

## 6. Zusammenfassung

Das Kindling-Modell für komplex-partielle Epilepsien des Menschen basiert auf der progressiven Entwicklung von Anfällen verbunden mit epilepsietypischen elektroenzephalographischen Mustern aufgrund von wiederholten *zunächst subkonvulsiven* elektrischen Stimulationen des limbischen Systems. Einmal manifestiert ist dieses Phänomen über Monate persistent.

Weibliche Wistar-Ratten (n=10) wurden über bipolare Tiefenelektroden, die in die basolaterale Amygdala implantiert wurden, einmal täglich mit 500  $\mu$ A (bei 50 Hz, monophasischem Rechteckimpuls von 1ms) für die Zeit 1s stimuliert, bis sie 10 sekundär generalisierte klonische Konvulsionen aufwiesen. Eine Stimulationspause von 40 Tagen wurde gewählt, um transiente, stimulationsbedingte Effekte ausschließen zu können. Die *in vivo* fixierten Gehirne wurden über einen im Rahmen dieser Arbeit in dieser Arbeitsgruppe zu etablierenden immunhistochemischen Nachweis inhibitorischer GABAerger Neurone mit Hilfe eines neuen monoklonalen anti-GABA-Antikörpers (clone GB-69) markiert. Eine Quantifizierung dieser wichtigsten *inhibitorischen* Neuronenpopulation, die grundlegend an der Pathogenese der komplex-partiellen Epilepsien beteiligt sein soll, wurde in verschiedenen Hirngebieten, für die Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß sie in der Genese bedeutsam sind, durchgeführt. Die gekindelte Versuchsgruppe wurde mit naiven Kontrolltieren (n=10) sowie Elektroden-implantierten, schein-gekindelten Tieren (n=6) verglichen.

Im Bereich des stimulierten Kerngebietes der basolateralen Amygdala traten bei gekindelten Tieren deutliche Verluste GABA-immunreaktiver (IR) Neurone von  $36 \pm 6$  % auf. Die Verluste waren ipsi- und contralateral zur Stimulationsseite ähnlich stark ausgeprägt. Im Bereich des piriformen Cortex, für den es Anhaltspunkte dafür gibt, daß er eine Generator- bzw. Verstärkerfunktion in der Pathogenese des Kindling-Phänomens spielt, zeigten sich differenziertere Veränderungen. In dem untersuchten Bereich zwischen +1.5 mm anterior zu Bregma und -3.1 mm posterior erwies sich eine Zone ipsilateral zur Stimulationsseite zwischen +0.2 bis -0.8 mm posterior von Bregma bei gekindelten Tieren im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen als signifikant verändert. Die Verluste GABA-IR Neurone betragen hier zwischen 17 und 26 %. Innerhalb des anterioren Hippokampus konnten in den Bereichen von CA1, CA3 und Gyrus dentatus keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Anzahl GABA-IR Neurone festgestellt werden. In der Elektroden-implantierten, aber nicht gekindelten Gruppe zur Überprüfung möglicher Elektrodenimplantat-abhängiger Effekte, zeigte sich im Vergleich zu naiven Kontrolltieren keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Zahl GABA-IR Neurone in allen drei untersuchten Hirnarealen.

Schlußfolgerungen dieser Untersuchung sind zunächst, daß Neuronenschäden spezifisch mit dem Kindling-Phänomen in Zusammenhang stehen und nicht auf Implantat-abhängige Effekte zurückzuführen sind. Neuronenverluste entstehen im Kerngebiet der Stimulationsseite, aber auch in der gleichen Struktur contralateral sowie in einem eng umschriebenen Gebiet innerhalb des ipsilateralen piriformen Cortex, der bereits zuvor als Kindling-sensitive Struktur beschrieben wurde. Somit wurde ein weiteres Indiz dafür erbracht, daß epileptische Anfälle mit Neuronenschäden einhergehen können und der piriforme Cortex am Phänomen des Amygdala-Kindlings beteiligt sein muß. Mit den vorliegenden Untersuchungen wird die Kontroverse über die Existenz von Neuronenschäden in Zusammenhang mit Epilepsien und die Frage, ob sie Ursache oder Folge des Anfallsleiden sind, neu beleuchtet. Die Ergebnisse geben Anhaltspunkte dafür, daß für die Ausbreitung paroxysmaler Aktivität im ZNS eine lokale Schädigung inhibitorischer Regelsysteme notwendig sein könnte. Aufgrund der vorliegenden Daten sowie der Literatur wäre vorstellbar, daß in der Genese des Kindling-Phänomens ein Verlust der lokalen Inhibition im Bereich der Amygdala zu einer Ausbreitung der epileptischen Aktivität in den piriformen Cortex führt, der unter pathologischer Veränderung diesen Input verstärkt und in andere Hirnareale insb. motorische Zentren projiziert. Bei der Ratte scheint im Amygdala-Kindling weniger der Hippokampus in die Epileptogenese involviert zu sein, als vielmehr die Amygdala selbst sowie der piriforme, olfaktorische Cortex.

# **Immunohistochemical study on the influence of amygdala-kindling on GABA-immunoreactive neurons in several brain regions of the rat under special consideration of the piriform cortex**

**Holger Lehmann**

The kindling-model of complex-partial epilepsies is based on the progressive development of seizures combined with characteristic electroencephalographic patterns induced by repeated initially subconvulsive electrical stimulation of limbic structures. Once established the phenomenon persists for months.

Female Wistar rats (n=10) were stimulated via bipolare electrodes, which were implanted into the basolateral nucleus of the amygdala, once daily by a monophasic square wave pulse (500 $\mu$ A, 50Hz, 1ms) for the duration of 1s until they elicited 10 secondarily generalized clonic seizures. An unstimulated interval of 40 days was chosen to avoid transient effects related to the stimulation process. The in-vivo fixed brains were studied histologically by an immunocytochemical staining of GABA-immunoreactive neurons; establishing this approach with a new monoclonal anti-GABA-antibody was part of this work. Quantification of this important inhibitory neuron typ, which is supposed to be involved into the basic mechanisms of complex-partial epilepsies, was performed in several brain regions, which are suspected to play a crucial role in the origin of the kindling-phenomenon. Immunhistochemical data were obtained from kindled rats were compared with an electrode-implanted sham-kindled group and with naive controls.

In the area of the stimulated nucleus of the basolateral amygdala significant loss of GABA-immunoreactive (IR) neurons was observed in kindled rats, which ranged about  $36 \pm 6$  %. The extent of cell loss was similar ipsi- and contralateral to the stimulation side. In the area of the piriform cortex, which is thought to have the function of a generator or amplifier in the genesis of kindling, more discrete changes were observed. In the analyzed area of +1.5 mm anterior to bregma to -3.1 mm posterior only in a distinct zone ipsilateral to the stimulation side between +0.2 to -0.8 mm posterior from bregma GABA-IR neurons were significantly reduced in the kindling group compared to shams or naive controls. The loss of GABA-IR ranged between 17 to 26 %. Within the anterior hippocampus no significant changes were observed in the analyzed zones of CA1, CA3 and dentate gyrus. The electrode-implanted, sham-kindled rats showed no changes in the number of GABA-IR neurons in the examined brain sites.

The results of this study lead to the conclusion that at first neuronal damage is specifically related to the kindling phenomenon and is not an effect based on electrode implantation.

Second, damage of GABA-IR neurons develops in the nucleus of the stimulation site, but likewise in the same structure contralateral and in a distinct area of the posterior piriform cortex which has been described to be sensitive to kindling before. Therefore the present data support the view that epileptic seizures go along with neuronal damage and that the piriform cortex is involved to the phenomenon of amygdala-kindling. The study further offers new insights into the controversy whether neuronal damages are the cause or the result of epileptic seizures. The spread of paroxysmal activity in the CNS eventually requires initially a loss of local inhibitory function in the focus. Based on data of this study and literature it would be imaginable, that in the genesis of the kindling-phenomenon a loss of local inhibition in the stimulated amygdala leads to a spread of epileptogenic activity into the piriform cortex which therefore under pathological alterations amplifies its input and projects it into other areas of the brain especially motor centres. In the development of epilepsy in amygdala kindling it seems that the hippocampus is less involved than the amygdala itself and the piriform olfactory cortex.