

Dr. med. Sebastian Bauer
Klinik für Neurologie, Standort Marburg
Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH und
Philipps-Universität Marburg
Baldingerstraße
35033 Marburg

**Erfahrungsbericht zum Projekt
„Etablierung des Tractus-perforans-Modells der Temporallappenepilepsie an
der Philipps-Universität Marburg“**

gefördert durch das
Stipendium für junge Wissenschaftler der DGKN

Hintergrund

Mit einer Lebenszeitprävalenz von 3% gehören Epilepsien zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen (Forsgren et al. 2005). Dabei sind etwa 60% der Epilepsien fokale Epilepsien, deren häufigsten Vertreter die mesiale Temporallappenepilepsie (TLE) aufgrund einer Hippokampusklerose (HS) darstellt. Hierbei handelt es sich um eine atrophische Gliose des Hippokampus und perihippokampaler Strukturen, deren Ätiologie bislang nicht geklärt ist (Sloviter 2005).

Bei symptomatischen fokalen Epilepsien wie der mesialen Temporallappenepilepsie ist regelhaft eine Latenzperiode zwischen anzunehmender Schädigung und Ausbruch der Epilepsie zu verzeichnen, in der epileptogene strukturelle und funktionelle Umbauvorgänge stattfinden (DeLorenzo und Sun 2006). Die Mechanismen dieser Veränderungen sind bislang nicht detailliert bekannt. Entsprechend ist eine pharmakologische kausale Therapie der Epilepsien nicht durchführbar. Die medikamentöse Behandlung erfolgt ausschließlich symptomatisch durch anfallsunterdrückende Antikonvulsiva mit wechselndem Erfolg. So werden ca. 90 % der Patienten mit Temporallappenepilepsie und begleitender Hippokampusklerose durch eine medikamentöse Therapie nicht anfallsfrei (Semah et al. 1998).

Tiermodelle der Temporallappenepilepsie

Tiermodelle der Temporallappenepilepsie sind insbesondere deshalb erforderlich, weil eine kausale Therapie nur während der Phase der Epileptogenese ansetzen kann. Diese Phase bleibt aber beim Menschen mangels Symptomen zwangsläufig unerkannt. Im Tiermodell kann eine Epilepsie durch exogene Faktoren ausgelöst und

die Wirkung verschiedener Therapien sowohl während der Epileptogenese als auch nach deren Abschluss bei Einsetzen der ersten spontanen Anfälle untersucht werden.

Als Tiermodelle der Temporallappenepilepsie werden (z. B. bei Ratten) am häufigsten *chemokonvulsive Modelle* (Pilocarpin, Kainat), das *Kindling-Modell* und *elektrische Stimulationsmodelle* verwendet (für eine Übersicht siehe Pitkänen, Schwartzkroin & Moshe, *Models of Seizures and Epilepsy*, Academic Press, 2005).

Die *chemokonvulsiven Modelle* haben den Nachteil einer sehr starken Belastung für die Versuchstiere mit hoher Mortalität. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Sloviter (Tucson, Arizona, USA) zeigen, dass es nach intraperitonealer Kainatinjektion zu ausgedehnten kortikalen Schädigungen kommt, die keineswegs auf den Temporallappen beschränkt sind (Harvey und Sloviter, 2005). Ein hippocampaler Anfallsursprung wurde bei diesen Modellen nicht nachgewiesen. Diese Nachteile deuten auf eine sehr eingeschränkte Validität der chemokonvulsiven Modelle hin. Der häufige Einsatz lässt sich vermutlich am ehesten dadurch erklären, dass das Modell für den Experimentator einfach zu verwirklichen ist, da nur eine einmalige systemische Injektion der epileptogenen Substanz erforderlich ist.

Im *Kindling-Modell* wird eine Stimulationselektrode beispielsweise in die Amygdala eingebracht und das Versuchstier hierüber mit ansteigender Stromstärke über mehrer Tage oder Wochen regelmäßig stimuliert, bis unter Stimulation epileptische Anfälle auftreten. Die Anfallsschwelle sinkt während dieser Prozedur. Einige Nachteile der chemokonvulsiven Modelle lassen sich hierdurch vermeiden: Die Mortalität ist deutlich geringer, der Anfallsursprung ist eindeutig temporal lokalisiert. Nachteilig ist hingegen, dass in der Regel keine spontanen, sondern eben nur stimulationsgetriggerte Anfälle auftreten. Somit ist auch hier die Vergleichbarkeit mit der TLE beim Menschen mit spontanen Anfällen eingeschränkt.

Das derzeit valideste Tiermodell der TLE besteht in der *elektrischen Stimulation des Tractus perforans* der Ratte, der den entorhinalen Kortex mit dem Gyrus dentatus des Hippokampus verbindet. Durch geeignete Stimulationsparameter lässt sich ein Status epilepticus auslösen, der die eigentliche Stimulation überdauert. Wird der Status epilepticus nach mehreren Stunden medikamentös durchbrochen, entwickelt das Versuchstier nach einiger Zeit (Tage bis Wochen) spontane Anfälle temporalen Ursprungs. Histologisch treten zugleich Veränderungen auf, die der Hippokampus-sklerose beim Menschen gleichen. Dieses Modell ist also hervorragend dazu

geeignet, den Prozess der Epileptogenese auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu untersuchen. Nachteile der Methode sind der relativ hohe Aufwand, da eine exakte Positionierung der Stimulations- und Ableiteelektroden im Tractus perforans bzw. Gyrus dentatus mittels stereotaktischer Chirurgie erforderlich ist, und die Tatsache, dass aufgrund der ausgedehnten Verbindungen der beiden Hippokampi regelmäßig eine bilaterale TLE auftritt, die beim Menschen eher selten anzutreffen ist. Nichtsdestoweniger ist das Modell den anderen TLE-Modellen an Validität überlegen und geht bei korrekter Durchführung mit einer geringen Mortalität einher.

Ziel und Durchführung des geförderten Projektes

Ziel des geplanten Projektes war es, das Tractus-perforans-Modell der TLE zu erlernen und an der Universität Marburg zu etablieren. Hierzu absolvierte der Verfasser einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt am University College London im Labor von Prof. Matthew Walker (Institute of Clinical and Experimental Epileptology), wo das Tractus-perforans-Modell der TLE seit vielen Jahren etabliert ist (z. B. Holtkamp et al., 2001; Fisher et al, 2004; Gibbs et al., 2006).

Projektlauf: Um Tierversuche in Großbritannien durchführen zu können, war zunächst vorbereitend der Besuch eines dreitägigen Kurses inkl. Abschlussprüfungen zum Erhalt der Personal Licence nach dem ANIMALS SCIENTIFIC PROCEDURES ACT 1986 erforderlich. Dieser Kurs wurde im April 2010 am University College London erfolgreich absolviert.

Der eigentliche Forschungsaufenthalt fand vom 1.10.2010 – 31.12.2010 statt. In einem ersten Schritt wurde ich von einer Postdoktorandin mit mehrjähriger Erfahrung bei der Durchführung der Operationen angeleitet. Nach ca. 2 Wochen war die selbständige Durchführung der Elektrodenimplantation möglich, so dass genügend Zeit zur Durchführung eines unabhängigen Forschungsprojektes verblieb. Als Thema wurde der Einfluss von Neuropeptid Y (NPY) auf die Neurogenese nach Status epilepticus (ausgelöst durch Tractus-perforans-Stimulation) ausgewählt, da NPY sowohl im Tiermodell antikonvulsiv wirkt (Mazarati und Wasterlain, 2002) als auch nach intraventrikulärer Injektion zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl hippocampaler Neurone führt (Decressac et al., 2010). Hierzu wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Stereotaktische Implantation einer Stimulationselektrode im rechtsseitigen Tractus perforans, einer Ableiteelektrode im rechten Gyrus dentatus und einer

Erdungselektrode (Kalottenschraube). Durch kurze Stimulationen des Tractus perforans während der Operation und Messung der zum Gyrus dentatus fortgeleiteten Potentiale (Population Spikes) lässt sich hierbei die Elektrodenlage optimieren. In der gleichen Sitzung stereotaktische Implantation einer Kanüle in das rechte Seitenventrikelvorderhorn.

2. Nach einer Erholungszeit von 1 Woche Stimulation des Tractus perforans mit einer Stromstärke von ca. 3 mA (individuelle Anpassung je nach Amplitude der Population Spikes), einer Dauer von 50 μ s und einer Frequenz von 20 Hz für 2 Stunden. Hierdurch lässt sich ein Status epilepticus auslösen, der nach Ende der elektrischen Stimulation fort dauert (self sustaining status epilepticus, SSSE). Nach weiteren 3 Stunden wurde der Status durch intraperitoneale Injektion von Diazepam unterbrochen.
3. 72 h später Injektion von entweder 0,01 μ g NPY oder sNPY (=scrambled NPY: ein Peptid, das die gleichen Aminosäuren enthält wie NPY, aber in einer anderen Sequenz, so dass es funktionell unwirksam ist; dient als Kontrollexperiment) über die implantierte Kanüle in den lateralen Seitenventrikel.
4. 44 h später Injektion von BrdU (Bromdesoxyuridin, 100 mg/kg KG, intraperitoneal). BrdU wird von proliferierenden Zellen aufgenommen und kann mittels spezifischer Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden.
5. Weitere 4 Stunden später: Transkardiale Perfusion mit 0,9 % Kochsalzlösung, sofort danach Perfusionsfixierung mit 4 % Paraformaldehydlösung, Entnahme der Hirne.
6. Entwässern der Hirne in 30% Saccharoselösung für 3 Tage.
7. Einbetten der Hirne in OCT-Gefriermedium, Einfrieren bei -80 °C.

Insgesamt werden die Hirne von 16 Tieren ausgewertet:

| | |
|------------------------------------|----------------------------|
| Stimulation, NPY-Injektion: | 4 Tiere |
| Keine Stimulation, NPY-Injektion: | 4 Tiere (Kontrollgruppe 1) |
| Stimulation, sNPY-Injektion: | 4 Tiere (Kontrollgruppe 2) |
| Keine Stimulation, sNPY-Injektion: | 4 Tiere (Kontrollgruppe 3) |

Zur histologischen Auswertung wurden die Hirne an das Labor von Prof. William Gray, Institute of Neurosurgery der Universität Southampton (UK) geschickt, wo

langjährige Expertise im immunhistochemischen Nachweis von Neuroneogenese besteht. Zum Berichtszeitpunkt war die Auswertung noch nicht abgeschlossen, über die Ergebnisse des Projektes wird gesondert berichtet.

Fazit

Ziel des Forschungsaufenthaltes war es, die praktische Durchführung der stereotaktischen Elektrodenimplantation zur Tractus-perforans-Stimulation zu erlernen, um dieses valide TLE-Modell in der AG Epileptologie (Leiter: Prof. Dr. F. Rosenow) an der Philipps-Universität Marburg (Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel) zu etablieren. Das Ziel konnte vollständig erreicht werden. Innerhalb des ca. 3monatigen Aufenthaltes hatte ich Gelegenheit, knapp 50 Ratten selbständig zu operieren. Hierdurch war es möglich, die notwendige Routine für die zukünftige eigenständige Anwendung zu gewinnen.

Perspektiven

Die für die Operation und Stimulation erforderliche Laborausstattung ist in Marburg nunmehr vollständig vorhanden.

Folgende konkrete Projekte, die auf dem Tractus-perforans-Modell der TLE beruhen, werden derzeit durchgeführt:

- Automatische Anfallsdetektion und -unterbrechung durch elektrische Fornixstimulation
- Untersuchung der Beteiligung immunologischer Mechanismen an der Epileptogenese.

Abschließend möchte ich mich bei den Verantwortlichen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und funktionelle Bildgebung bedanken, dass mir das Stipendium für junge Wissenschaftler gewährt wurde. Die erlernte Methode bildet für mich die essentielle Grundlage für die weitere experimentelle Epilepsieforschung.

Literatur beim Verfasser

Dr. Sebastian Bauer

Marburg, 18.3.2011