ist schon vor über 100 Jahren beschrieben worden (Sommer, 1880; Bratz, 1899). Der epileptische Hippokampus imponiert durch eine Vielzahl neurochemischer und morphologischer Veränderungen. Charakteristischerweise sind immer die Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region (CA, cornu ammonis), Mooszellen und Interneurone im Hilus des Gyrus dentatus von Neurodegeneration betroffen. Die Pyramidenzellen der CA2-Region bleiben dabei relativ verschont erhalten (Margerison und Corsellis, 1966). In der Körnerzellschicht kommt es weiterhin zur Aussprossung von Moosfasern des Gyrus dentatus. Sommer bezeichnete die typische Degeneration hippokampaler

Strukturen als Ammon's Horn Sklerose (AHS). Bei 70% der operierten Patienten mit TLE konnte histologisch eine AHS nachgewiesen werden (Zentner et al., 1995). Etwa 40% der Patienten mit AHS weisen außerdem eine Dispersion des Körnerzellbandes auf (Houser et al., 1990; Lurton et al., 1997). Dieses weitet sich von ursprünglich 50 µm auf bis zu 200 µm, so dass ein Verlust der kompakten Schichtung der Körnerzellen und Verlust einer klaren Grenze zwischen Körnerzellschicht und Molekularschicht entsteht (Lurton et al., 1997). Außerhalb des Hippokampus sind oft Teile der Amygdala und des entorhinalen Kortex (insbesondere Pyramidenzellen der Schicht III) betroffen.

Der Hippokampus spielt eine wesentliche Rolle bei der Verarbeitung von Kontextinformationen (Maren, 1997) und von komplexen Informationen (Jeffrey, 1993). Die Rolle des Hippokampus ist besonders eingehend bei Nagetieren untersucht worden. Die hippokampalen Läsionen führen zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens, wobei die Ausmaß der Läsion mit dem Grad der Beeinträchtigung korreliert (Altemus, 1997). So führen teilweise oder vollständige Hippokampusläsionen, die z. B. bei einer TLE entstanden sind, zu Beeinträchtigung im Erlernen neuer Gedächtnisinhalten, während das Abrufen von Gedächtnisinhalten aus dem Langzeitspeicher weitestgehend unbeeinträchtigt bleibt (Miller et al., 1993).

1.3 Zielsetzung

Fieberkrämpfe werden schon seit einiger Zeit in Tiermodell untersucht. Dazu werden Ratten in den ersten Tagen nach der Geburt in eine sehr warme Umgebung gebracht, so dass sich ihre Körpertemperatur, ähnlich wie bei menschlichem Fieber, erhöht und ein Krampf ausgelöst wird. Die Folgen von Fieberkrämpfen wurden an Ratten schon eingehend untersucht, jedoch bleiben die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Fieberkrämpfe weiterhin ungeklärt. Darüber, warum gerade junge Ratten zu Fieberkrämpfen neigen, konnte nur spekuliert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, inwieweit ein künstlich herbeigeführtes Fieber in juvenilen Ratten zu einer Veränderung zellulärer Erregbarkeit führen kann. Im Fokus sind zwei in enger Verwandtschaft stehende Phänomene Cortical Spreading Depression und epileptische Entladungen, die in dieser Arbeit beobachtet und untersucht wurden. Der akute (sofortiger) und chronische (vier Wochen nach Fieber-Auslösung) Effekt eines Fieberkrampfes sollte in Bezug auf die Schwelle der Auslösbarkeit der SD und epileptiformer Feldpotentiale beobachtet werden. Interessant war ob eine Hyperthermie – also auch Fieber- vor allem in juvenilen Stadien zur Veränderungen zellulärer Erregbarkeit führen kann und ob die Veränderungen auch lang anhaltend auftreten, die zur Manifestation einer Temporallappenepilepsie führen.

2. Material und Methoden

2.1 Hyperthermiemodell

Alle Tierversuche wurden nach der Genehmigung der Bezirksregierung Münster durchgeführt (Schreiben vom 19.12.2002; AZ: 50.0835.1.0 (G 79/2002)).

Zur Untersuchung der Temporallappenepilepsie wurden zwei Modelltypen gebildet. Ein akutes Anfallsmodell, bei dem durch thermische Induktion ein epileptischer Anfall ausgelöst wurde. Und ein chronisches Epilepsie-Modell bei dem die Tiere durch einen primären Fieberkrampf, der ebenso thermisch ausgelöst wurde, nach einer Latenzzeit durch einen unphysiologischen Reiz neuronale Aktivitäten zeigten. Diese Tiere sind chronisch krank bzw. epileptisch geworden. Der Vorteil letzteres Epilepsiemodells ist, dass sie die Situation simulieren, die beim Menschen durch ein Fieberkrampf mit anschließender Temporallappenepilepsie gegeben ist. Diese chronischen Epilepsie-Modelle bieten die Möglichkeit, den Prozess zu untersuchen, der zur Manifestation der Epilepsie führt.

Für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit spielen sowohl akute Anfallsmodelle als auch chronische Epilepsie-Modelle eine Rolle.

Als Versuchstiere dienten junge Wistar-Ratten im Alter von 7 bis 24 Tagen und 35-52 Tagen. Das Körpergewicht der Tiere betrug im ersten Fall 10g bis 57g und 90 bis 220g im zweiten.

In vivo wurde Temperaturanstieg künstlich bei juvenilen Ratten herbeigeführt, da der akute Effekt eines Fieberkrampfes vor allem bei jungen Tieren besonders ausgeprägt ist.

Zur besseren Beurteilung der Effekte der Hyperthermie wurden Experimente unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne Hyperthermie,

durchgeführt. In der Kontrollversuchsreihe kamen alle Altersgruppen vor. Die Ratten wurden entsprechend ihres Alters in drei Gruppen unterteilt: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19) und Gruppe III (p 20-24).

Neben schon oben erwähnten Gruppen erfolgte weitere Gruppenunterteilung wie folgt : Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (48-52). Das Alter entsprach dann dem Alter des chronischen Tiermodells. An den Tiermodellen der chronischen Form erfolgten Versuche im Gegensatz zu den Tieren der akuten Form, die direkt nach dem Fieberkrampf *in vitro* untersucht wurden, erst in vier Wochen nach der Hyperthermie.

2.2 Präparationsmethode

In vivo-Experimenten wurde bei Ratten drei verschiedener Altersgruppen ein Fieberkrampf ausgelöst. Hierbei wurden Ratten durch intraperitoneale Applikation von Narcoren® (Pentobarbital; 50mg/kg KG) anästhesiert und in eine Wärmekammer gebracht. Dabei wurde die Körpertemperatur neugeborener oder sehr junger Ratten durch Anwendung von Wärmequelle in der Wärmekammer bis 41°C erhöht. Die Kammertemperatur betrug ca. 50°C. Die Körpertemperaturerhöhung konnte man mit Hilfe von einer rektalen Messelektrode erfassen. Bei den Tieren der akuten Form erfolgte unmittelbar nach der Hyperthermie das sofortige Gehirnentnahme, die von chronischer Form wurden an dem

selben Tag nach der Erholung zurück zur Amme gebracht und erst in vier Wochen zu weiteren experimentellen Untersuchungen herangezogen. Da die Tiere während der Hyperthermie viel Flüssigkeit verlieren, bekamen die Ratten während der Erholungsphase eine intraperitoneale Injektion mit Standardringerlösung. Ringer-Lösung wird bei Dehydration (Austrocknung) als Flüssigkeitsersatz bei extrazellulärem Flüssigkeitsverlust und zum Auflösen von Medikamenten (Anästhetika) verwendet.

Zusammensetzung:

Die Ringer-Standard-Infusionslösung enthält auf 1000 ml Aqua destillata:

- Natriumchlorid: 8,6 g
- Kaliumchlorid: 0,3 g
- Calciumchlorid: 0,33 g

Die *in vitro*-Experimente wurden sofort oder vier Wochen nach der Hyperthermie durchgeführt. Zur Anfertigung der *in vitro*-Präparate wurden die Versuchstiere in tiefe Narkose versetzt, das galt für die Ratten der Kontrolle und des chronischen Modells. Die Betäubung der Tiere erfolgte durch eine Inhalationsanästhesie im Exsikkator mit ca. 0,1ml Isofluran (Wirkstoff: 1-chloro-2, 2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether). Das betäubte Tier wurde dann mit Hilfe einer Guillotine decapitiert und das Gehirn zügig freipräpariert. Nach der Präparation wurde das Gehirn in eisgekühlte mit Carbogen (Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% O₂) begaste Präinkubationslösung (Lsg.1, Tab. 2-1) überführt. Auf einer eisgekühlten und mit Lösung (Lsg.1, Tab. 2-1) angefeuchteten Metallplatte wurde das Gehirn mit einem Skalpell für den Schneidevorgang getrimmt. Dazu wurde von dem mit der ventralen Seite

nach unten liegenden Gehirn jeweils mit einem senkrechten Schnitt das Vorderhirn und das Kleinhirn abgetrennt. Mit der kaudalen Hirnfläche nach unten wurde das Präparat mit Sekundenkleber (Loctite 454) auf einen Metallblock festgeklebt. Mit einem Vibratom (Integraslice 7550 PSDS der Fa. Campden) wurden 500 µm dicke koronale Hirnschnitte hergestellt und in ein Präinkubationsbad mit einer 28°C warmen und mit Carbogen begasten Lösung (Lsg.1, Tab.2-1) übertragen. Zur Erholung nach der Präparation bleiben die Schnitte mindestens eine Stunde im Bad. Nach 30 Minuten wurde die Calciumkonzentration der Lösung, durch die Zugabe von 0.8 ml Calciumchloridlösung, von 1 auf 2 mmol/l erhöht.

Die vorliegenden Versuche wurden an horizontalen Kombinationsschnitten der Ratte durchgeführt. Diese Schnitte enthielten die Strukturen des Hippokampus, der Amygdala, der sensorischen temporalen Neocortex und entorhinalen Neocortex.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Interface-Messkammer

Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Interfacebedingungen. Um den Hirnschnitt während des gesamten Versuches am Leben zu halten und eine stabile Umgebung für die Messungen zu schaffen, wurde eine spezielle Perfusionskammer entwickelt, die sog. Interfacekammer.

Die Interface-Meßkammer bestand aus Acrylglas und setzte sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen: Heiz- und Begasungskammer (unterer Teil) und Schnittträger (oberer Teil). Die Kammer enthielt im unteren Teil destilliertes Wasser, das über eine Heizspirale unten erwärmt wurde. In das erwärmte Wasserbad wurde über einen mehrfach perforierten Polyacrylschlauch Carbogengas eingeleitet. Über dem Wasserbad stellte sich so eine mit Wasserdampf und Carbogengas gesättigte Phase ein, die über vorderen Belüftungsschlitz mit den oberen Perfusionskammer in Verbindung stand. Die Temperatur der Badlösung wurde durchgehend unter Kontrolle eines Temperaturfühlers gemessen und auf 30,4°C eingestellt. Die untere Schnittfläche wurde in den Kammern auf mehreren Lagen KODAK-Linsenpapier gelagert, die eine große Diffusionsoberfläche für die zwischen den Fasern entlang laufende Lösung bildete, und kontinuierlich mit Lösung in einer Fließgeschwindigkeit der Badlösung von 2 ml/min umspült, das entsprach der Einstellung Speed 13 der Ismatec Rollerpumpe. Der pH-Wert wurde in regelmäßigen Abständen in der Kammer gemessen und durch Regulierung des Carbogen-Volumenstroms im Bereich von 7,35 – 7,45 gehalten. Die Versuchslösung gelang über Silikonschläuche aus dem Vorratsgefäß durch die Heizkammer in die obere Versuchseinheit. Hierbei wurden die Schnitte in den Perfusionskammern an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase des Nährmediums platziert. Die flüssige Phase bestand aus Yamamoto II-Lösung (Lsg. 2, Tab. 2-1), somit konnte erreicht werden, dass die Schnitte in den Perfusionskammern kontinuierlich mit einer künstlichen Nährlösung versorgt wurden, die in ihrer Zusammensetzung mit dem Hirn-Liquor der Ratte weitestgehend übereinstimmte. Sollte eine Testsubstanz eingewaschen werden, wurde der zuführende Schlauch in ein anderes Glas mit der in einer gewünschten Konzentration gelösten Substanz umgehängt. Während der Messungen wurden die Schnitte mit einer Plastikplatte abdeckt, um

die Gasphase über der oberen Schnittfläche gesättigt zu halten und ein Austrocknen der Schnittoberfläche zu verhindern. Extrazellulärelektroden, die ein Ableiten von extrazellulären Feldpotentialen ermöglichen, wurde unter mikroskopischer Sichtkontrolle im Schnitt positioniert.

2.3.2 Extrazelluläre Signalleitung

Für die Feld- und DC-Potentialaufzeichnung wurden Mikroelektroden verwendet, die aus Borosilikatglaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5mm und einem Innendurchmesser von 0,87mm mit Hilfe eines Elektrodenziehgeräts (DMZ-Universal-Puller, Fa. Zeitz-Instrumente) unter starkem Erwärmen zu einer Spitze von etwa 0,2µm ausgezogen wurden. Vor Versuchsbeginn wurde die Glaselektrode mittels einer Spritze blasenfrei mit Inkubationslösung (Lsg. 2, Tab. 2-1) gefüllt und war über eine KCl-Brücke, die mit 2mmol/l KCl gefüllt wurde und einen Ag/AgCl-Draht besaß, mit einem konventionellen Feldpotentialverstärker verbunden.

Unter mikroskopische Kontrolle wurde jede zu verwendende Glaselektrode mit einer Pinzette manuell so weit zurück gebrochen, dass der Elektrodenwiderstand etwa 0,5 bis 2 MΩ betrug. Anschließend wurden Messelektroden durch einen Miro-Manipulator in gute Position zum Hirnschnitt gebracht und unter mikroskopische Sichtkontrolle in die entsprechenden Regionen platziert.

Als Referenzelektrode diente ein in die Kammer eingebautes mit 2 mmol/l KCl gefülltes Glasröhrchen, das durch ein Magnesia-Diafragma Kontakt zur Badlösung hatte. Die Erdung des Bades erfolgte über ein in das Röhrchen eingeführter Silberdraht. Mittels eines Feldpotentialverstärkes wurden DC-Registrierungen (Gleichspannungs-Registrierung) mit einer Grenzfrequenz von 1000 Hz durchgeführt. Die Feldpotenziale wurden oszilloskopisch aufgezeichnet.

Die Ableitung der extrazellulären Feldpotentiale erfolgte aus vier Hirnregionen:

1. Temporalcortex Schicht 3
2. Entorhinalcortex Schicht 3
3. Laterale Amygdala
4. Hippocampus Stratum radiatum der CA1-Region

2.4 Versuchsprotokolle

Es wurden zwei Methoden verwendet um SD und epileptische Entladungen auszulösen und in drei verschiedenen experimentellen Versuchsreihen durchgeführt.

2.4.1 Methode 1

In Experimenten wurde das Niedrig NaCl- Modell (hypoosmotisches Medium) benutzt. Um die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes zu steigern wurde 50% NaCl in ACSF-Lösung reduziert (Lsg. 3, Tab.2-2) während andere Bedingungen unverändert blieben (Chebabo et al., 1995). In dieser Periode wurden die Gewebeschnitte 60 min mit der Lösung überspült. Es sollte geprüft werden, ob die Reduktion von NaCl in der Kontrolllösung (ACSF) für sich eine Wirkung auf die Induktion von SD und epileptiforme Aktivitäten hatte und in welchem Alter die Epilepsiebereitschaft am größten war.

2.4.2 Methode 2

Induktion der SD wurde durch eine extrazelluläre Tropfenapplikation einer 2 mmol/l KCl-Lösung aus einer Injektionsnadel lateral von der die DC-Potentialänderung aufzeichnenden Messelektroden vorgenommen und führte zur reproduzierbaren Auslösung einer typischen Spreading Depression. Die Negativierung des DC-Potential erfolgte abrupt und ohne Latenzzeit. Die daraufhin ausgelöste SD und epileptiforme Aktivitäten wurde in Bezug auf Wiederholungsraten, Dauer und Amplitude ausgewertet. Hirnschnitte, die in der ersten Kontrollperiode (15 minütige Superfusion mit ACSF) spontane epileptische Aktivität bzw. spontane SD zeigten, wurden von der weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

2.4.3 Versuchsreihe 1 (ohne Hyperthermie)

Zur besseren Beurteilung der Effekte der Hyperthermie wurden in der ersten Versuchsreihe die Experimente unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne Hyperthermie, durchgeführt. Die Versuchsreihe bestand aus drei Perioden: Vorlaufphase, in der Hirnpräparate 15 min. in der Versuchskammer mit ACSF-Lösung (Lsg. 2, Tab. 2-1) superfundiert wurden, um die spontane neuronale Aktivität auszuschließen.

In der zweiten Periode wurde ACSF-Lösung durch Niedrig NaCl-Lösung (Lsg. 3, Tab. 2-1) ausgetauscht. Während des anschließenden 60 min. dauernden Beobachtungszeitraumes wurden reizinduzierte schnelle extrazelluläre Feldpotentiale sowie die spontanen Feldpotentiale kontinuierlich aufgezeichnet.

Die dritte Periode diente als Erholungsphase wieder zur Kontrolle der spontan auftretenden neuronalen Aktivitäten. In der 15 -minütigen letzten Phase wurde die hypoosmotische Lösung aus dem Hirnschnitt durch ACSF ausgewaschen und auf spontane neuronale Ereignisse untersucht.

2.4.4 Versuchsreihe 2

In der zweiten Versuchsreihe wurden Experimente *in vitro* erst unmittelbar nach Erzeugung einer Hyperthermie bzw. 4 Wochen später durchgeführt. Sie gliederte sich wie oben beschriebene Kontrollversuchsreihe in drei Perioden. Nach einer 15 -minütigen Vorlaufphase (Lsg. 2, Tab. 2-1) wurden durch das Umstellen der Badlösung durch Niedrig NaCl-Lösung

für weitere 60 min. unphysiologische Bedingungen geschaffen, die zur Auslösung von SD und epileptiforme Aktivitäten führten.

Darauf folgte eine Auswaschphase, in der die Schnitte mit ACSF (Lsg.2, Tab. 2-1) 15 min. superfundiert wurden.

2.4.5 Versuchsreihe 3

Die dritte Versuchsreihe bestand aus zwei Perioden. Die experimentellen Untersuchungen wurden sofort oder vier Wochen nach der Hyperthermie durchgeführt. Wie bei den anderen Versuchsreihen wurden Schnittpräparate nach vorausgehender 15 -minütiger Kontrollphase mit ACSF (Lsg. 2, Tab. 2-1) perfundiert und wenn keine spontane Ereignisse aufgetreten waren, wurde zur nun folgenden Auslösung der Spreading Depression Tropfenapplikation angewandt. Dabei wurde ein kleines Tropfen der KCl-Lösung aus der Injektionspritze peripher am Neocortex angebrachten Messelektroden direkt auf die Hirnschnittoberfläche appliziert. Bei den Versuchen dieser Reihe wurde stets darauf geachtet, dass die Schnitte so positioniert waren, dass die lokale KCl-Applikation gegen die Flussrichtung der Badlösung erfolgte. Darauf folgten 60 Minuten Erholungsphase unter Kontrollbedingung (ACSF).

	Name	NaCl (mmol/l)	KCl (mmol/l)	NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	MgSO ₄ (mmol/l)	NaHCO ₃ (mmol/l)	CaCl ₂ (mmol/l)	Glucose (mmol/l)
1	Präinkubations- Lösung (Y I)	124	4	1,24	1,3	26	1	10
2	Inkubations- Lösung (Y II)	124	4	1,24	1,3	26	2	10
3	Badlösung (Low NaCl)	62	4	1,24	1,3	26	2	10

Tab. 2-1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen (Y I: Yamamoto I; Y II: Yamamoto II, Yamamoto, 1972; Niedrig- NaCl-Lösung).

2.5 Auswertung

Alle Signale wurden unter Zuhilfenahme eines Personalcomputers bei Verwendung eines Datenerfassungsprogramm AxoScope registriert und aufgezeichnet (Version 10.1, Axon Instruments). Die aufgenommenen Feldpotentialantworten wurden einzeln mittels Cursors (AxoScope) vermessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines Computerprogramm Sigma Plot 8.0. Die statistische Angaben werden in der Form: Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben.

Für die Auswertung wurden nur die Versuche genommen, die keine spontane neuronale Aktivität in 15 min. der Vorlaufphase zeigten.

Die SD wurde auf folgende Parametern untersucht:

- 1. Latenz:** Die Zeit vom Beginn der Einwaschphase mit Low NaCl-Lösung bis zum ersten Auftreten einer SD in der zweiten Periode.
- 2. Frequenz:** Die Anzahl der SD während der Einwaschphase.
- 3. Amplitude:** Elektrophysiologische Messungen wurden nur in Hirnschnitten ausgeführt, deren Feldpotentialantwort, die durch Low NaCl- bzw. KCl-Lösung ausgelöst wurden, mindestens 5 mV betrug, das bedeutet ein Betrag der Differenz von positivster und negativster Potentialspitze P1 und P2 („peak-to peak“).
- 4. Dauer:** Der Zeitraum, über dem sich der DC-Fluktuation erstreckte. Zur Bestimmung der Dauer der SD-Welle wurde Anfang und Ende der DC-Potentialnegativierung gemessen.

Die epileptischen Entladungen in den Schnitten wurden nach folgenden Auswertungskriterien ebenso charakterisiert:

- 1. Latenz:** Die Zeit vom Beginn der Einwaschphase mit Low NaCl-Lösung bis zum ersten Auftreten epileptischer Aktivität.
- 2. Frequenz:** Die Anzahl der EFP, die durch Lösungen induziert wurden, in 5 minutenlangen Abständen.
- 3. Amplitude:** Peak1 to Peak2 -Abstand (Spitze-Spitze-Abstand) als Maxima der Kurve in positiver und negativer Richtung. Zur Auswertung wurden nur die epileptische Aktivität genommen, deren Amplitude mindestens 0,2 mV betrug.
- 4. Dauer:** Der Zeitraum, über dem sich eine epileptiforme Aktivität erstreckte. Die EFP wurde zwischen Anfang (t1) und Ende (t2) einer EFP pro 5 min der zweiten Periode ausgemessen.

Eine Übersicht der analysierten Parametern gibt Abb. 2-1 und 2-2.

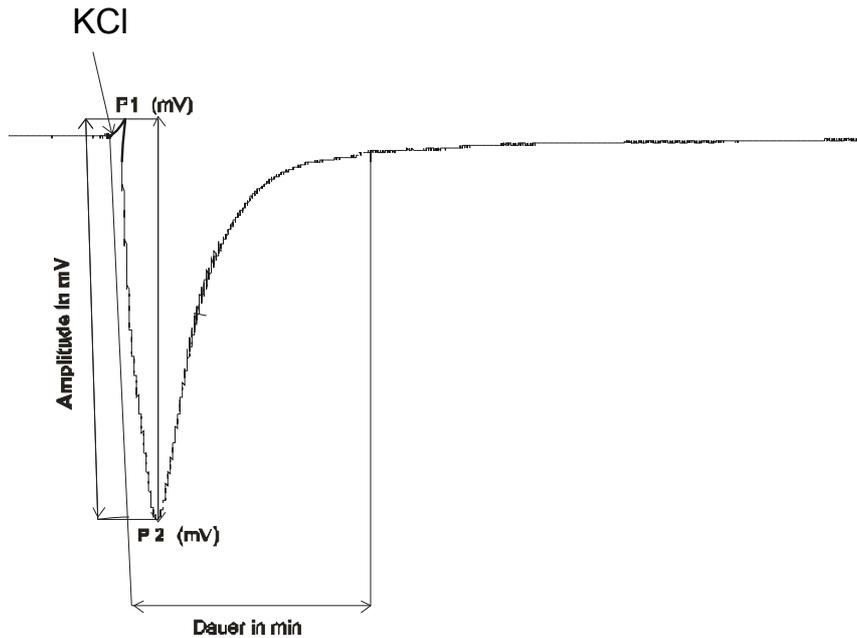


Abb. 2-1: Typischer Verlauf einer KCl-induzierten SD. Nach 1 bis 2 s erfolgte der abrupte Beginn der DC-Potentialnegativierung einer SD. Die Pfeile zeigen auf die analysierten SD-Parameter: Amplitude zwischen maximal positiven Peak1 und maximal negativen Peak2 (als Spitze-Spitze-Abstand der Kurve) in mV und Dauer der DC-Fluktuation in Minuten.

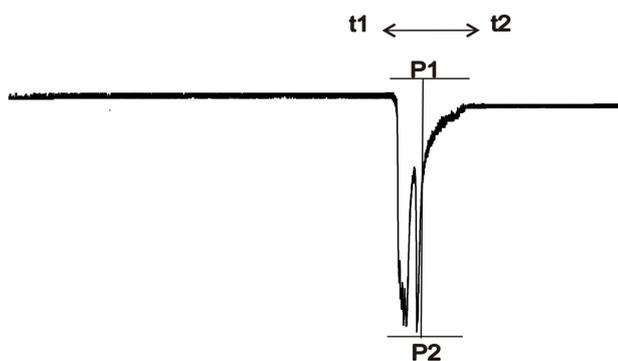


Abb. 2-2: Beispiel für epileptische Entladungen. Ableitung aus der CA1 Region hippocampaler Gewebeschnitten zeigte, dass sich kurz nach Induktion von Low NaCl-Lösung epileptische Entladungen ausbilden. Die Pfeile weisen auf die analysierten EFP-Parameter: Amplitude zwischen Peak1 und Peak2 (maximaler Abstand) in mV und Dauer zwischen t1 und t2 einer epileptischen Entladung in Sekunden.

3. Ergebnisse

Im nachfolgenden Kapitel werden Ergebnisse aller ausgewerteten Versuche dargestellt. Es galt zu untersuchen in welcher Weise Einfluss des akuten und chronischen (vier Wochen nach Fieber- Auslösung) Effekts eines Fieberkrampfes in Bezug auf die Schwere der Auslösbarkeit der SD und epileptiformen Feldpotentiale im Hippokampus, Cortex und in der Amygdala nimmt. Die vier Hirnareale: Hippokampus, Amygdala, Temporal und Entorhinalcortex sind zusammengefasst, um einen Gesamteindruck graphisch darstellen zu können. Die Ergebnisse der Registrierungen wurden nach den Altersgruppen untersucht.

3.1 Kontrollversuche

Zur besseren Beurteilung der Effekte der Hyperthermie wurden in der ersten Versuchsreihe die Experimente unter Kontrollbedingungen an den gesunden Wistar-Ratten, das heißt ohne herbeigeführte Hyperthermie, durchgeführt. Es erfolgte parallele Aufnahme von der DC-Negativierung in allen vier zu untersuchenden Regionen. Um die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes zu steigern wurde NaCl auf 50% in ACSF-Lösung reduziert.

Insgesamt konnte in 46 Präparaten von 61 epileptische Aktivität durch Reduzierung der NaCl in ACSF induziert werden. Bei den 20 Schnitten wurde gleichzeitig SD und EFP registriert, bei 7 lediglich nur SD und bei 9

ausschließlich EFP. In 63,6% -Schnitten der Gruppe I wurde 29 SD beobachtet ($4,5 \pm 0,7$ pro 1 Schnitt). Bei den 75% Präparaten wurde in der Gruppe II das Auftreten von SD registriert, dabei lag die mittlere Anzahl von SD ($n = 43$) pro 1 Schnitt bei $5,7 \pm 1,1$. In der Gruppe III ergaben sich 52 SD ($5,9 \pm 0,2$ SD pro 1 Schnitt) aus 80% Hirnschnitten. Bei den Ratten der Gruppe Ic wurden in 77,7% Gewebepräparaten 27 SD ($4,5 \pm 1,0$ pro 1 Schnitt) beobachtet. In 40% Präparaten der Gruppe IIc stellten wir insgesamt 14 SD ($4,3 \pm 0,8$ pro 1 Schnitt) fest und in der IIIc war die Anzahl der SD insgesamt 4 ($3,5 \pm 0,5$ pro Schnitt) in 22,2% Schnitten. Demnach nahm die Bereitschaft zum Auslösen von epileptiformer Aktivität mit dem Alter ab (Abb. 3-10).

Bei den ausgewerteten SD-Wellen veränderten sich die Amplituden in der Gruppe III signifikant ($P = 0,02$) im Vergleich zur Gruppe I (Abb.3-9). Die Latenz bis zum erscheinen der ersten SD war in der Gruppe Ic gegenüber der IIc und IIIc signifikant niedriger ($P = 0,022$).

Der Vergleich der EFP- Ergebnisse in allen Gruppen zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der mittleren Frequenz. Die mittlere Frequenz pro 5 min war in der Gruppe II höher ($P = 0,001$) als in der Gruppe I. Signifikanter Unterschied war für die Dauer der EFP bei der Gruppe 3 ($P = 0,002$) festzustellen (Abb. 3-3). Der signifikante Unterschied der mittleren Frequenz wurde ebenso in der Gruppe IIc und IIIc festgestellt. Die Frequenz lag deutlich höher ($P < 0,001$) als in der Gruppe Ic. Die Dauer der EFP zeigte in der Gruppe IIc die höchsten Werte ($P < 0,001$) zwischen den 3 Gruppen (Abb. 3-4).

Bei dem Vergleich CTRL- und CTRLc-Gruppen mit einander ergab sich eine signifikante Verkürzung der SD-Dauer ($P = 0,001$), demnach war die Dauer in der II und III Gruppe länger als in der IIc und IIIc (Abb. 3-9).

Tab. 3-1 – 3-2 zeigen alle gemessenen SD- und EFP-Parameter von allen Altersgruppen dieses Versuches kompakt.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	7	9	8	7	4	2
SD-Anzahl pro Gruppe	29	43	52	27	14	4
SD-Amplitude in mV	12,7 ± 0,7	15,8 ± 0,6	16,4 ± 1,0	17,8 ± 0,8	17,4 ± 2,1	15,8 ± 3,0
SD-Dauer in min	3,6 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,4
SD-Beginn in min	5,1 ± 0,4	8,6 ± 0,4	9,7 ± 0,4	18,3 ± 0,7	19,3 ± 2,1	20,2 ± 0,2

Tab. 3-1: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der Kontrollversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (48-52).

Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, SD-Anzahl pro Gruppe, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	6	9	10	7	3	2
EFP-Frequenz pro 5 min	12,1 ± 2,3	40,5 ± 5,8	39,9 ± 4,7	71,9 ± 12,1	48,9 ± 4,4	48,5 ± 6,8
EFP-Latenz in min	7,3 ± 0,9	7,6 ± 0,6	8,9 ± 2,6	11,2 ± 2,6	12,2 ± 3,2	10,2 ± 2,9
EFP-Amplitude in mV	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,02
EFP-Dauer in sec	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1

Tab. 3-2: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der Kontrollversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (48-52) Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden.

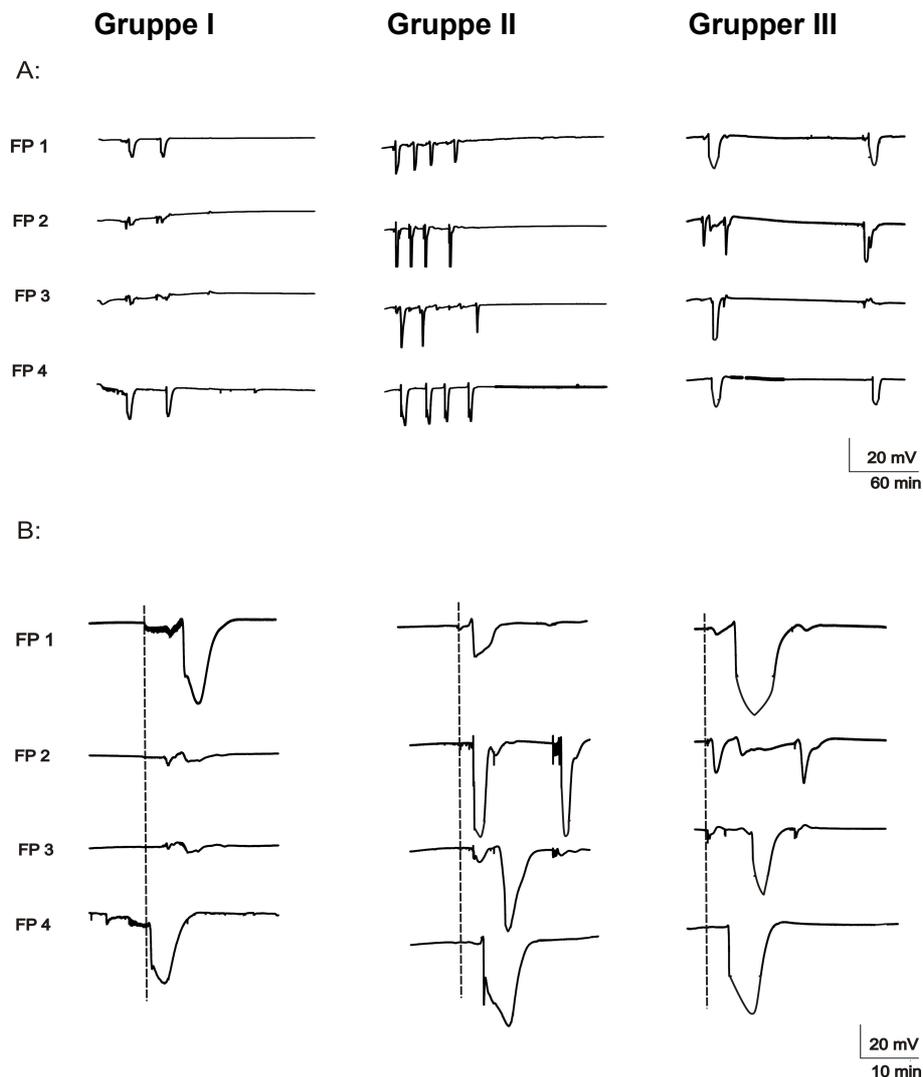


Abb. 3-1: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte (Kontrollversuch).

A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen:

Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala,

FP 4 = Temporalcortex.

B: Die Propagation von SD ist am unterschiedlichen Beginn der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier SD-Anfangspunkten. Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe :

Gruppe I : Entorhinalcortex->Temporalcortex (n = 3)

Gruppe II : Entorhinalcortex->Hippocampus->Amygdala->Temporalcortex (n = 3)

Gruppe III : Amygdala->Hippocampus-> Entorhinalcortex->Temporalcortex (n = 3)

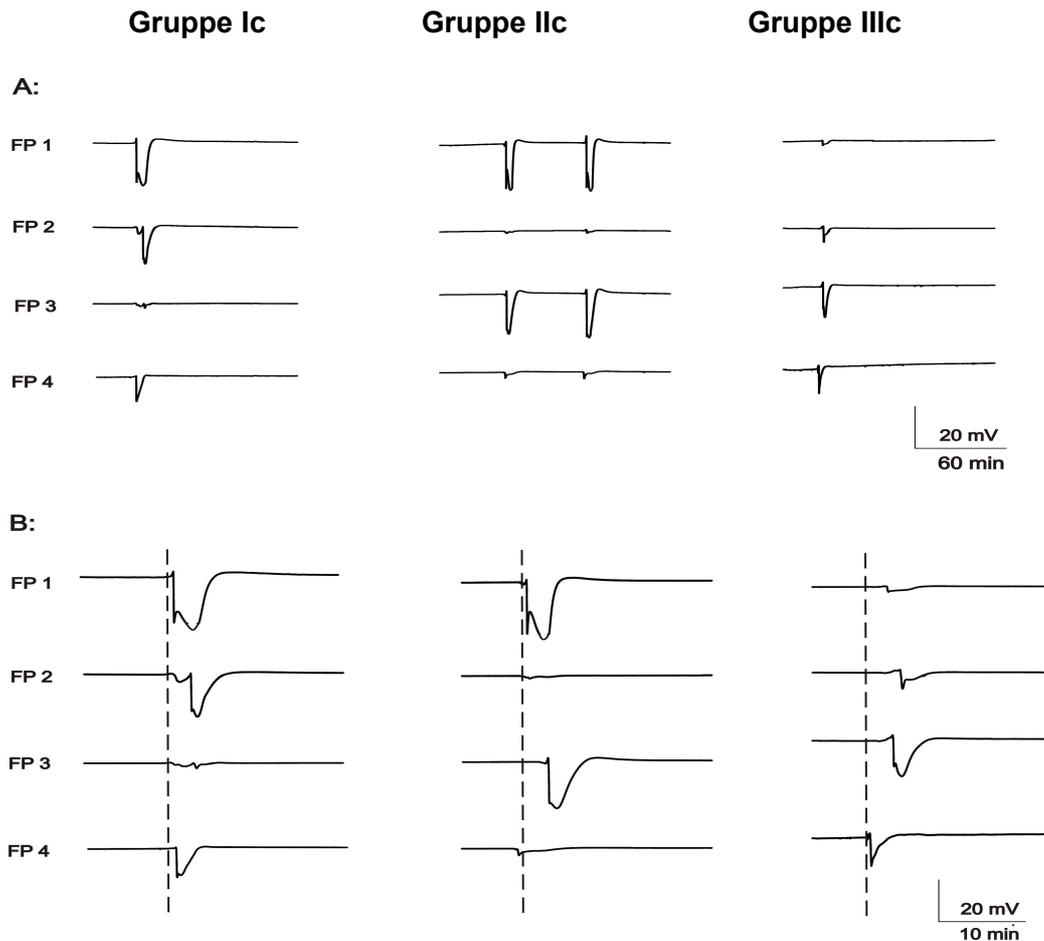


Abb. 3-2: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte (Kontrollversuch). A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Kontroll-Gruppen: Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52). FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex.

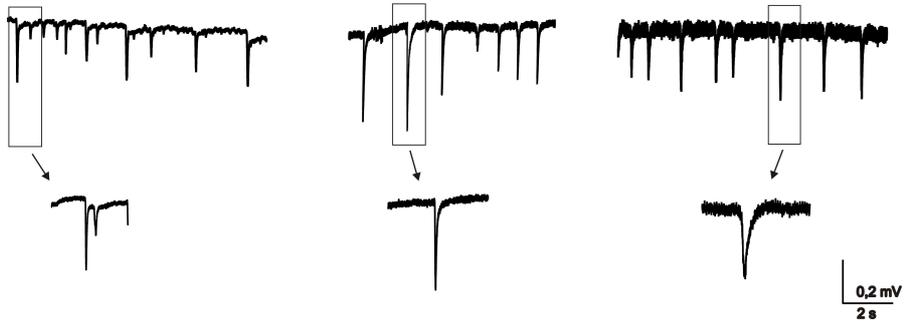
B: Die Propagation von SD ist am unterschiedlichen Beginn der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier SD-Anfangspunkten. Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe
 Gruppe Ic : Entorhinalcortex-> Hippocampus->Temporalcortex(n = 3)
 Gruppe IIc : Entorhinalcortex->Amygdala (n = 2)
 Gruppe IIIc: Temporalcortex->Amygdala->Hippocampus (n = 2)

Gruppe I

Gruppe II

Gruppe III

A:



B:

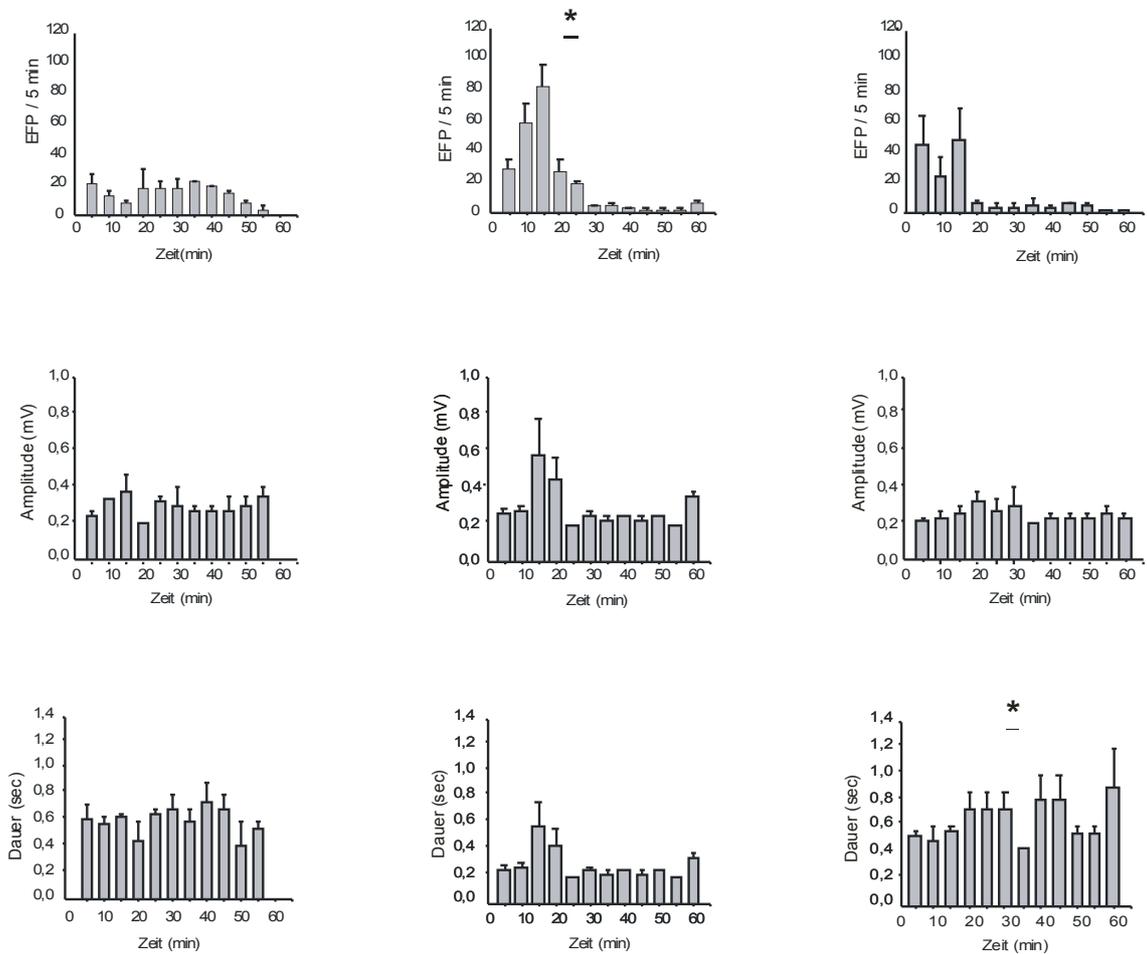


Abb. 3-3: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-3: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten der Kontroll-Gruppen I-III (CTRL, ohne Hyperthermiebehandlung):

Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in Sekunden in 5-minütigen Zeitintervallen.

Die mittlere Frequenz war in der Gruppe II ($P = 0,001$) signifikant höher als in der Gruppe I. Für die Dauer der EFP in der Gruppe III ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P = 0,002$) im Vergleich zur Gruppe II.

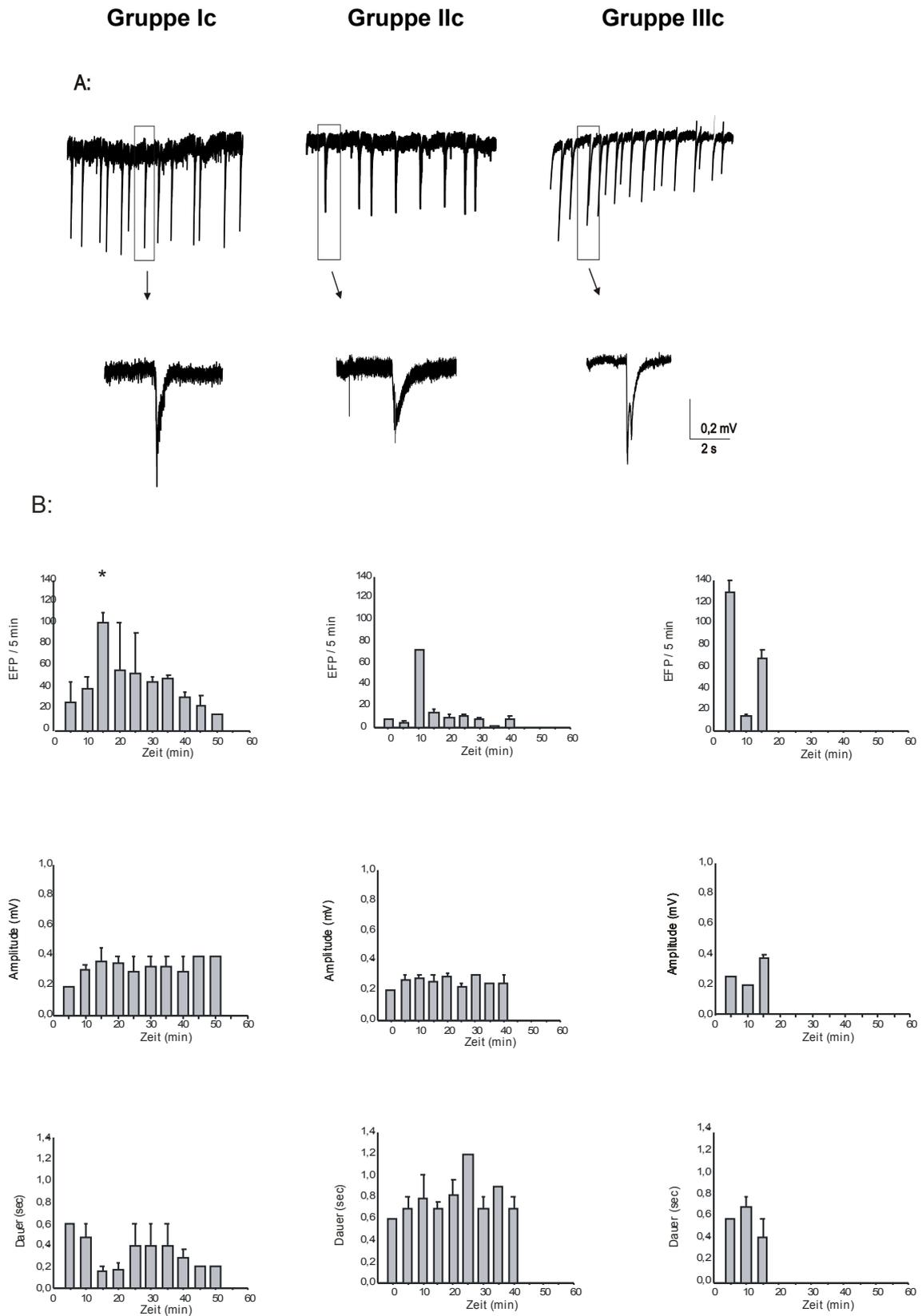


Abb. 3-4: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-4: Wirkung von Niedrig NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten der Kontroll-Gruppen Ic-IIIc (CTRLc, ohne Hyperthermiebehandlung, entsprechen dem Alter von Ratten der chronischen Hyperthermie):

Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in Sekunden pro 5 Minuten.

Die mittlere Frequenz war in der Gruppe Ic ($P < 0,001$) signifikant höher als in der Gruppe IIc und IIIc.

3.2. Wirkung der akuten und chronischen Hyperthermie auf die Erregbarkeit des Hirngewebes von juvenilen Ratten

In Vitro-Experimenten wurden zwei Modelltypen verwendet. Ein akutes Anfallsmodell, bei dem durch thermische Induktion ein epileptischer Anfall ausgelöst wurde. Und ein chronisches Epilepsie-Modell, bei dem die Tiere durch einen primären Fieberkrampf, der eben so thermisch ausgelöst wurde, nach einer Latenzzeit (vier Wochen) durch einen unphysiologischen Reiz hypersensible neuronale Aktivitäten zeigten, in Form von SD und epileptischen Entladungen.

3.2.1 Auslösung der SD und EFP durch Superfusion von reduziertem NaCl (50%) in ACSF-Lösung

Als pathologischer Reiz diente in diesem Versuch, wie auch bei den Kontrollversuchen, die niedrigdosierte NaCl-ACSF-Lösung.

Insgesamt konnte in 47 Präparaten von 63 epileptische Aktivität durch Reduzierung der NaCl in ACSF induziert werden. Bei den 24 Schnitten wurde gleichzeitig SD und EFP registriert, bei 6 lediglich nur SD und bei 17 ausschließlich EFP.

In 21,6% -Schnitten der Gruppe I wurde 10 SD beobachtet ($3,0 \pm 0,6$ pro 1 Schnitt). Bei den 19,9% Präparaten wurde in der Gruppe II das Auftreten von SD registriert, dabei lag die mittlere Anzahl von SD ($n = 19$) pro 1 Schnitt bei $4,0 \pm 1,5$. In der Gruppe III ergaben sich 19 SD ($5,6 \pm$

1,2 SD pro 1 Schnitt) aus 40% Hirnschnitten. Insgesamt nahm die Sensibilität zum Auslösen der neuronalen Aktivitäten nach dem akuten Fieberkrampf im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen ab, wobei die älteren Ratten eine höhere Sensibilität gegen sehr jungen Ratten zeigten (Abb. 3-10).

Bei den Ratten der Gruppe Ic wurden in 27,3% Gewebepräparaten 14 SD ($3,6 \pm 0,7$ pro 1 Schnitt) beobachtet. In 63,6% Präparaten der Gruppe IIc stellten wir insgesamt 21 SD ($3,6 \pm 0,4$ pro 1 Schnitt) fest und in der IIIc die Anzahl der SD war insgesamt 34 ($5,5 \pm 0,6$ pro Schnitt) in 100 % Schnitten. Verglichen der IIIc mit der Kontrollgruppen III (22,2%) dieses Alters war die Bereitschaft epileptiforme Aktivität auszulösen um 4,5 mal höher (Abb. 3-10).

Es besteht einen signifikanten Unterschied für die Frequenz von EFP der akuten und chronischen Hyperthermie-Gruppen: die mittlere Frequenz der Gruppe III lag deutlich höher ($P < 0,001$) als bei der Gruppe I und II der akuthyperthermierten Tieren und die Frequenz der Gruppe IIIc lag deutlich höher ($P = 0,001$) als bei der Gruppe Ic der vier Wochen nach dem Fieber Ratten. Die Dauer der epileptiformen Aktivität zeigte eben so den statistisch signifikanten Unterschied. Demnach hat die Dauer in der Gruppe II die höchsten Werte ($P = 0,002$) zwischen allen Gruppen des akuten Hyperthermiemodells (Abb. 3-7 - 3-8).

Bei der Auswertung von SD-Parameter waren signifikante Unterschiede für die mittlere Amplitude und Dauer in der chronischen Form der Hyperthermie auszumachen. Die SD von der Gruppe IIIc zeigte eine Amplitude, die deutlich niedriger war ($P = 0,003$) als in restlichen Gruppen. Die Dauer der SD in der Gruppe IIIc war länger ($P = 0,02$) im Vergleich zu der Gruppe Ic (Abb. 3-9). Die Latenz bis zum erscheinen der ersten SD war in der Gruppe III ($6,1 \pm 0,7$ min) gegenüber der Gruppe I ($9,1 \pm 1,2$ min) signifikant erniedrigt ($P = 0,002$) und vier Wochen nach der Hyperthermiebehandlung fand sich die Latenz bis zum erscheinen

der ersten SD in der Gruppe Ic gegenüber der Gruppe Ilc und IIIc signifikant höher ($P = 0,022$).

Tab. 3-3 – 3-4 zeigen alle gemessenen SD- und EFP-Parameter von allen Altersgruppen dieses Versuches kompakt.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	4	3	4	4	7	9
SD-Anzahl pro Gruppe	10	16	19	14	21	34
SD-Amplitude in mV	14,0 ± 2,1	15,1 ± 1,8	17,3 ± 1,2	18,1 ± 2,0	17,4 ± 1,2	13,7 ± 1,0
SD-Dauer in min	3,6 ± 0,6	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,4	3,6 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,2 ± 0,4
SD-Beginn in min	9,1 ± 1,2	6,8 ± 0,9	6,1 ± 0,7	19,1 ± 2,5	14,0 ± 1,8	12,5 ± 0,8

Tab. 3-3: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe Ilc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52). Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, SD-Anzahl pro Gruppe, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	5	4	4	4	5	9
EFP-Frequenz pro 5 min	9,3 ± 1,8	9,9 ± 3,5	26,5 ± 5,5	25,4 ± 7,4	61,6 ± 6,5	76,8 ± 6,7
EFP-Latenz in min	9,2 ± 1,5	7,2 ± 1,6	5,4 ± 0,9	10,1 ± 5,8	6,7 ± 2,4	5,8 ± 1,2
EFP-Amplitude in mV	0,45±0,07	0,35±0,03	0,4 ± 0,02	0,45±0,08	0,45±0,03	0,4 ± 0,09
EFP-Dauer in sec	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,45 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,4

Tab. 3-4: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52). Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden.

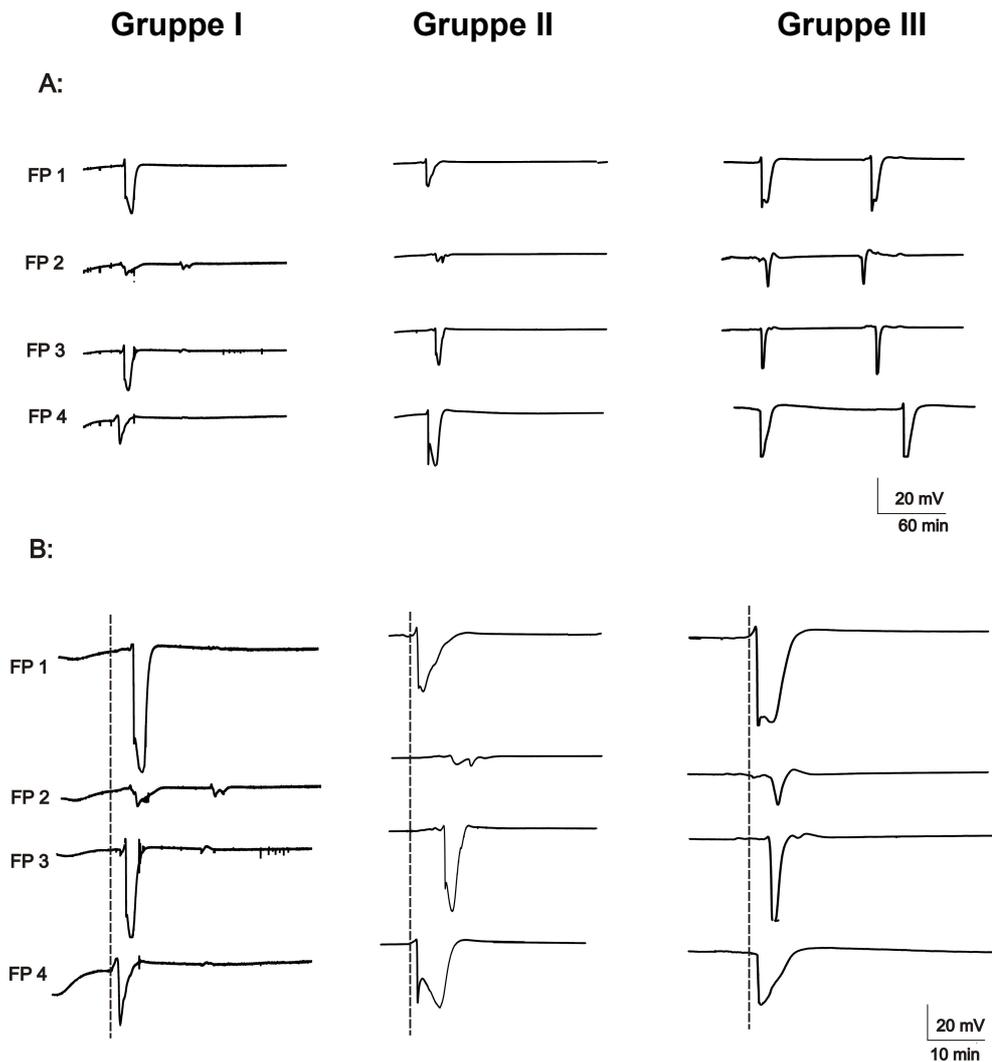


Abb. 3-5: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der akuten Hyperthermie.

A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex.

B: Die Propagation von SD ist am unterschiedlichen Beginn der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier SD-Anfangspunkten. Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe :

Gruppe I : Temporalcortex->Amygdala->Entorhinalcortex(n = 2)

Gruppe II : Entorhinalcortex-> Temporalcortex->Amygdala(n = 2)

Gruppe III : Entorhinalcortex-> Temporalcortex->Amygdal->Hippocampus(n = 2)

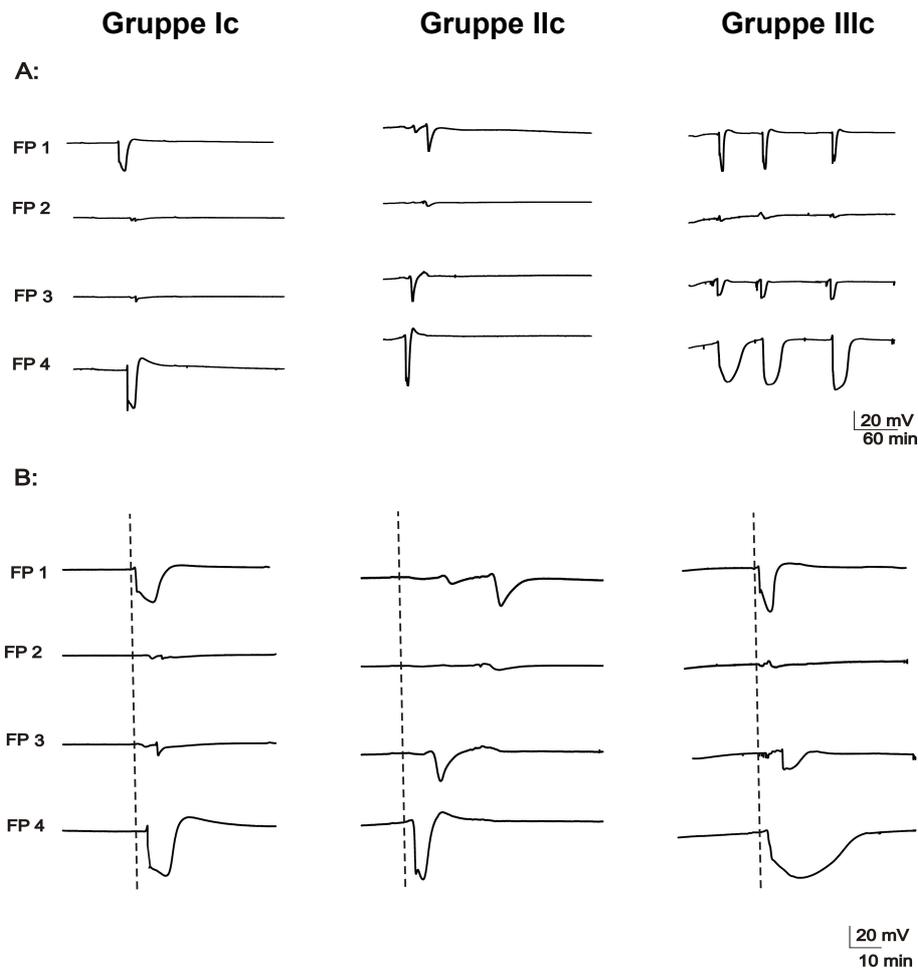


Abb. 3-6: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der chronischen Hyperthermie.

A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen:

Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala,

FP 4 = Temporalcortex.

B: Die Propagation von SD ist am unterschiedlichen Beginn der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier SD-Anfangspunkten. Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe :

Gruppe I : Entorhinalcortex->Temporalcortex->Amygdala (n = 2)

Gruppe II : Temporalcortex->Amygdala->Entorhinalcortex (n = 2)

Gruppe III : Entorhinalcortex ->Temporalcortex->Amygdala-(n = 4)

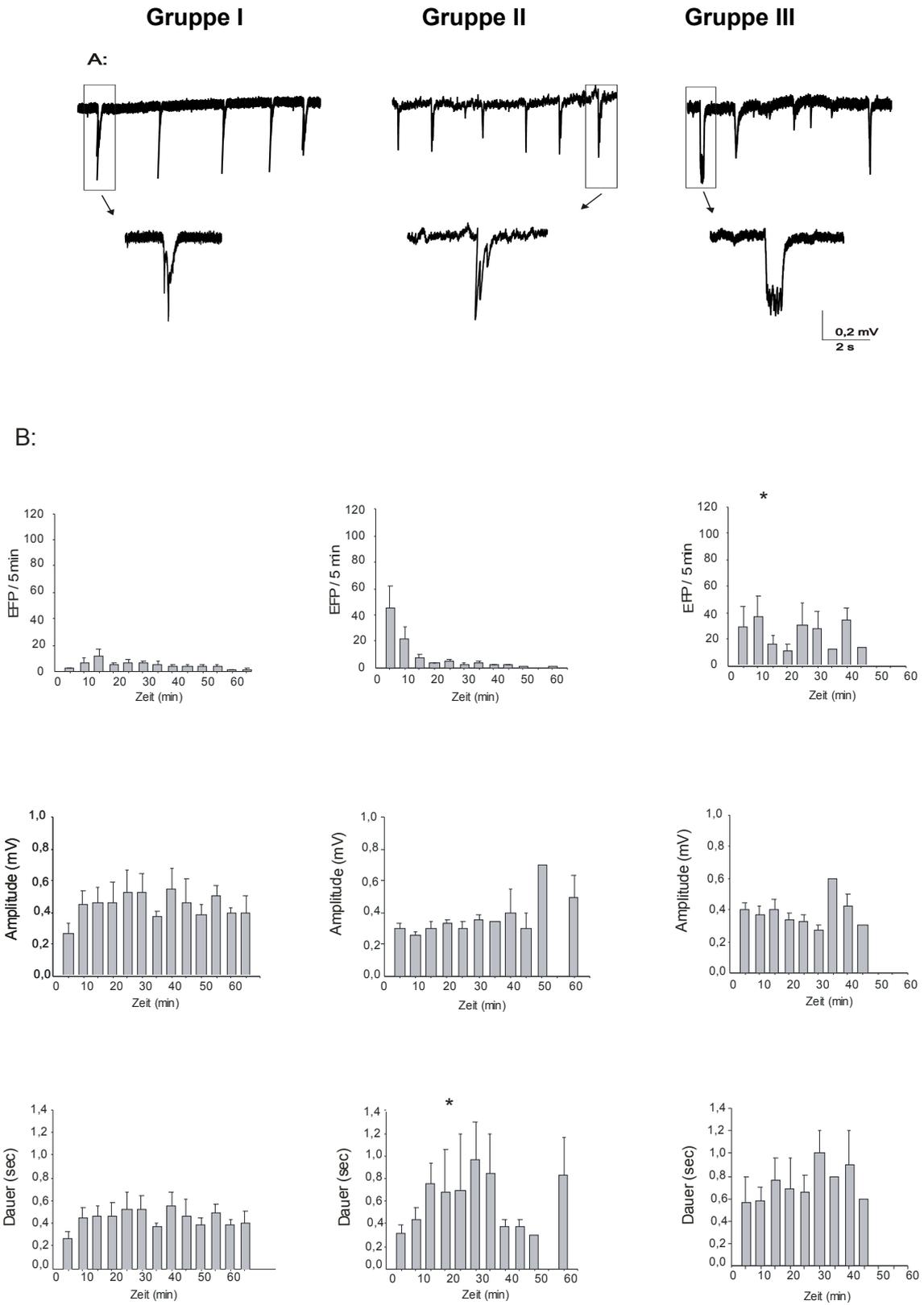


Abb. 3-7: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der akuten Hyperthermie, Gruppen I-III: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Die mittlere Frequenz war in der Gruppe III ($P < 0,001$) signifikant höher als in der Gruppe I und II. Für die Dauer der EFP ergab sich in der Gruppe II einen signifikanten Unterschied ($P = 0,002$) im Vergleich zur Gruppe I.

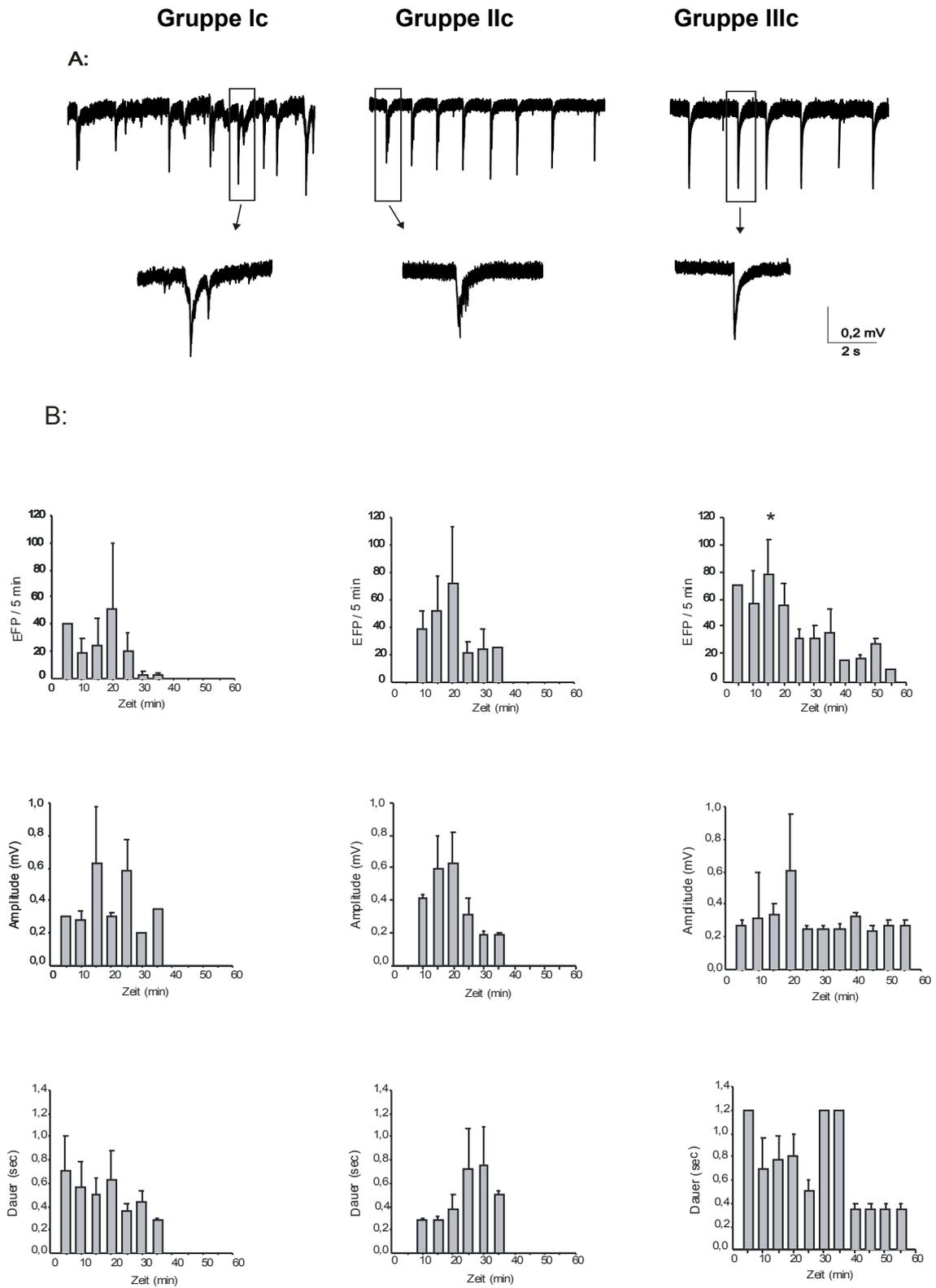


Abb. 3-8: (Legende siehe nächste Seite)

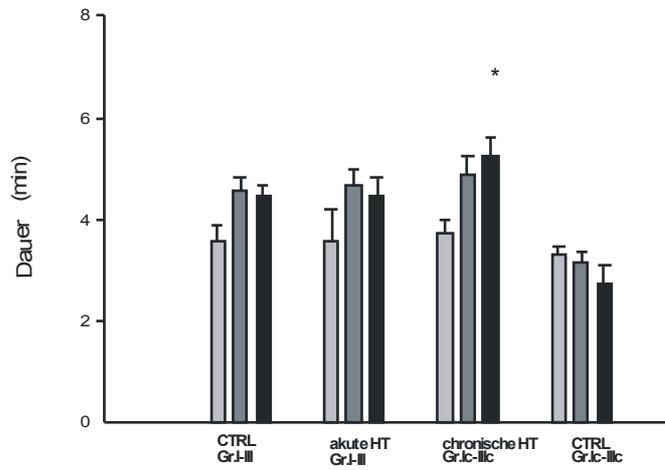
Abb. 3-8: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der chronischen Hyperthermie, Gruppen Ic-IIIc:

Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in Sekunden pro 5 Minuten. Die mittlere Frequenz war in der Gruppe IIIc ($P < 0,001$) signifikant höher als in der Ic.

A: mittelwertige Dauer einer SD



B: mittelwertige Amplitude einer SD

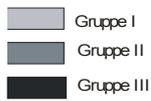
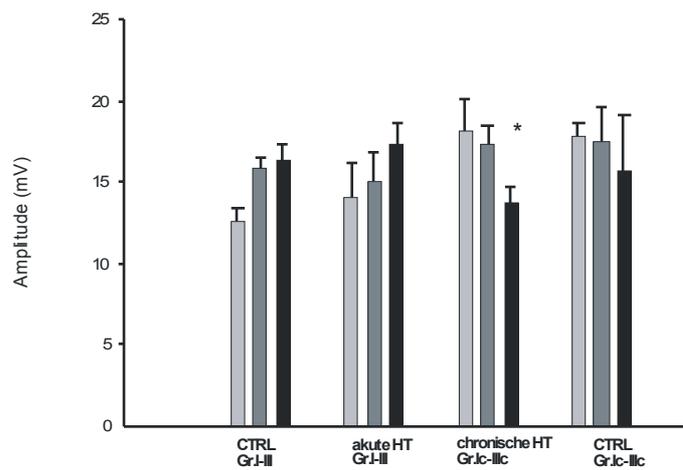


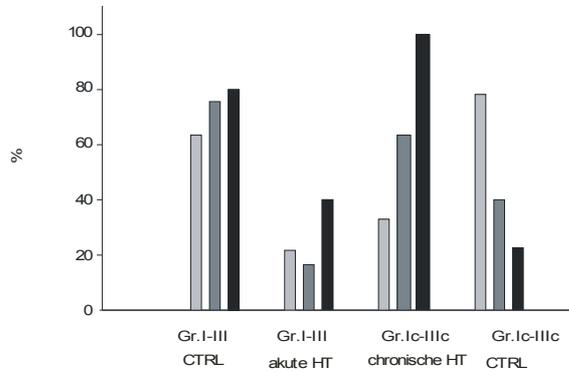
Abb. 3-9: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-9: Graphische Darstellung der SD-Parameter: die Mittelwerte der Dauer in Minuten und Amplitude in mV nach der Superfusion von Low NaCl-Lösung in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Kontrolle (CTRL), akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie, Kontrolle (CTRLc entspricht dem Alter von Tieren der chronischen Hyperthermie). Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe Ilc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Die Dauer der DC-Negativierung zeigte einen signifikanten Unterschied in der Gruppe IIIc nach der chronischen Hyperthermie ($P = 0,003$) im Vergleich zur Gruppe Ic und Ilc vom gleichen Versuch. Die mittlere SD-Dauer nach der chronischen Hyperthermie verlängerte sich signifikant in der Gruppen Ilc ($P = 0,001$) und IIIc ($P < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle von Ratten des gleichen Alters.

B: Der Mittelwert der Amplituden war signifikant höher bei der Gruppe IIIc nach der chronischen Hyperthermie ($P = 0,02$) als bei der Gruppe Ic und Ilc vom gleichen Versuch. Vier Wochen nach der Hyperthermie ergab sich in der Gruppe IIIc Feldpotentialabfall mit $13,7 \pm 1,0$ mV ein im Vergleich zur Kontrolle $15,8 \pm 2,2$ signifikant ($P = 0,04$) niedriger Wert.

A: prozentuales Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %.



B: mittelwertige SD-Anzahl pro 1 Schnittpräparat

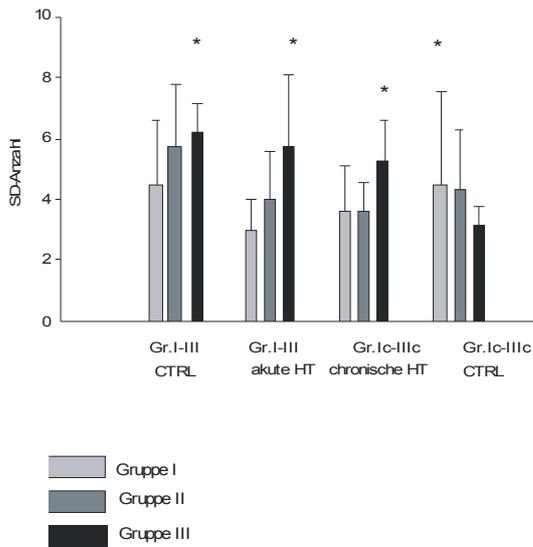


Abb. 3-10: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-10: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Gruppen I-III: Kontrolle (CTRL), akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie, Kontrolle (CTRLc entspricht dem Alter von Tieren der chronischen Hyperthermie): Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe Ilc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Prozentuales Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %.

B: Durchschnittliche SD-Anzahl pro 1 Schnittpräparat. Signifikanter Unterschied war in der folgenden Gruppen auszumachen: ($P = 0,03$) in der Kontroll-Gruppe III ($5,9 \pm 0,2$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe I ($4,5 \pm 0,7$); ($P = 0,04$) bei der Kontroll-Gruppe Ic ($4,5 \pm 1,0$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe IIIc ($2,5 \pm 0,5$); ($P = 0,03$) in der Gruppe III des akuten Hyperthermiemodells ($5,6 \pm 1,2$) im Vergleich zur Gruppe I ($3,0 \pm 0,6$); ($P = 0,01$) bei der Gruppe IIIc des chronischen Hyperthermiemodells ($5,5 \pm 0,6$) im Vergleich zur ($3,6 \pm 0,7$) Gruppe Ic und Ilc ($3,6 \pm 0,4$).

3.2.2 Auslösung der SD und EFP durch extrazelluläre Tropfenapplikation einer 2mmol/l KCl-Lösung

Die experimentell am häufigsten verbreitete Methode SD auszulösen ist die kortikale Applikation von Kaliumchlorid. Die extrazelluläre physiologische Kaliumkonzentration beträgt im Gehirn 3mM und kann sich während neuronaler Aktivität auf 12 mM erhöhen (Somjen, 1975). Während einer SD können die Werte auf 40 bis 60 mM ansteigen (Lauritzen, Hansen, 1992). Um SD reproduzierbar auszulösen wurde in dieser Versuchsreihe diese Sequenz mit einer Tropfenapplikation einer 2 M KCl-Lösung aus einer Injektionsspritze lateral der Messelektroden vorgenommen. Die Negativierung des DC-Potential erfolgte abrupt und ohne jegliche Latenzzeit.

Es wurden 67 Versuche durchgeführt, bei denen 13 Gewebepreparate nicht auf die KCl-Lösung reagiert haben. In den 36 Schnitten wurden gleichzeitig SD und EFP registriert, bei 14 lediglich nur SD und bei 4 ausschließlich EFP.

In 50,6% -Schnitten der Gruppe I wurden 5 SD beobachtet ($1,8 \pm 0,3$ pro 1 Schnitt). Bei den 45,4% Präparaten wurde in der Gruppe II das Auftreten von SD registriert, dabei lag die mittlere Anzahl von SD ($n = 17$) pro 1 Schnitt bei $3,1 \pm 0,3$. In der Gruppe III ergaben sich 22 SD ($3,3 \pm 0,4$ SD pro 1 Schnitt) aus 77,7% Hirnschnitten.

Bei den Ratten der Gruppe Ic wurden in 75,3% Gewebepreparaten 25 SD ($2,1 \pm 0,3$ pro 1 Schnitt) beobachtet. In 66,6% Präparaten der Gruppe IIc stellten wir insgesamt 12 SD ($2,8 \pm 0,5$ pro 1 Schnitt) fest und in der IIIc die Anzahl der SD war insgesamt 38 ($3,1 \pm 0,4$ pro Schnitt) in 100 % Schnitten (Abb. 3-16).

Die Parameter der EFP: die Frequenz ($P < 0,001$) und die Dauer ($P = 0,04$) zeigten signifikante Differenz zwischen 3 Gruppen vom akuten

Anfallsmodell. Wie man auch aus der graphischen Darstellung (Abb.3-13) erkennen kann besitzt die Gruppe III die höchsten Werte. Im chronischen Epilepsie-Modell ergab sich die gleiche Tendenz bezüglich des Unterschiedes von EFP-Parameter zwischen allen Gruppen. Im Gegensatz zu der Ic und IIc war die Frequenz ($P = 0,007$), die Amplitude ($P = 0,003$) und die Dauer ($P = 0,011$) der Gruppe IIIc ebenso signifikant höher (Abb.3-14).

Ein signifikanter Effekt nach der KCl-Applikation zeigte sich auch bei SD-Induktion zwischen 3 Gruppen sowohl bei den Schnitten der akuten Hyperthermieform als auch bei den Schnitten der chronischen Hyperthermie. Dabei lagen die Ergebniswerte der Gruppe III vom akuten Typ im Vergleich zu den restlichen höher (die Amplitude ($P = 0,03$)). Im chronischen Modell zeigte die Gruppe IIIc signifikanten Unterschied für die mittlere Amplitude ($P = 0,01$) im Vergleich zur Gruppe Ic. Vier Wochen nach der Hyperthermie ergab sich in der Gruppe IIIc für mittlere SD-Dauer ein im Vergleich zur Gruppe Ic signifikant ($P = 0,001$) höheren Wert (Abb. 3-15).

Tab. 3-5 – 3-6 zeigen die gemessenen SD- und EFP- Parameter von allen Altersgruppen dieses Versuches kompakt.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	8	5	7	9	6	12
SD-Anzahl pro Gruppe	17	14	22	25	12	38
SD-Amplitude in mV	6,4 ± 1,2	18,7 ± 2,0	21,1 ± 1,1	17,5 ± 1,7	13,4 ± 3,8	13,4 ± 0,9
SD-Dauer in min	6,2 ± 0,5	6,1 ± 0,5	6,2 ± 0,3	4,8 ± 0,5	6,9 ± 0,7	7,9 ± 0,7

Tab. 3-5: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52). Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, Gesamt-SD-Anzahl pro Gruppe, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

	Gr.I	Gr.II	Gr.III	Gr.Ic	Gr.IIc	Gr.IIIc
Schnitt-Anzahl pro Gruppe	7	3	7	9	7	8
EFP-Frequenz pro 5 min	15,9 ± 6,8	11,9 ± 2,5	38,5 ± 4,7	28,9 ± 3,8	30,7 ± 3,5	59,4 ± 9,3
EFP-Amplitude in mV	0,33±0,02	0,33±0,02	0,35±0,02	0,25±0,02	0,3 ± 0,05	0,35±0,01
EFP-Dauer in sec	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,45 ± 0,1	0,65 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Tab. 3-6: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippokampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52). Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten pro Gruppe, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden

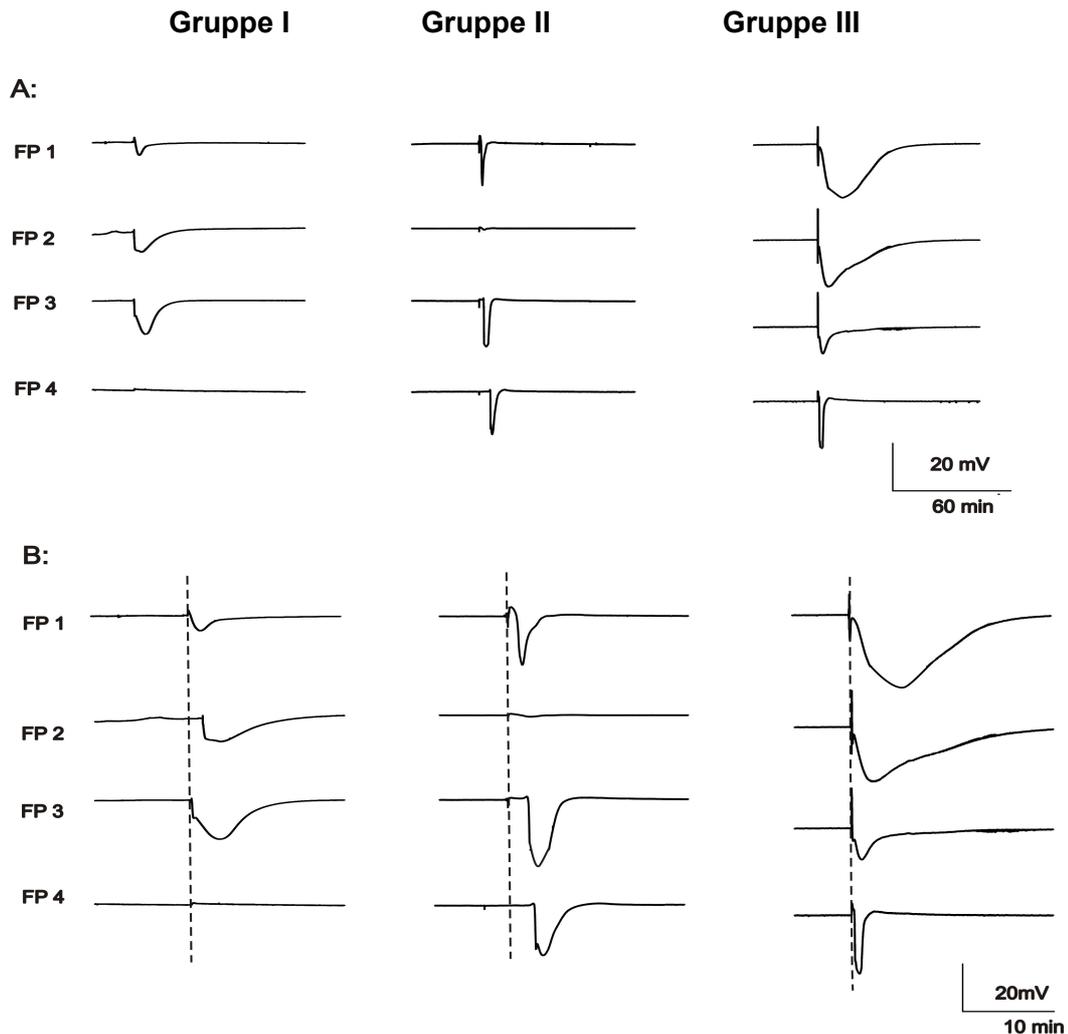


Abb. 3-11: Wirkung von KCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der akuten Hyperthermie. A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen:

Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala,

FP 4 = Temporalcortex.

B: Die Propagation von SD ist am unterschiedlichen Beginn der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier Anfangspunkten.

Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe :

Gruppe I : Entorhinalcortex->Amygdala->Hippocampus (n = 3)

Gruppe II : Entorhinalcortex->Amygdala->Temporalcortex (n = 2)

Gruppe III : Entorhinalcortex > Amygdala->Hippocampus->Temporalcortex (n = 5)

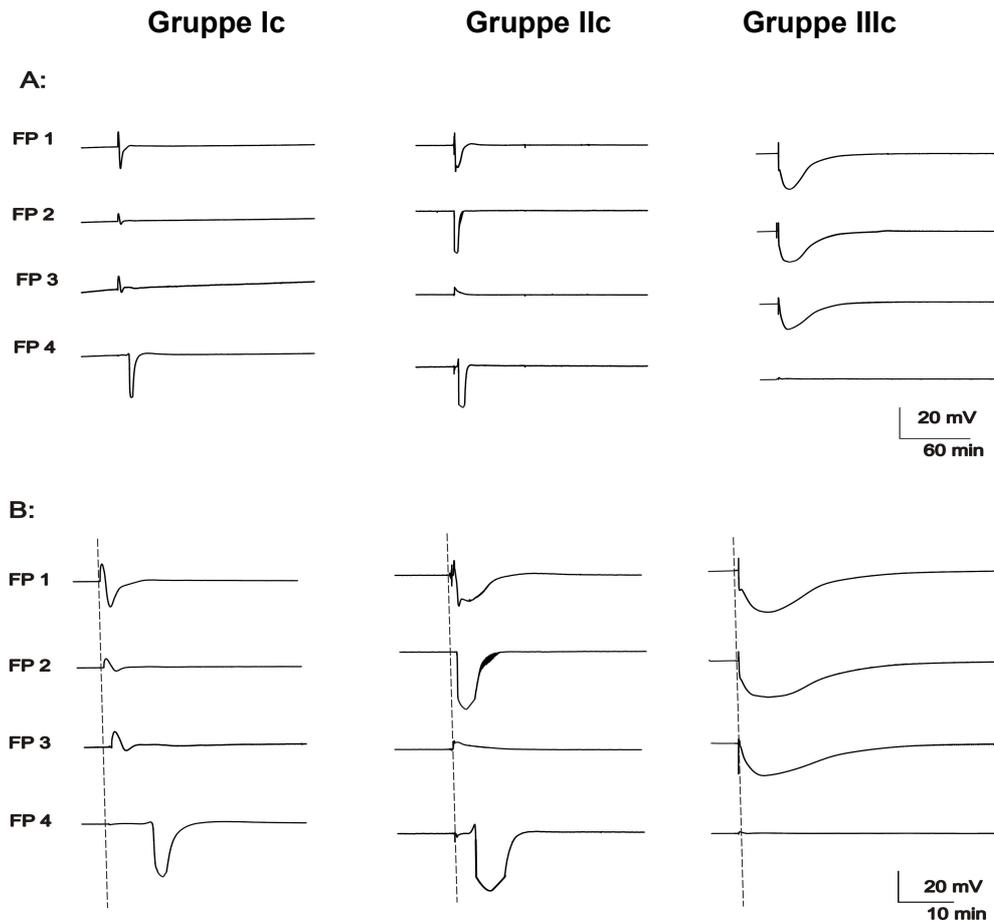


Abb. 3-12: Wirkung von KCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der chronischen Hyperthermie.

A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen: Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex.

B: Die Propagation von SD ist an den unterschiedlichen Gipfeln der SD-Auslenkung zu erkennen. Die gepunktete Linie zeigt den Unterschied zwischen vier Gipfeln. Die häufigste SD-Propagation erfolgte in folgender Reihe :

Gruppe I : Entorhinalcortex->Amygdala->Temporalcortex (n = 3)

Gruppe II : Entorhinalcortex->Hippocampus-> Temporalcortex (n = 2)

Gruppe III : Entorhinalcortex-> Amygdala->Hippocampus (n = 4)

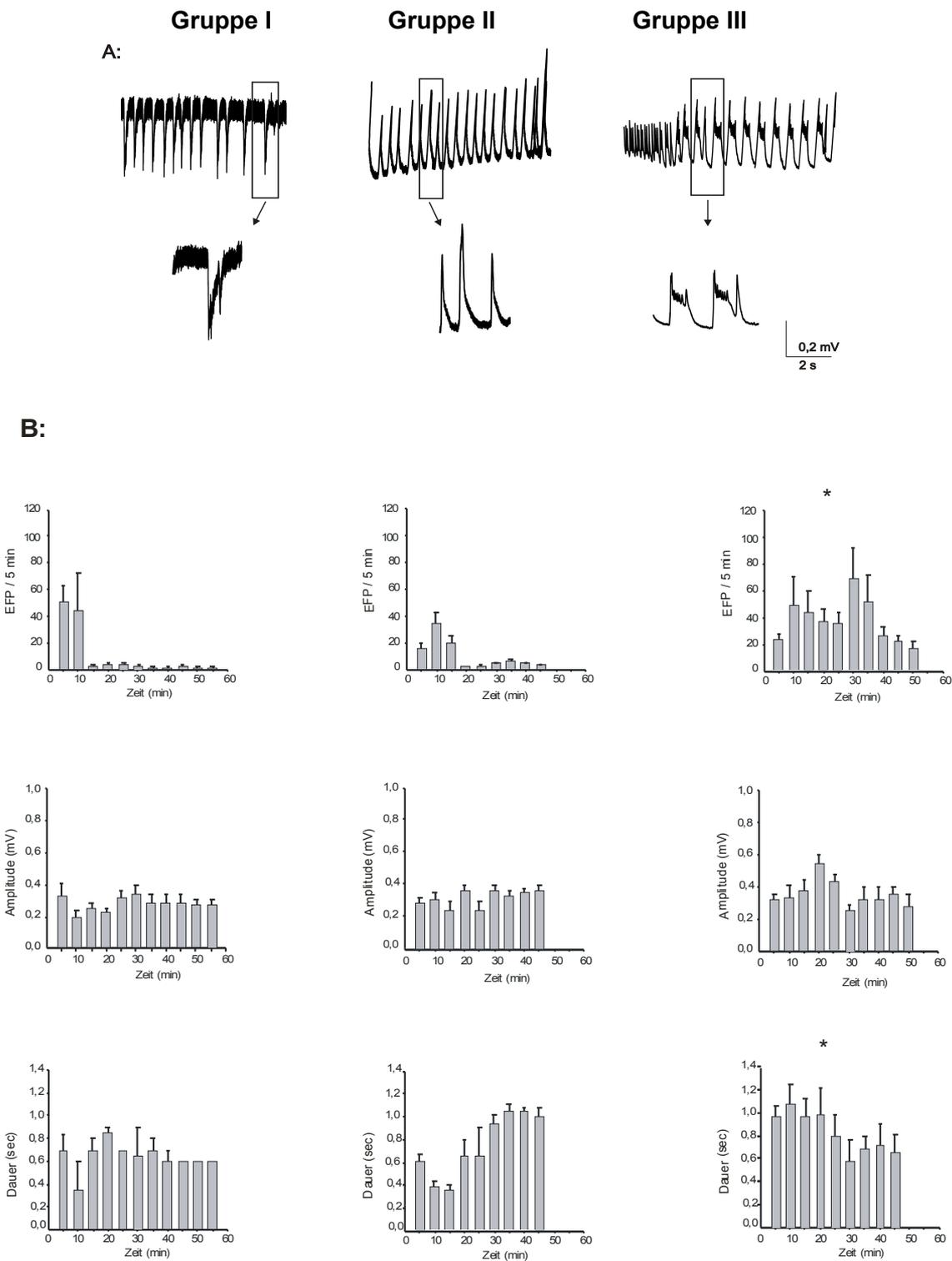


Abb. 3-13: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-13: Wirkung von 2 M KCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der akuten Hyperthermie, Gruppen I-III:

Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Applikation von KCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in Sekunden pro 5 Minuten.

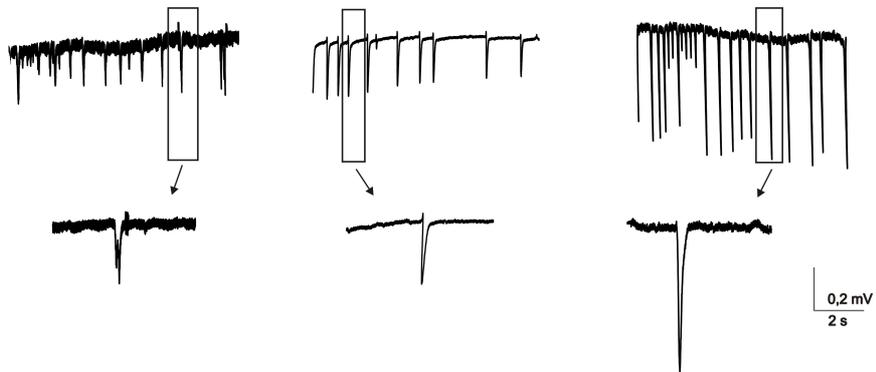
Die mittlere Frequenz war in der Gruppe III ($P = 0,007$) signifikant höher als in der Gruppe I und II. Für die Dauer der EFP ergab sich in der Gruppe III einen signifikanten Unterschied ($P = 0,04$) im Vergleich zur Gruppe I.

Gruppe Ic

Gruppe IIc

Gruppe IIIc

A:



B:

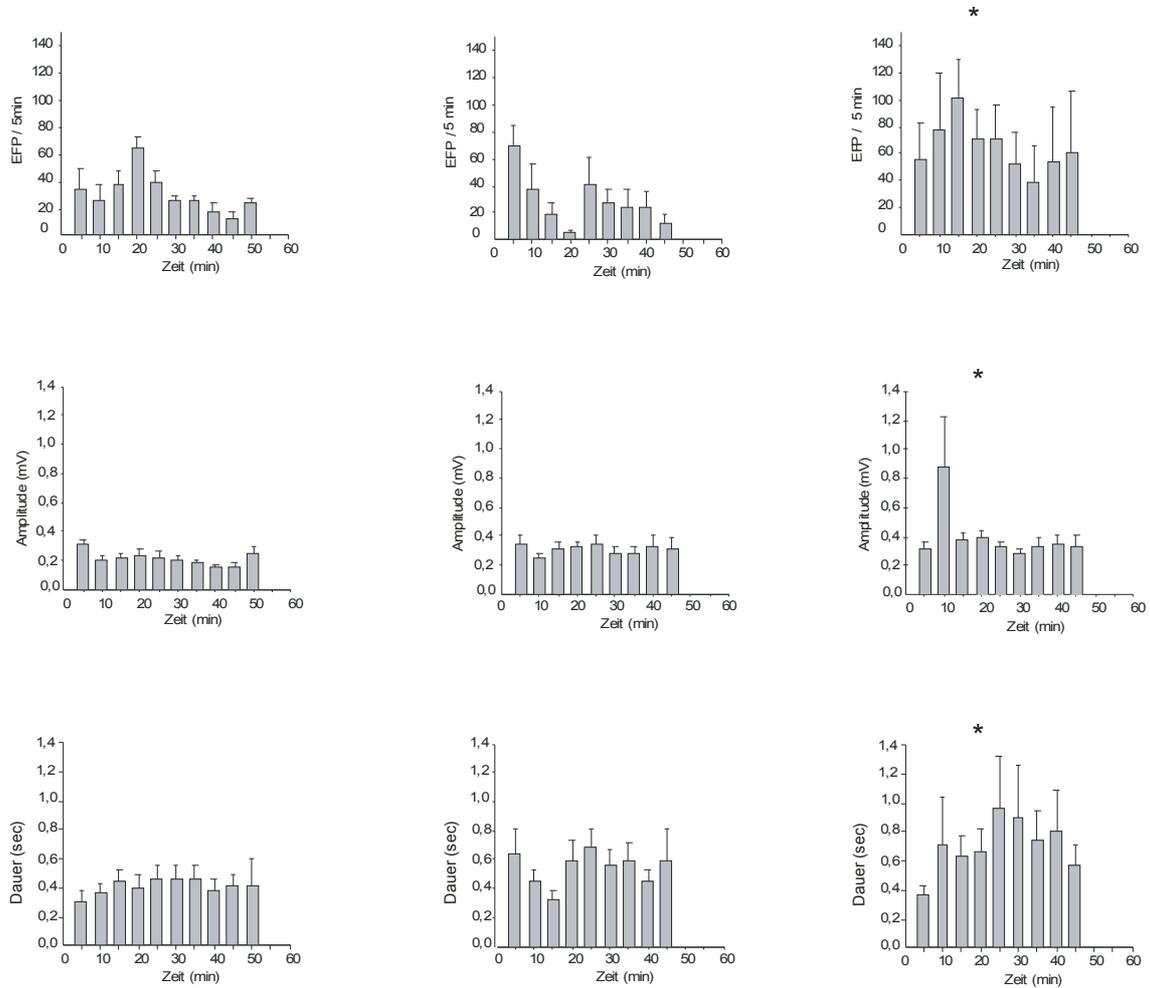


Abb.3-14 (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-14: Wirkung von 2 M KCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der chronischen Hyperthermie, Gruppen Ic-IIIc:

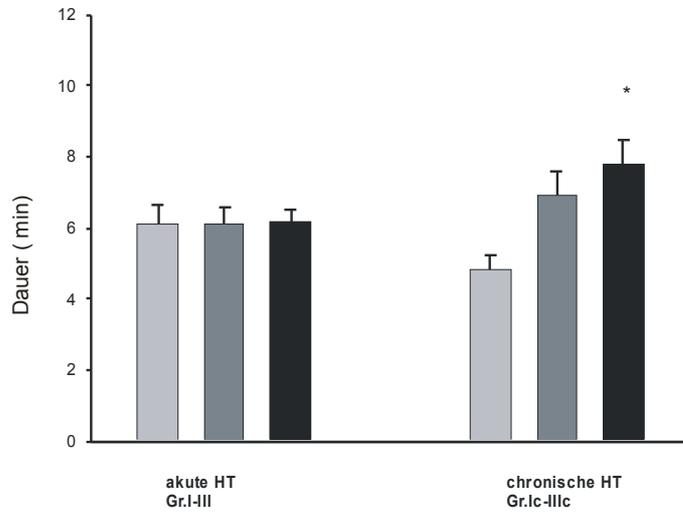
Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Applikation von KCl-Lösung.

B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz von EFP, Amplitude in mV und Dauer in Sekunden pro 5 Minuten.

Die mittlere Frequenz war in der Gruppe IIIc ($P < 0,001$) signifikant höher als in der Gruppe Ic und IIc. Die Amplitude war ebenso signifikant höher ($P = 0,003$) bei der Gruppe IIIc im Vergleich zur Ic. Für die Dauer der EFP ergab sich für die Gruppe IIIc einen signifikanten Unterschied ($P = 0,011$) im Vergleich zu restlichen Gruppen.

A: mittelwertige Dauer einer SD



B: mittelwertige Amplitude einer SD

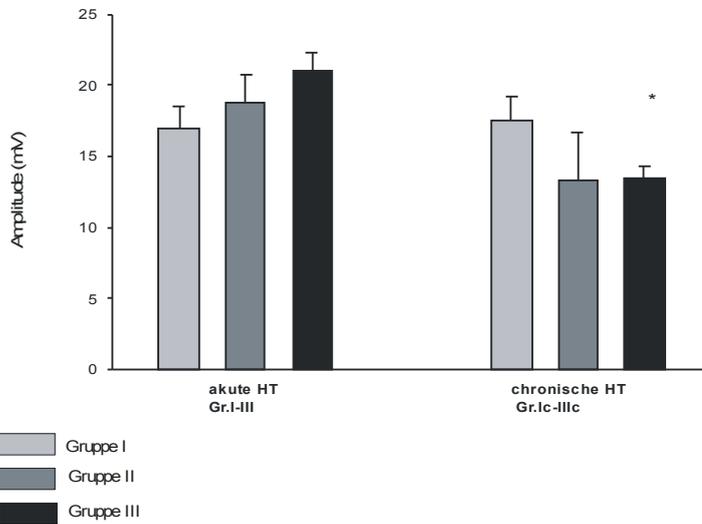
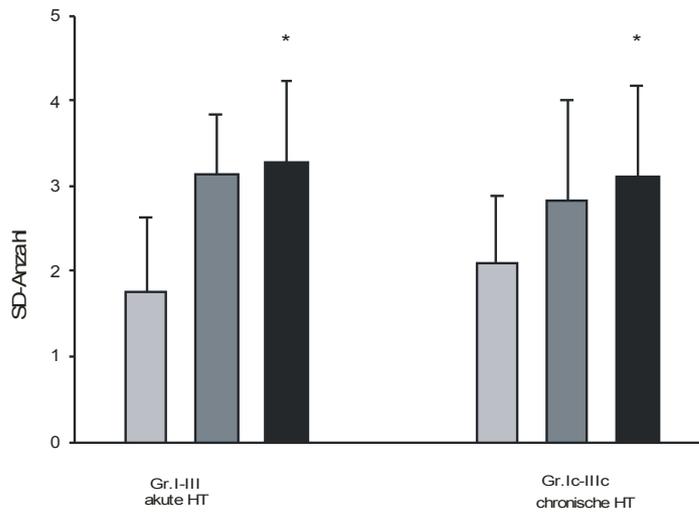


Abb. 3-15: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-15: Graphische Darstellung der SD-Parameter: Die Mittelwerte der Dauer in Minuten und Amplitude in mV nach kortikaler Applikation von 2M KCl-Lösung an Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten nach der akuten und chronischen Hyperthermie, Ratten: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe IIc (p 42-47) und Gruppe IIIc (p 48-52).

A: Die Dauer der SD zeigte einen signifikanten Unterschied in der Gruppe IIIc ($7,8 \pm 0,7$ min) vom chronischen Typ ($P = 0,001$) im Vergleich zur Ic ($4,8 \pm 0,5$ min) vom gleichen Typ. B: Die mittlere Amplitude war signifikant höher bei der Gruppe III vom akuten Typ ($P = 0,03$) als in der Gruppe I und II vom gleichen Versuch; Vier Wochen nach der Hyperthermie ergab sich in der Gruppe IIIc für DC-Negativierung mit $13,4 \pm 0,9$ Mv ein im Vergleich zur Ic $17,5 \pm 1,7$ signifikant ($P = 0,01$) niedriger Wert.

A: mittelwertige SD-Anzahl pro 1 Schnitt



B: Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %

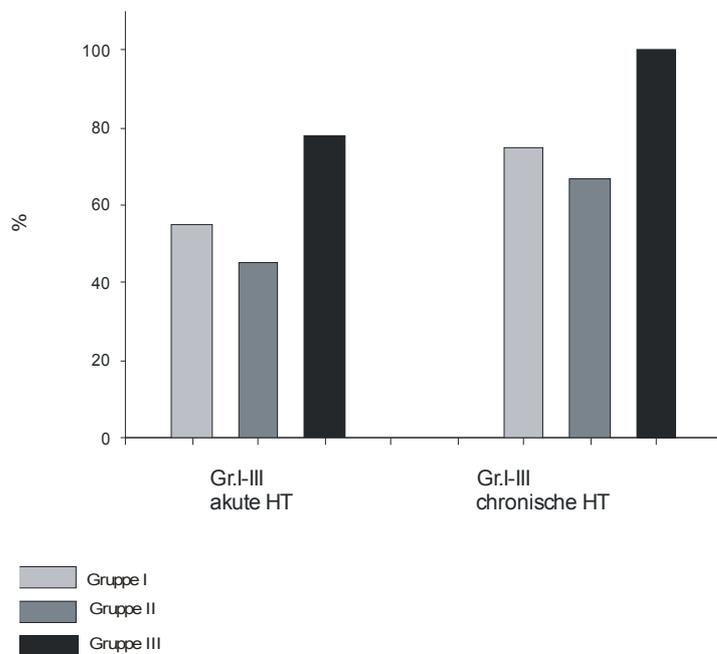


Abb. 3-16: (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 3-16: Wirkung von KCl-Lösung nach der akuten und chronischen Hyperthermie auf SD in Amygdala-Hippokampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten: Gruppe I (p 7-13), Gruppe II (p 14-19), Gruppe III (p 20-24), Gruppe Ic (p 35-41), Gruppe Ilc (p 42-47) und Gruppe Illc (p 48-52).

A: Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %.

B: Durchschnittliche SD-Anzahl pro 1 Schnittpräparat. Signifikanter Unterschied war in der folgenden Gruppen auszumachen: ($P = 0,006$) in der Gruppe III des akuten Hyperthermiemodells ($3,3 \pm 0,4$) im Vergleich zur Gruppe I ($1,8 \pm 0,3$); ($P = 0,036$); bei der Gruppe Illc des chronischen Hyperthermiemodells ($3,1 \pm 0,4$) im Vergleich zur Ic ($2,1 \pm 0,3$).

3.3 Ausbreitung von SD

Für die Bestimmung des Ursprungsortes der SD-Ausbreitung wurde die anatomische Region bestimmt, in der die ersten Feldpotentialänderungen registriert werden konnten.

Für die Hirnschnitte der Kontrollen ergab sich bezüglich des Ursprungsortes folgende prozentuale Verteilung auf die anatomischen Strukturen: Gruppe I-III: 78% im EC, 12,5 % in LA und 9,5% im TE; Gruppe Ic- IIc : 80% im EC, 17,5 im TE und 2,5% in LA; Gruppe I-III nach akuter Hyperthermie: 79% im EC, 11% im TE und 10% in LA; Gruppe Ic- IIIc nach chronischer Hyperthermie: 85% im EC, 12% im TC und 3% in LA. Die lokale Applikation von KCl-Lösung führte zu folgender Verteilung der Ursprungsregionen: Gruppe I-III nach akuter Hyperthermie: 89,5% im EC und 9,5% im TC; Gruppe Ic-IIIc nach chronischer Hyperthermie: 99% im EC und 1% im TC. Ausgehend vom Ursprungsort wurde analysiert, wie sich die SD über das Hirnschnittpräparat ausbreitete. Die Propagation der SD erreichte nicht in allen Hirnschnitten vier untersuchenden Regionen. In den folgenden Fällen wurde die Propagation in allen vier anatomischen Orten beobachtet: Kontrollgruppen: Gruppe I: 50%; Gruppe II: 55,5%; Gruppe III: 70%; Gruppe Ic: 28%; Gruppe IIc: 33%; Versuchsgruppe III der akuten HT-Form nach der Superfusion von Low NaCl-Lösung: 55,5%; Versuchsgruppen der akuten HT-Form nach der Applikation von KCl: Gruppe II: 40%; Gruppe III: 71,4%; Versuchsgruppen der chronischen HT-Form: Gruppe II: 33,3%; Gruppe III: 33,3%.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Modelltypen verwendet. Ein akutes Anfallsmodell, bei dem durch thermische Induktion ein epileptischer Anfall ausgelöst wurde. Und ein chronisches Epilepsiemodell, bei dem die Tiere durch einen primären Fieberkrampf, der eben so thermisch ausgelöst wurde, nach einer Latenzzeit von vier Wochen durch einen unphysiologischen Reiz hypersensible neuronale Aktivitäten zeigten, in Form von SD und epileptischen Entladungen. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Modelle konzentrieren sich nicht ohne Grund auf den Temporallappen bzw. Hippocampus. In dieser Hirnregion ist die Schwelle für die Entstehung epileptischer Aktivität besonders niedrig, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich etwa zwei Drittel aller lokalisationsbezogenen Epilepsien dieser Region zuordnen lassen (Siemes und Bourgeois, 2001). In den kombinierten Hirnschnittpräparaten der vorbehandelten Tiere wurden SD und epileptiforme Feldpotentiale durch eine Verminderung der extrazellulären Natriumchloridkonzentration und eine kortikale Tropfenapplikation einer 2 M KCl-Lösung ausgelöst. Es fanden sich bezüglich des Verhaltens epileptischer Aktivität in beiden Modellen signifikante Unterschiede im Vergleich zu untereinander und zu Kontrollgruppen. Hinsichtlich der Epilepsiebereitschaft wurde beobachtet, dass bei Hirnschnitten der Ratten, die älter als 18 Tage waren und bei denen Fieberkrampf induziert worden war, im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen und zu den Gruppen des gleichen Versuches die Schwelle zur Auslösung der epileptiformen Aktivität erniedrigt war sowohl direkt nach der Hyperthermie als auch 4 Wochen danach. Besonders bei den Ratten der Gruppe III stellten wir fest, dass alle zu untersuchenden Gewebe nach dem akuten Fieberkrampf eine erhöhte Sensibilität bei der Entstehung von neuronaler Aktivität demonstrierten. Viel interessanter war zu beobachten, dass auch

lang anhaltende Veränderungen bei Tieren dieser Gruppe auftraten (4 Wochen nach der Hyperthermie). Erhöhte Körpertemperatur führte im Alter von 18 bis 24 Tagen zu einer Abnahme der Latenz und einer Abnahme der Amplitude sowie eine Steigerung der Dauer von DC-Negativierung. Ebenso lag die mittlere Anzahl der induzierten SD pro 1 Schnitt signifikant höher, als bei den jüngeren Ratten.

Die Applikation von KCl-Lösung in einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ führte in den Hirnschnitten von juvenilen Ratten der Gruppe III, sowohl direkt nach der Hyperthermiebehandlung, als auch vier Wochen danach zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz der EFP und einer Zunahme der EFP-Dauer im Vergleich zu den anderen Gruppen. Durch Superfusion der Low NaCl-ACSF traten bei Tieren der Gruppe III von beiden Hyperthermiemodellen ebenfalls die EFP mit einer Frequenz auf, die deutlich höher war, als in der Gruppe von sehr kleinen Ratten.

Bei der Bestimmung des Ursprungsortes der SD-Ausbreitung fiel auf, dass in den meisten Schnitten die Mehrheit der SD im entorhinalen Kortex ihr Ursprung hatten. Dieses Ergebnis wurde auch in dem Niedrig-Mg-Modell vorangegangener Studien beobachtet (Holtkam et al, 2003). Für die Bevorzugung dieser Region als Ursprungsort konnten Neurone im EC verantwortlich sein, die in einem ständigen Erregungszustand befinden (Berretta and Jones, 1996). Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass dieser Erregungszustand auf das Vorhandensein präsynaptischer NMDA-Rezeptoren in diesem Ort zurückzuführen ist. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bewirkt kontinuierliche Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat. Glutamat ist wesentlich an der Ausbreitung von SD beteiligt. Der Ursprungsort epileptiformer Aktivität entspricht der Lokalisation der Neuronenpopulation, die zu Beginn zugleich depolarisiert. Ausgehend von dieser Region werden

umliegende Nervenzellen einbezogen. Für die Ausbreitung neuronaler Aktivität sind verschiedene Mechanismen der Erregungsfortleitung von Bedeutung. Die synaptische Übertragung stellt unter Normalbedingungen den entscheidenden Kommunikationsmechanismus der Nervenzellen dar. Hierbei setzt das präsynaptische Neuron Transmitter frei, die postsynaptisch an Rezeptoren binden und so den Erregungszustand des nachgeschalteten Neurons beeinflussen. Es hängt vom freigesetzten Transmitter ab, ob es zu einer exzitatorischen (vorwiegend Glutamat) oder inhibitorischen (vorwiegend GABA) Wirkung kommt. Während Inhibitoren eine Hyperpolarisation des Membranpotentials bewirken, führen exzitatorische Neurotransmitter zur Depolarisation und ggf. zur Entstehung eines Aktionspotentials. Der Nervenleitgeschwindigkeit entsprechend, die in erster Linie vom Myelinisierungsgrad des Neurons abhängt, wird das Aktionspotential axonal fortgeleitet.

Wie beim Kleinkind und Kind verlaufen epileptische Anfälle auch bei Tieren während der Ontogenese anders als bei Erwachsenen. Bei jungen Tieren hängt epileptische Aktivität von den bereits etablierten synaptischen Verbindungen im Nervensystem, von der Expression der Ionenkanäle und Bindungsstellen für Botenstoffe (Transmitter, Neuromodulatoren, Neurohormone) und von den Mechanismen der Elektrolyt-Regulation ab. Während der Entwicklung des ZNS werden sowohl erregende wie auch hemmende Verbindungen in Überzahl angelegt. Zur physiologischen Hirnreifung gehört eine selektive Degeneration dieser überzählig angelegten Nervenzellen (E.Kandel and J.Schwarz, 1985). Aufgrund der vermehrt angelegten synaptischen Verbindungen ist es zu erwarten, dass die Epilepsiebereitschaft bei neugeborenen Tieren größer ist. Dies ist allerdings nicht unmittelbar nach der Geburt der Fall. In der Tat zeigte sich, dass an den

neokortikalen Hirnschnitten der gesunden Ratten zwischen Tag 15 und Tag 24 postnatal die Fähigkeit zur Ausbildung von epileptiformer Aktivität sehr hoch war und dann bald wieder sich zurück bildete. Wie unsere Experimente demonstrierten wurde dann die Epilepsiebereitschaft im Alter von über 40 Tagen immer weniger.

Diese erhöhte Epilepsiebereitschaft im juvenilen Alter rührt u.a. von der verstärkten erregenden synaptischen Kopplung her. Spezifisch ist die NMDA-Rezeptoren-Expression. Während bei neugeborenen Ratten die NMDA-Rezeptoren noch weitgehend auf die Zellsomata beschränkt sind, werden sie im Laufe der Ontogenese auch im Dendritenbaum exprimiert und erreichen zwischen Tag 12 und 20 das Maximum. Die Zahl der aktivierbaren NMDA-Rezeptoren nimmt dann im Laufe der weiteren Hirnentwicklung ab. Dieser Anhaltspunkt einer vermehrten NMDA-Rezeptoren-Exprimierung ist an erhöhter Krampfbereitschaft von juvenilen Ratten beteiligt (B.Hamon, U.Heinemann; 1987).

Ursache der Epilepsie ist einerseits ein Ungleichgewicht von exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen, die zur Hypererregbarkeit führen und andererseits eine abnorme synchronisierte Aktivität größerer neuronaler Verbände. Als Resultat kommt es in den betroffenen neuronalen Netzwerken zu Krampfanfällen, einer zufälligen synchronen unkontrollierten Entladung einer Nervenzellgruppe. Vermehrte synchrone Entladungen können Spreading Depression auslösen (M.Lauritzen, 1994), ein Phänomen, das erstmals bei Untersuchungen an Tiermodellen zur Epilepsie beobachtet wurde. Bei der Spreading Depression handelt es sich um eine sehr starke vorübergehende Depolarisation der Nerven- und Gliazellen der Hirnrinde, die sich mit 3-5 mm/min über die Kortexhemisphäre ausbreitet. Während der SD kommt es zu großen Umverteilungen von Ionen zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum sowie einem Wassereinstrom in die Zellen. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration steigt bis 60 mM an und Natrium, Chlorid- und

Kalziumkonzentrationen werden stark vermindert. Gleichzeitig entwickelt sich ein sehr großes negatives Feldpotential (20-35 mV). Kaliumionen und der exzitatorische Glutamat sind wesentlich an der Propagation der SD beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde SD u.a. durch Applikation von Kalium hervorgerufen. Trotz sehr starker Kaliumakkumulation kam es bei sehr jungen Ratten ($p < 11$) auch nach der direkten Hyperthermie nicht zur Auslösung der SD. Erst wenn die jungen Ratten älter waren gelang es die reproduzierbaren SD auszulösen. Dass SD bei sehr jungen Ratten schwer auslösbar ist, könnte auf einen Schutzmechanismus hindeuten, da das neugeborene Tier und der Säugling einem stärkeren Risiko anoxischer Situationen ausgesetzt ist. Spreading Depression ist u.a. der initiale Vorgang bei hypoxischen Zuständen. Die Rolle von SD während der Ontogenese ist daher wichtig. Das Auftreten von SD bei Tieren während der Reifung des Nervensystems versetzt das Gewebe in die Lage selektiv degenerative Prozesse in die Wege zu leiten um überzählig angelegten Nervenzellen und Verknüpfungen zu eliminieren. (U.Heinemann et al; 1987). Durch die Verminderung der erregenden Verbindungen im neokortikalen Gewebe nimmt auch die Krampfbereitschaft ab.

Eine der möglichen Ursachen von Entstehung der Epilepsiekrämpfen im Kindesalter ist das Fieber. Fieberkrämpfe gehören zu den häufigsten pathologischen Aktivitäten des Gehirns bei Kindern. Zur Auslösung von temperaturinduzierten epileptischen Anfällen wurde vor 30 Jahren das Tiermodell der Hyperthermie entwickelt (D.Holtzman et al, 1981). Auch in unseren Untersuchungen wurde die Auslösung von epileptiformen Anfällen durch Hyperthermie *in vivo* tierexperimentelles Modell für den Fieberkrampf eingesetzt. Dabei hat sich gezeigt, dass Fieberkrampf in praktisch allen sehr jungen Ratten durch eine Erhöhung von Körpertemperatur ausgelöst werden kann. Das Modell legt daher nahe,

dass einer mit Fieber verbundene Temperaturerhöhung, auch beim Menschen ein entscheidender Faktor in der Induktion von Fieberkrampf ist. In dieser Arbeit werden Fieberkrämpfe als mögliche Ursache von Epilepsie diskutiert. Es setzt voraus, dass es durch die Fieberkrämpfe zu Änderungen der Strukturen und Funktionen des Gehirns kommt, die die Hyperthermieanfälle überdauern. Dass durch Körpertemperaturerhöhung spontane epileptiforme Entladungen in juvenilen Ratten auslösbar sind belegen mehrere Studien. Während des Fiebers steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration vorübergehend aus dem normalen 5mM bis zur 40 mM und es kommt zur charakteristischen Hyperthermie-Antwort in Form von SD. Bei langanhaltender Temperaturerhöhung kommt es in der Regel zu mehrmals wiederholten Spreading Depression (J.Wu et al; 2000). Der Effekt von repetitiver SD auf Neurodegeneration bei juvenilen Ratten wurde kürzlich untersucht (Pomper et al, 2006; M. Jafarian et al; 2010). Dabei wurde belegt, dass in den kleinen Tieren, bei denen die repetitiven SD ausgelöst wurden, nach der Latenzzeit von 4 Wochen eine signifikant höhere Dichte von sogenannten „Dark cells“ im Vergleich zur Kontrolle resultierte. Der Zunahme der Dark Neuronen lässt auf einen vermehrten Zelluntergang schließen. Die Mechanismen von der Entstehung von Dark Neuronen durch SD sind nicht weitgehend geklärt. SD ist stetig mit der massiven Umverteilung der Ionen und des Wassers zwischen intra- und extrazellulärem Raum begleitet. Dramatische Änderung der Größe der Neuronen durch Umverteilung des Wassers kann der physikalische Mechanismus zur Bildung der Dark Neuronen sein. Der inhibierende Neurotransmitter Glutamat trägt essentiell zur Entstehung und Ausbreitung von SD bei (Kager et al, 2000; Smith et al, 2006). Cortical Spreading Depression reguliert die Bindungsstellen von Glutamat NMDA-, AMPA,-und Kainaterezeptoren im Neocortex der Ratten (Haghir et al, 2009; Menniti et al, 2000). Infusion von NMDA produziert Dark Neuronen im Neuronalgewebe (Dietrich et al, 1992).

Wie es auch aus der Studie, die im Institut für Physiologie I der WWU Münster kürzlich absolviert wurde, hervorgeht, dass im Tiermodell der Hyperthermie morphologische Veränderungen, im Sinne einer Neurodegeneration festgestellt wurden. Und darüber hinaus ließ es in dieser Studie eine erhöhte Expression der NMDA-Rezeptoren in Hirnschnitten der kleinen Ratten 4 Wochen nach dem akuten Fieberkrampf feststellen. Die Mechanismen, die zum komplexen Bild der fieberkrampfinduzierten Hirnschädigungen führen, sind vielfältig und nicht ausreichend aufgeklärt. Im Vordergrund stehen NMDA-Rezeptor vermittelte Zellschädigungen, die durch eine vermehrte Glutamatfreisetzung in den glutamatergen Schaltkreisen des Hippokampus, des Entorhinalkortex und in der Amygdala als Folge der epileptischen Anfällen induziert werden. Im Gegensatz dazu führten wiederholte SD im gesunden Hippokampus von adulten Tieren nicht zu Zellschäden (Nedergaard and Hansen, 1988). Diese sind für adulte Tiere ausschließlich im vorgeschädigten, z.B. hypoxischen Hippokampus beschrieben (Bush et al., 1996).

Das Auftreten starker frühkindlicher Fieberkrämpfe ist eine primäre Ursache zur späteren Entwicklung einer Temporallappenepilepsie. Pathologisches Merkmal der TLE sind schwere neurodegenerative Veränderungen im Bereich des Hippokampus (Ammon's Horn-Sklerose) und angrenzender Hirnareale (Amygdala, entorhinaler Kortex). Zelluläre Veränderungen im Hippokampus führen zum Untergang von Pyramidenzellen in den Regionen CA1, 3 und 4, während Interneurone und Gliazellen erhalten bleiben. Dabei kommt es zur Ausbildung neuer, synaptischer Verbindungen durch die Neurone der überlebenden Nervenzellen sowie zur Bildung von Narben. Die Folge sind veränderte Netzwerkeigenschaften, die als Grundlage epileptogener Mechanismen sind. Es könnte also vermutet werden, dass Fieberkrämpfe in sehr

jungem Alter das normale Reifungsprogramm des menschlichen Hippokampus stören und nachfolgend zu einer erhöhten Bereitschaft desselben für das Auftreten unprovoked Anfälle führen.

5. Zusammenfassung

Auch aus der anderen Studien geht hervor, dass Hirngewebe von jungen Tieren anfälliger für SD-Induktion ist, als das Gewebe von älteren (Luhmann and Kral, 1997) und dass das Alter dem Alter von Fieberkrämpfen der 11 bis 12 Tage ähnlich ist (Baram et al., 1998). SD kann im erwachsenen Alter auftreten, aber dabei sinkt die Ausbreitungsgeschwindigkeit (Guedes et al., 1996). Bei Ratten im Alter von 18-22 Tagen sind SD in hippokampalen Schnitten leichter zu produzieren, als in denen von 10-15 oder 28-32 Tagen nach der Geburt (Kreisman and Smith, 1993). SD als Fieberantwort war besser in Hirnpräparaten bei Ratten im Alter von 17-60 Tagen reproduzierbar, als in denen von 8-16 oder älter als 60 Tage (Wu et al., 2000).

In unserem Experiment demonstrierten Tiere im Alter von 18 bis 24 Tagen eine signifikant höhere Epilepsiebereitschaft sowohl direkt, als auch vier Wochen nach dem Fieber. Als Zeichen einer leichteren Auslösbarkeit von SD nach der Hyperthermiebehandlung fand sich eine Abnahme der Latenz. Bezüglich der elektrophysiologischen Charakteristika von SD zeigte sich eine signifikante Zunahme der Dauer des negativen Feldpotentials. Die zunehmende Dauer von SD und die damit einhergehenden Ionenverschiebungen weisen auf eine pathologische Veränderung bzw. Einschränkung der Kompensationsmechanismen von Nerven- und Gliazellen hin (Pomper et al., 2006). Als Zeichen einer neuronalen Störung konnte eine Abnahme der Feldpotentialamplitude beobachtet werden. Nach dem bisher dargestellten konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit bzw. Bereitschaft zum Auslösen epileptischer Aktivität altersabhängig und während der Ontogenese der Hirngewebe bei der Ratte hoch ist. Und eine Hyperthermie, also auch Fieber, kann vor allem während der

Ontogenese zu einer andauernden Veränderung zellulärer Erregbarkeit führen. Folgende Interpretation der Ergebnisse ist denkbar: Das unreife Hirngewebe ist anfälliger für SD und dadurch resultierenden Zellschäden. Die enge Verwandtschaft zwischen der Spreading Depression und dem Fieber zeigte bei zahlreichen Untersuchungen eine Beziehung dieser beiden Phänomene. Dementsprechend können Fieberkrämpfe in jungem Alter das normale Reifungsprogramm vom kortikalen Gewebe stören und nachfolgend zu einer erhöhten Bereitschaft desselben für das Auftreten epileptischer Anfälle führen.

Unsere Ergebnisse geben nicht an auf welche Mechanismen erhöhte epileptische Aktivität direkt und 4 Wochen nach der Hyperthermie zurückzuführen ist, deuten jedoch darauf hin, dass die klinischen Fieberkrämpfe einen akuten und chronischen Effekt auf die neuronale Erregbarkeit in den kleinen Ratten besitzen.

Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen von Fieberkrämpfen könnte dazu führen neue Strategien in der Prävention und Behandlung von Fieberkrämpfen zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Aicardi J (1994) Syndromic classification in the management of childhood epilepsy. *J Child Neurol.* 9 Suppl. 2: 14-18
2. Altemus KL, Almlil CR(1997) Neonatal hippocampal damage in rats: long term spatial Memory deficits and associations with magnitude of hippocampal damage. *Hippocampus*7: 403-415
3. Astrup J, Norberg K (1976) Potassium activity in cerebral cortex in rats during progressive severe hypoglycemia. *Brain Res.* 103: 418-423
4. Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure JG (1991) Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol.* 30: 589-96
5. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH et al. (2000) Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the alpha 1A subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience* 95: 639-645
6. 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

7. Baram TZ, Gerth A, Schultz L (1997) Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Dev Brain Res* 98: 265–270
8. Basarsky TA, Duffy SN, Andrew RD, MacVicar BA (1998) Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *J Neurosci.* 18: 7189-7199
9. Berger M, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A (2008) Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia* 28: 558–562
10. Berretta N, Jones RS (1996) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* 75:339-344
11. Branston NM, Strong AJ, 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
12. Bratz E (1899) Ammonshornbefunde bei Epileptikern. *Arch Psychiatr Nervenkr* 32:820-835.
13. Browne AT, Holmes GL (2001) Epilepsy. *N.Engl.J.Med.* 344: 1145-1151
14. Brazier MAB, Coceani F (1976) *Brain Dysfunction in Infantile Febrile Convulsions.* Raven, New York

15. Bures J, Buresova O, Krivanek J (1974) The Mechanisms and Applications of Leao's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity. Academic Press New York
16. Bures J, Buresova O, Krivanek J (1984) The meaning and significance of Leao's spreading depression. An. Acad. Brasil. Cienc 56: 386-400
17. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann K A (1996) Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging, J Cereb Blood Flow Metab 16: 1090-1099
18. Chebabo SR, Hester MA, Aitken PG, Somjen GG (1995) Hypotonic exposure enhances synaptic transmission and triggers spreading depression in rat hippocampal tissue slices. Brain Res. 695: 203-16
19. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1985) ILAE
20. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy Proposal for revised Classification of epilepsies and epileptic syndromes (1989) Epilepsia 30: 389
21. Czeh G, Somjen GG (1990) Hypoxic failure of synaptic transmission in the isolated spinal cord, and the effects of divalent cations. Brain Res. 527: 224-233

22. Dehbandi S, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A (2008) Cortical spreading depression modulates synaptic transmission of the rat lateral amygdala. *Eur J Neurosc.* 27: 2057-2065
23. Dietrich WD, Halley M, Alonso O, Globus MY, Busto R (1992) Intraventricular infusion of N-methyl-D-aspartat. 2. Acute neuronal consequences. *Acta Neuropathol.* 84: 630-637
24. Dreier JP, Korner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhaupl K.M, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-Larginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 978-990
25. Dreier JP, Sakowitz OW, Unterberg AW, Benndorf G, Einhaupl KM, Valdueza JM (2001) Migrainous aura starting several minutes after the onset of subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 57: 1344-1350
26. Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res.* 618: 190-195
27. Elger CE, Wiestler OD, Schramm J (1995) Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: clinical, radiological, and histopathological findings in 178 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 666-73

28. Glaser G (1982) Critical periods in brain development related to behaviour: the developing neurophysiology of self. In One child ed. J. Apley, C. Ounsted Spastics International Medical Publications. William Heinemann Medical Books: London. Clinics in Developmental Medicine 80: 54-74
29. Gold L, Back T, Arnold G, Dreier J, Einhaupl KM, Reuter U, Dirnagl U (1998) Cortical spreading depression-associated hyperemia in rats: involvement of serotonin. Brain Res 783: 188–193
30. Gorelova NA, Koroleva VI, Amemori T, Pavlik V Bures J (1987) Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 66: 440-447
31. Gorji A, Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. Brain 117:199-210
32. Gorji A, Scheller D, Tegtmeier F, Straub H, Köhling R, Speckmann E (2000) NiCl₂ and amiloride induce spreading depression in guinea pig slices. Cephalalgia 20: 740–747
33. Gorji A. (2001) Spreading depression: a review of the clinical relevance. Brain Res Brain Res Rev: 33-60

34. Gorji A, Scheller D, Straub H, Tegtmeier F, Ebnen A, Wolf P, Panneck HW, Opiel F, Speckmann EJ, Köhling R, Hohling J, Tuxhorn I (2001)
Spreading depression in neocortical human slices.
Brain Res 906: 74–83
35. Gorji A, Moddel G, Speckmann EJ (2003) Background potassium concentrations and epileptiform discharges. II. Involvement of calcium channels. Brain Res. 959: 149 -159
36. Gorji A, Speckmann EJ (2004) Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. Eur J Neurosci., 19, 3371-4
37. Gorji A, Zahn P, Pogatzki E, Speckmann EJ (2004) Spinal and cortical spreading depression enhance spinal cord activity. Neurobiol. Dis., 15: 70- 79
38. Grafstein B (1956) Mechanism of spreading cortical depression. J Neurophysiol 19: 154-71
39. Grafstein B (1963) Neuronal release of potassium during spreading depression. M.A.B. Brazier, Editor, Brain Function Vol 1: 87–124
40. Guedes RC, Amorim LF, Teodosio NR (1996) Effect of aging on cortical spreading depression. Braz J Med Biol Res 29: 1407–1412

41. Haghiri H, Kovacs S, Speckmann EJ, Zilles K, Gorji A (2009) Patterns of neurotransmitter receptor distributions following cortical spreading depression. *Neuroscience* 163: 1340-1352
42. Hamon B, Heinemann U (1987) An NMDA-receptor-independent excitatory action of partial reduction of extracellular (Mg⁺) in CA1-region of rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 75: 240-245
43. Hansen AJ, Zeuthen T (1981) Extracellular ion concentrations during spreading Depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 113: 437-445
44. Hansen AJ, Lauritzen M (1984) The role of spreading depression in acute brain disorders. *An.Acad.Bras.Cienc.* 56: 457-479
45. Hauser WA, Rich SS, Annegers JF, Anderson VE (1990) Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology* 40: 9 – 13
46. Heinemann U, Albrecht D, Hablitz JJ, Hamon B, Stanton PK (1987) Tierexperimentelle Befunde zur Epilepsiebildung in der Ontogenese. *Epilepsie* 87: 71-75
47. Herlitz G (1941) Studien über die sogenannten Initialen Fieberkrämpfe bei Kindern. *Acta Paediatr* 29: 110-113
48. Herreras O, Somjen GG (1993) Analysis of potential shifts associated with recurrent spreading depression and prolonged unstable spreading depression induced by microdialysis of elevated K⁺ in hippocampus of anesthetized rats. *Brain Res* 610: 283-9

49. Holtkamp M, Buchheim K, Siegmund H, Meierkord H (2003) Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro. *Neurobiol. Aging* 24 :345-353
50. Holtzman D, Obana K, Olson J (1981) Hyperthermie-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science* 213:1034-1036
51. IHCD,2004 The international Classification of Headache Disorders, 2nd edn. *Cephalalgie* 24: 1-160
52. Jafaria M, Rahimi S, Behnam F, Hosseine M, Haghiri H, Garji A (2010) The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. *Neuroscience* 2010.04.062
53. Jefferey KJ, Morris R (1993) Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. *Hippokampus* 3:133-140
54. Kager HW, Wadmann WJ, Somjen GG (2000) Simulated seizures and spreading depression in a neuron model incorporating intersitial space and ion concentration. *J Neurophysiol* 84: 495-512
55. Kandel ER , Schwarz JH (1985) Synapse formatio, trophic interactions between neurons, and the development of behavior. Elsevier, Amsterdam 743-770

56. Kang JQ (2006) Why does fever trigger febrile seizures? GABA-A receptor gamma2 subunit mutation associated with idiopathic generalized epilepsies have temperature-dependent trafficking deficiencies. *J Neurosci* 26: 2590-2597
57. Kimberlin DW (1998) Human herpesvirus 6 and 7: identification of newly recognized viral pathogens and their association with human disease. *Pediatr Infect Dis J* 17: 59-68
58. Kiviranta T, Tuomisto L, Airaksinen EM (1996) Osmolality and electrolytes in cerebro-spinal fluid and serum of febrile children. *Eur-J-Pediatr* 155:120-125
59. Koroleva VI, Bures J (1983) Cortical penicillin focus as a generator of repetitive spike triggered waves of spreading depression in rats. *Exp Brain Res* 51: 291-7
60. Köhling R (2007). Pathomechanismen der Epilepsie. *Z.Epileptol* 20: 1-14
61. Köhling R (2008) Entstehungsmechanismen der Epilepsie unkonventionelle Hypothesen. *Z Epileptol* 21: 171-179
62. Kraig RP, Nicholson C (1978) Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3: 1045–1059
63. Kraig RP, Kunkler PE (2002) Spreading depression: a teleological means for self-protection from brain ischemia. *Cerebrovascular Disease, 22nd Princeton Conference, 2002*: 142-157

64. Kreisman ND, Smith ML (1993) Potassium-induced changes in excitability in the hippocampal CA1 region of immature and adult rats. *Dev Brain Res* 76: 67–73
65. Kunkler PE, Kraig RP (1998) Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures. *J Neurosci* 18: 3416-25
66. Langenstein J, Stahnke N (1984) Epilepsien nach Fieberkrämpfen. *Nervenarzt* 55:173-178
67. Lashley KS (1941) Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiatry* 46: 331-339
68. Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C (1988) Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum, *Brain Res.* 475: 317-327
69. Lauritzen M, Hansen AJ (1992) The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 223-9
70. Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 118:119-210
71. Leao AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 7: 359-390
72. Leao AA, Morison RS (1945) Propagation of spreading cortical depression, *J Neurophysiol* 8:33-45

73. Leao AAP (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 10: 409–414
74. Lehmenkühler A, Zidek W, Staschen M, Caspers H (1981) Cortical pH and pCa in relation to DC potential shifts during spreading depression and asphyxiation. In: Sykova E., Hnik P., Vyklicky L. (eds) *Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues*. Plenum Press New York 225–229
75. Lennox-Buchthal MA (1973) *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 327
76. Löscher W, Ungemach FR, Kroker R. (2002) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren 5.Auflage*. Parey Buchverlag, Berlin
77. Luhmann HJ, Kral T (1997) Hypoxia-induced dysfunction in developing rat neocortex. *J Neurophysiol* 78: 1212-1221
78. Lurton D, Sundstrom L, Brana C, Bloch B, Rougier A (1997) Possible mechanisms inducing granule cell dispersion in humans with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26:351-361
79. Maren S, Fanselow MS (1997) Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal Hippokampus, or entorhinal produce anterograde deficits in contextual fear conditions in rats. *Neurobiol Learn Mem* 67: 142-149

80. Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes.
Brain 89: 499-530
81. Marranes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A (1988) Evidence for a role of the N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. Brain Res 457: 226-240
82. Marshall WH (1959) Spreading cortical depression of Leao. Physiol Rev 39: 239-279
83. Martins-Ferreira H, Ribeiro LJ (1995) Biphasic effects of gap junctional uncoupling agents on the propagation of retinal spreading depression. Braz J Med Biol Res 28: 991-995
84. Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C (2000) Perspectives on spreading depression. Brain Res Brain Res Rev 32: 215-34
85. Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE (1996) Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system, Brain Res. 740: 268-274
86. McLachlan RS Girvin JP (1994) Spreading depression of le~ao in rodent and human cortex. Brain Res 666: 133-136

87. Miller LA, Munoz DG, Finmore M (1993) Hippokampal sclerosis and human memory. Arch Neurol 50: 391-394
88. Millichap JG (1968) Febrile convulsion.
Macmillian, New York 1968
89. Minichom PE, Wallace SJ (1984) Febrile convulsions: electroencephalographic changes related to rectal temperature. Arch Dis Child 6: 147-152
90. Nedergaard M, Astrup J (1986) Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation, J Cereb.Blood Flow Metab 6 : 607-615
91. Nedergaard M Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. Brain Res 449: 395-398
92. Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells, Science 263 : 1768-1771
93. Nedergaard M, Cooper AJ, Goldman SA (1995) Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. J Neurobiol 28: 433-44
94. Nelson KB, Ellenberg JN (1976) Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures.
N-Engl-J-Med 295: 1029-1033

95. Nellson KB, Ellenberg JN (1978) Prognosis of children with febrile seizures. *Pediatrics* 61: 720-27
96. Nicholson C, Kraig R P (1981) The behavior of extracellular ions during spreading depression. Zeuthen T, The application of ion-selective microelectrodes. Elsevier/North-Holland Biomedical Pr. Amsterdam
97. Nicholson C (1993) Volume transmission and propagation of spreading depression, Lehmkuhler A, Grotemeyer KH, Tegtmeier F. *Migraine: basic mechanisms and treatment*. Urban und Schwarzenberg, München 293-308
98. Obrenovitch TP, Zilkha E, (1995) High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression. *J Neurophysiol* 73: 2107-2121
99. Oka H, Kako M, Matsushima M, Ando K. (1977) Traumatic spreading depression syndrome. Review of a particular type of head injury in 37 patients, *Brain* 100: 287-298
100. Paulson OB, Newman EA (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?, *Science* 237: 896-898
101. Petsche H, Rappelsberger P, Frey Z, Suchatzki BU (1973) The epileptogenic effect of ouabain (g-strophanthin). Its action on the EEG and cortical morphology *Epilepsia* 14: 243–260

102. Pomper JK, Haack S, Petzold GC, Buchheim K, Gabriel S, Hoffmann U, Heinemann U (2006) Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia, *J Neurophysiologie* 95: 355-68
103. Psarropoulou C, Avoli M (1992) CPP, an NMDA-receptor antagonist, blocks 4 aminopyridine-induced spreading depression episodes but not epileptiform activity in immature rat hippocampal slices *Neurosci Lett* 135: 139–143
104. Püst B, Aksu F (2000) Fieberkrämpfe, Harmloses Symptom oder ernsthafte Komplikation? *Pädiatrie hautnah* 12: 507-512
105. Rutter N, O`Callaghan MJ (1978) Hyponatremia in children with febrile convulsions. *Arch Dis Child* 53: 85-87
106. Scheller D, Heister U, Dengler K, Tegtmeier F (1991) Extracellular changes of aspartat and glutamate during generation and propagation of cortical spreading depression in rats, Olesen J, *Cerebral blood flow in migraine, tension-type headache and cluster headache*. Raven Press. New York
107. Siemes H, Bourgeois, Blaise FD (2001) *Anfälle und Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen*. Thieme Verlag Stuttgart, New York
108. Siemes H, Bourgeois FBD (2001) *Anfälle und Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen*. Thieme, Stuttgart-New York , ISBN 3-13-12703-4

109. Smith BN, Dudek FE (1996) Amino acid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 76: 1958–1967
110. Smith JM, Bradley DP, James MF, Huang CL-H (2006) Physiological studies of cortical spreading depression. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81: 457-481
111. Somjen GG, Aitken PG, Czeh GL, Herreras O, Jing J, Young JN (1992) Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 248–254
112. Sommer W (1880) Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr* 10: 631-675
113. Sramka M, Brozek G, Bures J, Nadvornik P (1977) Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. *Appl. Neurophysiol* 40: 48-61
114. Strong AJ, Venables GS, Gibson G (1983) The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG. *J Cereb. Blood Flow Metab* 3: 86-96
115. Sugaya E, Tokato M, Noda Y (1975) Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 38: 822-841

116. Tancredi V, Arcangelo GD, Zona C, Siniscalchi A, Avoli M (1992) Induction of epileptiform activity by temperature elevation in hippocampal slices from young rats: An in vitro model for febrile seizures? *Epilepsia* 33: 228-234
117. Tobiasz C, Nicholson C (1982) Tetrodotoxin resistant propagation and extracellular sodium changes during spreading depression in rat cerebellum. *Brain Res* 24: 329-33
118. Traynelis SF, Dingledine R (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 59: 259–276
119. Tsuboi T (1976) Polygenetic inheritance of epilepsy and febrile convulsions: analysis based on a computational model. *Br-J-Psychiatry*. 129:239-242
120. Van Harreveld A Stamm JS (1952) Vascular concomitants of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 1952. 15: 487-496
121. Van Harreveld A, Stamm JS (1953) Spreading cortical convulsions and depressions. *J Neurophysiol* 16: 352- 366
122. Van Harreveld A, Stamm JS (1955) Cortical responses to Metrazol and sensory stimulation in the rabbit. *EEG Clin Neurophysiol* 7: 363 -370
123. Van Harreveld A (1959) Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem* 3: 300-315

124. Van Harreveld A, Fifkova E (1970) Glutamate release from the retina during spreading depression. *J Neurobiol* 13-29
125. Wernsmann B, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A (2006) Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rathippocampal tissues. *Eu J Neurosci* 23: 1103–1110
126. Willette RN, Lysko PG, Sauermelch CF A (1994) comparison of (+)SK&F 10047 and MK-801 on cortical spreading depression. *Brain Res* 648: 347-51
127. Wolf P, Mayer Th, Specht U, Thorbecke R, Pfäffin M, Boenigk HE (Hrsg). *Praxisbuch Epilepsien*. Kohlhammer Verlag Stuttgart, 2
128. Wolf SM, Carr A, Davis DC (1977) The value of phenobarbital in the child who has had a single febrile seizure. *Pediatrics* 59: 378-385
129. Wu J, Fisher RS (2000) Hyperthermic Spreading Depression in the Immature Rat Hippocampal Slice. *JNeurophysiol* 84: 1355-1360

7. Curriculum Vitae

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: A: Aristides Azevedo Pacheco Leão. Journal of Neurophysiology, 1944, B: Änderungen physiologischer Parameter während einer SD.

Leao's originale Illustration einer SD von 1944.

Abb. 1-2: Darstellung einer DC-Potentialwelle nach Injektion von KCl (3M) am menschlichem Neocortex.

Abb. 2-1: Darstellung der Messmethode für eine SD.

Abb. 2-2: Darstellung der Messmethode für eine EFP.

Abb. 3-1: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte (Kontrollversuch). A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen. B: Propagation von SD.

Abb. 3-2: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte (Kontrollversuch vom chronischen Typ). A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Kontroll-Gruppen. FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex. B: Propagation von SD.

Abb. 3-3: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten der Kontroll-Gruppen I-III (CTRL, ohne Hyperthermiebehandlung). A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Repetitionsrate, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-4: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten der Kontroll-Gruppen Ic-IIIc (CTRLc, ohne Hyperthermiebehandlung, entsprechen dem Alter von Ratten der chronischen Hyperthermie). A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Repetitionsrate, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-5: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der akuten Hyperthermie. A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen. FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex. B: Propagation von SD.

Abb. 3-6: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der chronischen Hyperthermie. A: Simultane Originalaufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen. FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex. B: Propagation von SD.

Abb. 3-7: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der akuten Hyperthermie, Gruppen I-III. A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Repetitionsrate, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-8: Wirkung von Niedrig-NaCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der chronischen Hyperthermie, Gruppen Ic-IIIc. A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Superfusion von Low NaCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Repetitionsrate, Amplitude (in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-9: Graphische Darstellung der SD-Parameter: die Mittelwerte der Dauer und Amplitude nach der Superfusion von Low NaCl-Lösung in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Gruppen I-III: Kontrolle (CTRL), akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie, Kontrolle (CTRLc entspricht dem Alter von Tieren der chronischen Hyperthermie).

Abb. 3-10: Wirkung von Low NaCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Gruppen I-III: Kontrolle (CTRL), akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie, Kontrolle (CTRLc entspricht dem Alter von Tieren der chronischen Hyperthermie). A: Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %. B: Durchschnittliche SD-Anzahl pro 1 Schnittpräparat.

Abb. 3-11: Wirkung von KCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der akuten Hyperthermie. A: Simultane Original- aufzeichnung von DC-Verschiebungen in 3 Gruppen. FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex. B: Propagation von SD.

Abb. 3-12: Wirkung von KCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratte nach der chronischen Hyperthermie. A: Simultane Originalaufzeichnung von DS-Verschiebungen in 3 Gruppen. FP 1 = Entorhinalcortex, FP 2 = Hippocampus, FP 3 = Amygdala, FP 4 = Temporalcortex. B: Propagation von SD.

Abb. 3-13: Wirkung von 2 M KCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der akuten Hyperthermie, Gruppen I-III. A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Applikation von KCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Frequenz, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-14: Wirkung von 2 M KCl-Lösung auf epileptiforme Feldpotentiale (EFP) in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten nach der chronischen Hyperthermie, Gruppen I-III. A: Originalaufzeichnung: Auslösung der EFP durch Applikation von KCl-Lösung. B: Graphische Darstellung der EFP-Parameter: Repetitionsrate, Amplitude in mV und Dauer in sec pro 5 min.

Abb. 3-15: Graphische Darstellung der SD-Parameter: Die Mittelwerte der Dauer und Amplitude nach der lokalen Applikation von 2M KCl-Lösung an Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Gruppen I-III: akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie.

Abb. 3-16: Wirkung von KCl-Lösung auf SD in Amygdala-Hippocampus-Neocortex-Schnittpräparaten, Ratten. Gruppen I-III: akute Hyperthermie und chronische Hyperthermie. A: Verhältnis von Hirnschnittpräparaten, bei denen SD registriert wurden, zu den gesamten Schnitten pro Gruppe in %. B: Durchschnittliche SD-Anzahl pro 1 Schnittpräparat.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

Tab. 3-1: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Amygdala, Neocortex) von der Kontrollversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitte, SD-Anzahl, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

Tab. 3-2: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Amygdala, Neocortex) von der Kontrollversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden.

Tab. 3-3: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten, SD-Anzahl, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

Tab. 3-4: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden.

Tab. 3-5: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende SD-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten, Gesamt-SD-Anzahl, Amplitude in mV, Dauer in Minuten, Beginn in Minuten.

Tab. 3-6: Auswertung der Kombi-Präparaten (Hippocampus, Laterale Amygdala, Neocortex) von der akuten und chronischen Hyperthermieversuchsreihe in allen Altersgruppen. Folgende EFP-Parameter wurden in der Tabelle dargestellt: Anzahl der Hirnschnitten, EFP-Frequenz pro 5 min, Latenzzeit in Minuten, Amplitude in mV, Dauer in Sekunden.

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung
AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AS: Aminosäure
ATPase: Adenosintri-phosphatase
Bzw: beziehungsweise
CGRP: calcitonin gene-related peptide
CSD: Corticale Spreading Depression
CTRL: Kontrollversuche
DC: Direct current
EC: entorhinaler Cortex
EEG: Elektroenzephalografie
EFP: Epileptiforme Feldpotentiale
FP: Feldpotential
GABA: Gamma-aminobutyric acid
HT: Hyperthermie
l: Liter
LA: laterale Amygdala
Lsg: Lösung
min: Minute
ml: Milliliter
mmol: Millimol
mV: Millivolt
NMDA: N-Methyl-D-Aspartat
p: Tag
SD: Spreading Depression
SEM: mittlerer Fehler des Mittelwertes
Tab.: Tabelle
TC: temporaler Cortex
Y: Yamamoto
 μ m: Mikrometer
u.a.: unter anderem

9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Ali Gorji für die Überlassung des Dissertationsthemas, und hervorragende und herzliche Betreuung der vorliegenden Arbeit. Durch sein Engagement bei der Einführung in wissenschaftliches Arbeiten hat er wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank auch an das gesamte Institut für Physiologie I für das angenehme Arbeitsklima. Mein Dank gilt den Mitarbeitern der elektrischen und feinmechanischen Werkstätten des Institutes, die mir bei technischen Problemen immer zur Seite standen.

Ganz herzlich danke ich Frau Herrenpoth für ihr außerordentliches Engagement bei der Einweisung in den Versuchsplatz sowie die qualifizierte technische Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit. Des weiteren danke ich Frau Winkelhüs für die Unterstützung in allen Fragen der Computerprogrammen.

An dieser Stelle möchte ich meinem lieben Mann, meinen Eltern, meiner Schwester meinen Dank für ihre familiäre Rückhalt, für ihre bedingungslose Unterstützung zur jeder Zeit, durch welche die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurde, aussprechen.

9.4 Genehmigung der *in vivo*-Versuche



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle Epilepsie-
forschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude:

Domplatz 1-3

Telefon: (0251) 411-0

Durchwahl: 2110

Telefax: 2115

Raum: 431

Auskunft erteilt:

Frau Möllers

E-Mail:

irmgard.moellers@bezreg-muenster

Aktenzeichen:

50.0835.1.0 (G 79/2002)

19. Dez. 2002

Tierschutz;

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 10.10.2002, hier eingegangen am 06.11.2002

Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Professor Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Experimentelle Epilepsieforschung“. (10 Teilprojekte gem. Antrag)

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreter sind:

Herr

Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle

Epilepsieforschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Frau

Prof. Dr. rer. nat. Heidrun Straub

Institut für Physiologie

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de

zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Landeskasse Münster:

Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis

