Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Etablierung von zwei chronischen Epilepsiemodellen und Detektion von spontan auftretenden Anfällen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von

Maike Glien

aus Hameln

Hannover 2002

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. W. Löscher

1. Gutachter: Univ.-Prof. W. Löscher

2. Gutachter: Univ.-Prof. S. Steinlechner

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2002

Meinen Eltern
und meiner Großmutter
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 11

2. ÜBERSICHT 14

2.1 EPILEPSIEN 14

2.2 TIERMODELLE 18

2.2.1 Anfallsmodelle 19

2.2.2 Genetische Epilepsiemodelle 20

2.2.3 Chemisch induzierte Epilepsiemodelle 21

2.2.3.1 Kainsäure-Modell 22

2.2.3.2 Pilocarpin-Modell 24

2.2.3.3 Lithium-Pilocarpin-Modell 28

2.2.4 Elektrisch induzierte Epilepsiemodelle 29

2.3 DETEKTION SPONTANER ANFÄLLE 32

2.4 LEVETIRACETAM 34

2.5 FRAGESTELLUNG 35

3. MATERIAL UND METHODEN 37

3.1 MATERIAL 37

3.1.1 Versuchstiere 37

3.1.2 Verwendete Substanzen 38

3.1.3 Material und Geräte 39

3.2 METHODIK 40

3.2.1 Krampfparameter 40

3.2.2 Lithium-Pilocarpin-Modell 41

3.2.2.1 Induktion und Abbruch des Status epilepticus 41

3.2.2.2 Detektion von spontan auftretenden Anfällen: Beschleunigungssensoren und Videoaufzeichnungen 43

3.2.2.3 Pharmakologische Untersuchung – Levetiracetam 45

3.2.2.3.1 Auswahl der Tiere und Versuchsdesign 45

3.2.2.3.2 Vorbereitung und Implantation der osmotischen Minipumpen 46

3.2.2.3.3 Videoüberwachung während Behandlungs- und Vehikelphasen 48

3.2.3 Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala 49

3.2.3.1 Elektrodenimplantation 49

3.2.3.2 Elektrische Induktion eines Status epilepticus 52
3.2.3.3 Detektion von spontan auftretenden Anfällen: EEG- und Videoaufzeichnungen 54
3.2.3.4 Pharmakologische Untersuchung – Levetiracetam 55
3.2.3.4.1 Auswahl der Tiere und Versuchsdesign 56
3.2.3.4.2 Vorbereitung und Implantation der osmotischen Minipumpen 57
3.2.3.4.3 EEG- und Videoüberwachung 58
3.2.3.5 Histologische Aufarbeitung und Bestimmung der Elektrodenlokalisation 58
3.2.4 Statistik 60

4. ERGEBNISSE 63

4.1 DETEKTION SPONTAN AUFTRETENDER ANFÄLLE 63
4.1.1 Beschleunigungssensoren 63
4.1.1.1 Aufzeichnung normaler Verhaltensweisen 64
4.1.1.2 Aufzeichnung epileptischer Anfälle 68
4.1.2 EEG-Aufzeichnungen 73
4.2 ERSTELLUNG DES LITHIUM-PILOCARPIN-MODELLS 77
4.2.1 Status epilepticus 77
4.2.1.1 Induktion und Abbruch des Status epilepticus 77
4.2.1.2 Mortalität 81
4.2.1.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus 82
4.2.2 Spontane Anfälle 84
4.2.2.1 Überwachungsaufwand 84
4.2.2.2 Auftreten und Frequenz der spontanen Anfälle 85
4.3 ERSTELLUNG DES MODELLS DER ELEKTRISCHEN STIMULATION DER BASOLATERALEN AMYGDALA 89
4.3.1 Status epilepticus 89
4.3.1.1 Induktion eines Status epilepticus 89
4.3.1.2 Mortalität 97
4.3.1.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus 98
4.3.2 Spontane Anfälle 98
4.3.2.1 Überwachungsaufwand 98
4.3.2.2 Auftreten und Frequenz der spontanen Anfälle 99
4.4 VERGLEICH BEIDER EPILEPSIEMODELLE 105

4.5 UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON LEVETIRACETAM IM LITHIUM-PILOCARPIN-MODELL 107
4.5.1 Dosierungen und Blutplasmaspiegel von Levetiracetam 107
4.5.2 Anfälle während der Predrug, Drug und Postdrug Phase 109
4.6 UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON LEVETIRACETAM IM MODELL DER ELEKTRISCHEN STIMULATION DER BASOLATERALEN AMYGDALA 114
4.6.1 Dosierungen und Blutplasmaspiegel von Levetiracetam 114
4.6.2 Anfälle während der Behandlungs- und Kontrollphasen 116

5. DISKUSSION 122

5.1 DETEKTION SPONTAN AUFTRETENDER ANFÄLLE 122
5.2 INDUZIERTE EPILEPSIEMODELLE 125
5.2.1 Lithium-Pilocarpin-Modell 127
5.2.2 Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala 135
5.2.3 Vergleich beider Epilepsiemodelle 142
5.3 PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN IN EPILEPSIEMODELLEN 146
5.3.1 Wirkung von Levetiracetam im Lithium-Pilocarpin-Modell 148
5.3.2 Wirkung von Levetiracetam im Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala 151
5.4 AUSBLICK 156

6. ZUSAMMENFASSUNG 158

7. SUMMARY 160

8. LITERATURVERZEICHNIS 162

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BLA	basolaterale Amygdala
d.h.	das heißt
EEG	Elektroenzephalogramm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
g	Gramm
gen.	generalisiert
h	Stunde
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
k.o.	knockout
LEV	Levetiracetam
M	Molar
max.	maximal
meq	Milliäquimolar
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
min.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
µA	Mikroampère
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
PILO	Pilocarpin
s.c.	subkutan
SD	Sprague-Dawley
SE	Status epilepticus
sec	Sekunde
SSSE	self sustained status epilepticus (selbsterhaltender Status epilepticus)
St.D.	standard deviation (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
Wo	Woche

1. EINLEITUNG

Der Begriff Epilepsie bezeichnet kein einheitliches Krankheitsbild, sondern steht für eine heterogene Gruppe von Syndromen, die sich bezüglich ihrer Ätiologie, Symptomatik und Prognose unterscheiden können. Gemeinsames Merkmal aller Epilepsien ist die klinische Manifestation von wiederholt und spontan auftretenden epileptischen Anfällen. Das Bewußtsein des Patienten kann während eines Anfalls gestört sein. Basierend auf dem Vorschlag der COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (1989) erfolgt die Klassifikation der Anfälle nach der Lokalisation der epileptischen Aktivität im Gehirn. Den Anfällen liegt eine akute, exzessive Entladung bestimmter Neuronengruppen zu Grunde. Die pathophysiologischen Ursachen und Folgen dieser exzessiven Entladungen von Neuronen sind weitgehend ungeklärt.

Epilepsien gehören zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des Menschen (MATTHES u. SCHNEBLE 1992). Mit einer Prävalenz von 0,5 – 1 % sind weltweit etwa 50 Mio. Menschen hiervon betroffen. Epilepsien treten bei Hunden und Katzen mit einer dem Menschen vergleichbaren Häufigkeit auf (LÖSCHER et al. 1985). In der Veterinärmedizin sind Epilepsien zudem die einzigen chronischen neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die behandelt werden.

Bei symptomatischen Epilepsien steht therapeutisch die Beseitigung der Ursache im Vordergrund. Wenn eine ursächliche Behandlung nicht möglich ist, wird in der Regel eine Langzeittherapie mit Antikonvulsiva eingeleitet. Antikonvulsiva sind Substanzen, die das Auftreten epileptischer Anfälle unterdrücken. Sie wirken rein symptomatisch, ohne die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu beeinflussen. Dagegen bezeichnet der häufig synonym verwendete Begriff Antiepileptikum eine Substanz, die ursächlich die Pathophysiologie der Erkrankung beeinflußt bzw. die Entwicklung von spontanen epileptischen Anfällen verhindert. Etwa 20 – 30 % der Patienten sprechen nicht auf eine Behandlung mit Antikonvulsiva an und gelten als „therapieresistent“ (SCHMIDT 1986, LEPPIK 1992). In dieser Gruppe sind besonders stark Epileptiker mit komplex-fokalen Anfällen, der häufigsten Anfallsform, vertreten. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit ist das chirurgische Vorgehen, bei dem der epileptische Fokus entfernt oder bestimmte Nervenbahnen durchtrennt werden. Dieses Vorgehen ist abhängig von der Lokalisation des Fokus und kann nicht bei allen Epilepsieformen eingesetzt werden.

Von einigen Insulten des Gehirns, wie z.B. Schädel-Hirn-Traumen, Schlaganfällen oder Entzündungen, ist bekannt, daß sie nach einer Latenzphase von Wochen bis Jahren zu Epilepsien führen können (YABLON 1993). Für diese Patienten wäre die prophylaktische Behandlung mit einem Antiepileptikum wünschenswert, das die Epileptogenese und damit das Auftreten spontaner Anfälle hemmt. Eine Substanz mit klinisch abgesicherter antiepileptogener Wirkung steht derzeit allerdings nicht zur Verfügung.

Da die Epileptogenese und ihre therapeutische Beeinflußbarkeit sehr komplexe Prozesse sind, die *in-vitro* nur eingeschränkt nachvollzogen werden können, spielen Tiermodelle in der Epilepsieforschung eine entscheidende Rolle. Ein ideales Tiermodell sollte die Pathophysiologie und/oder das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung widerspiegeln. Anhand solcher Modelle können die der Epileptogenese zugrundeliegenden Mechanismen sowie die daraus resultierenden Veränderungen im Gehirn studiert werden. Außerdem können Wirkungsweisen bekannter Antikonvulsiva, die Folgen einer medikamentösen Langzeitbehandlung mit Antikonvulsiva und Ursachen der Pharmakoresistenz untersucht werden. Auf diesen Erkenntnissen beruhend ist die Entwicklung neuer antikonvulsiver bzw. antiepileptogener Wirkstoffe möglich (LÖSCHER 1993). Aus praktischen Erwägungen werden in der Epilepsieforschung häufig induzierte Anfallsmodelle eingesetzt, bei denen durch Elektrostimulation oder durch die Applikation einer Substanz ein epileptischer Anfall ausgelöst wird, ohne daß die Tiere chronisch an Epilepsie erkranken (LÖSCHER 1999). Die Verwendung von Epilepsiemodellen, d.h. Tieren, die wiederholt spontan auftretende Anfälle zeigen, ist zwar zeit- und arbeitsintensiver, stellt aber auch eine größere Annäherung an den Krankheitskomplex des Menschen dar. Die Induktion der Epileptogenese kann chemisch durch die Applikation von Kainsäure, Pilocarpin oder Lithium plus Pilocarpin oder elektrisch durch die Stimulation einer bestimmten Hirnregion erfolgen.

Ziel meiner Arbeit war die Etablierung eines Epilepsiemodells, das sich durch eine niedrige Mortalitätsrate und eine hohe Ausbeute an Tieren mit spontanen Anfällen auszeichnet. Für das Kainsäure-Modell wird eine Erhöhung der Überlebensrate beschrieben, wenn anstelle der einmaligen Applikation wiederholt kleinere Dosen

Kainsäure injiziert werden (HELLIER et al. 1998). Es sollte überprüft werden, ob diese Vorgehensweise einer individuellen Dosierung auch auf das Lithium-Pilocarpin-Modell übertragbar ist. Weiterhin sollte der Einfluß der Länge des Status epilepticus auf die Mortalität und die später auftretenden spontanen Anfälle untersucht werden.

Parallel zur Etablierung des chemischen Epilepsiemodells sollte ein elektrisches Epilepsiemodell erstellt werden. In Anlehnung an die Vorgehensweise von McINTYRE et al. (1982) und NISSINEN et al. (2000) sollte bei Ratten der Stämme Wistar und Sprague-Dawley ein Status epilepticus durch elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala induziert werden. Die Art und Länge des Status epilepticus sollte näher charakterisiert und sein Einfluß auf die Entwicklung spontaner Anfälle untersucht werden. Neuropathologische Untersuchungen wurden in beiden Epilepsiemodellen von C. BRANDT (2002) im Rahmen ihrer Ph.D.-These durchgeführt. Diese These wird zum gleichen Zeitpunkt wie die vorliegende Arbeit eingereicht.

Im Anschluß an die Etablierung der beiden Epilepsiemodelle sollte abschließend als erster Schritt zur Validierung eine pharmakologische Studie durchgeführt werden. Aus der Gruppe der sogenannten neuen Antikonvulsiva wurde die Substanz Levetiracetam in beiden Tiermodellen auf ihre antikonvulsive bzw. antiepileptogene Wirkung untersucht.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte außerdem mit dem Einsatz von Beschleunigungssensoren eine neue Methode zur Detektion spontaner Anfälle verwendet und auf ihre Anwendbarkeit geprüft werden. Dieses System zur Anfallsdetektion wurde in Grundzügen bereits von H. VOIGT (1999) im Rahmen seiner Diplomarbeit eingesetzt, wobei von mir weitere Modifikationen vorgenommen wurden.

2. ÜBERSICHT

2.1 Epilepsien

Epilepsien und epileptische Syndrome werden entsprechend dem Vorschlag der Kommission der Internationalen Liga gegen Epilepsie (COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY 1989) klassifiziert. Die entscheidenden Kriterien sind die klinische Manifestation der Anfälle, EEG-Befunde und die möglicherweise bekannte Ätiologie.

Anfälle, die ihren Ursprung in einer bestimmten Region des Gehirns haben, werden als fokal bezeichnet und äußern sich klinisch als unwillkürliche Bewegungen einzelner umschriebener Muskelgruppen. Treten während eines solchen Anfalls Bewußtseinsstörungen auf, spricht man von komplex-fokalen Anfällen. Kennzeichnend für generalisierte Anfälle ist die von Beginn an diffuse Ausprägung der epileptischen Aktivität über beiden Großhirnhemisphären. Klinisch ist der gesamte Körper in das Anfallsgeschehen einbezogen. Fokale Anfälle können sekundär generalisieren, d.h. vom initialen Fokus findet eine Ausweitung der epileptogenen Entladungen über das gesamte Gehirn statt. Primär und sekundär generalisierte Anfälle werden anhand der klinischen Symptomatik in Absencen (Bewußtseinsminderung mit nachfolgender Amnesie), myoklonische (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt), tonische (Streckkrämpfe), klonische (Ruderkrämpfe), tonisch-klonische und atonische (Erschlaffung der Muskulatur) Anfälle eingeteilt.

Eine Epilepsie wird als symptomatisch bezeichnet, wenn die spontanen Anfälle Folge einer eindeutig feststellbaren Grunderkrankung sind. Dem stehen die idiopathischen Epilepsien gegenüber, die auf keiner erkennbaren Ursache beruhen und „aus sich selbst heraus“ entstehen, d.h. in der Regel auf genetischen Faktoren basieren. Der Begriff kryptogen beschreibt eine Epilepsie, der vermutlich eine organische Ursache zu Grunde liegt, die jedoch verborgen ist.

Neben fokalen und generalisierten Epilepsien werden noch unklassifizierbare Epilepsien und spezielle Syndrome unterschieden. Zu den speziellen Syndromen gehört unter anderem auch der Status epilepticus. Als solcher wird ein anhaltender epileptischer Zustand oder eine Anfallsserie ohne Wiedererlangung des Bewußtseins

über einen längeren Zeitraum bezeichnet. Die gebräuchlichste Definition des Status epilepticus sieht dabei eine Dauer von mindestens 30 min vor. Diese Länge soll einen Wendepunkt darstellen, nach dessen Überschreitung anfallsinduzierte neuronale Schädigungen auftreten. LOWENSTEIN et al. (1999) schlagen eine neue Definition vor, nach der jedes anhaltende Krampfgeschehen mit einer Länge von über 5 min bereits als Status epilepticus bezeichnet werden sollte. Dies würde zu einer verbesserten Berücksichtigung folgender Punkte beitragen. Erstens ist die Beziehung zwischen Krampfdauer und neuronaler Schädigung nicht hinreichend geklärt. Zweitens ist ein einzelner epileptischer Anfall in der Regel kürzer als 5 min. Und drittens sollte die Behandlung eines Anfalls, der über die typische Anfallsdauer hinaus besteht, unverzüglich beginnen, um Komplikationen zu vermeiden.

In industrialisierten Ländern beträgt die Inzidenz von Epilepsien um 0,44 ‰, d.h. pro Jahr erkranken etwa 44/100.000 Personen neu an Epilepsien, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (HAUSER et al. 1993). Außerdem treten Epilepsien mit einer altersabhängigen Varianz auf. Kleinkinder und alte Menschen erkranken häufiger als Personen mittleren Alters (HAUSER et al. 1993).
Die Prävalenz liegt bei ca. 0,7 %, d.h. 7/1000 Menschen leiden an Epilepsien (HAUSER et al. 1991). Bei über der Hälfte der Patienten manifestiert sich die Epilepsie in fokalen Anfällen (HAUSER et al. 1991, PRATS u. GARAIZAR 1999). Bei komplex-fokalen Anfällen liegt der Ursprung der epileptischen Entladungen bei 70 – 85 % der Patienten im Temporallappen (DAM 1992). Aus diesem Grund wird bei diesen Patienten auch häufig der Begriff „Temporallappenepilepsie“ verwendet.
In der Mehrzahl aller Erkrankungsfälle kann keine Ursache festgestellt werden. Nur etwa 25 % aller Epilepsien sind symptomatisch, wobei offene Kopfverletzungen, Schlaganfälle, Schädel-Hirn-Traumen, degenerative Gehirnerkrankungen, Infektionen des zentralen Nervensystems und postnatale Komplikationen die häufigsten Auslöser sind (HAUSER et al. 1993).
Ein Status epilepticus tritt nach einer klinischen Studie aus Hessen (KNAKE et al. 2001) in Deutschland mit einer Inzidenz von knapp 0,02 ‰ auf, d.h. jährlich sind etwa 14.000 Menschen, bevorzugt Männer und ältere Personen, hiervon betroffen. In der genannten Studie ist nur bei 50 % der Patienten zuvor eine Epilepsie diagnostiziert worden. In den USA liegt die Inzidenz des Status epilepticus in einem ähnlichen Bereich (DELORENZO et al. 1995).

Die Prognose für Epilepsien ist allgemein als gut zu betrachten. Über zwei Drittel aller Patienten zeigen eine Remission (ANNEGERS et al. 1979, SHORVON und REYNOLDS 1982, COLLABORATIVE GROUP FOR THE STUDY OF EPILEPSY 1992), die in der Regel als anfallsfreie Periode über 5 Jahre definiert wird. Bei 10 – 20 % der Betroffenen ist die Prognose ungewiß (SANDER 1993). Diese Patienten zeigen häufig nach Absetzen der Medikamente erneut epileptische Anfälle, so daß die medikamentöse Therapie lebenslang fortgesetzt werden muß. Bei den verbleibenden 20 % der an Epilepsie erkrankten Menschen ist die Prognose schlecht (SANDER 1993). Diese Patienten zeigen trotz einer entsprechenden medikamentösen Behandlung weiterhin spontane Anfälle. Dieser Zustand wird als Therapieresistenz beschrieben. Es gibt keine allgemein anerkannte Definition dieses Begriffs. Grundsätzlich tritt unter einer adäquaten Behandlung mit Antikonvulsiva, d.h. Wirkstoffen, die das Auftreten spontaner Anfälle unterdrücken, keine Verbesserung des Krankheitsbildes auf (JUUL-JENSEN 1986, LEPPIK 1992, ALVING 1995). In der Gruppe der therapieresistenten Epilepsien sind häufiger die fokalen als die generalisierten Anfallsformen vertreten (HART u. SHORVON 1995). Bis zu 70 % der Patienten mit komplex-fokalen Anfällen gelten als therapieresistent (SCHMIDT 1984, JUUL-JENSEN 1986, LEPPIK 1992).

Ein weiteres Problem der medikamentösen Langzeittherapie sind die nicht erwünschten Wirkungen von Antikonvulsiva. Aus einer Übersicht von LEPPIK (2001) geht hervor, daß nahezu alle verfügbaren Wirkstoffe mehr oder weniger schwerwiegende Nebenwirkungen aufweisen. Besonders kritisch ist das teratogene Potential einiger Antikonvulsiva wie Valproat und Carbamazepin. Ihr Einsatz bei schwangeren Frauen ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten von kongenitalen Fehlbildungen verbunden (SAMREN et al. 1997).

Die Mortalität ist bei Epileptikern zwei- bis dreimal höher als die erwartete Mortalität in der Grundbevölkerung (HAUSER et al. 1980). Die häufigsten Todesursachen sind Neoplasien, Bronchopneumonien, Herz- und Gefäßerkrankungen sowie Unfälle, insbesondere Ertrinken, oder Selbstmord (ANNEGERS et al. 1984).

Der Status epilepticus ist ein lebensbedrohlicher Zustand. Zur Behandlung werden in der Regel Diazepam und andere Benzodiazepine, Phenytoin oder Phenobarbital intravenös verabreicht. Zeigen diese Substanzen keine Wirkung, wird ein sogenanntes „Barbiturat-Koma“ mit Pentobarbital eingeleitet (LEPPIK 1985). Von

den Patienten mit Status epilepticus versterben 9 – 22 % (DELORENZO et al. 1995, SAGDUYU et al. 1998, KNAKE et al. 2001).

In mehreren Studien ist belegt worden, daß der prophylaktische Einsatz von verschiedenen Antikonvulsiva bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nicht das Auftreten von posttraumatischen Spätepilepsien verhindert. Durch die Behandlung mit Phenytoin, Phenobarbital, Carbamazepin oder Valproat konnten zwar zum Teil die Anfälle in der ersten Phase nach dem Insult unterdrückt werden, doch dieser Effekt war nicht anhaltend (PENRY et al. 1979, GLÖTZNER et al. 1983, TEMKIN et al. 1990, SCHIERHOUT u. ROBERTS 1998, TEMKIN et al. 1999). Keine dieser Substanzen wirkte also antiepileptogen, d.h. verhinderte die Entwicklung einer Epilepsie.

Epilepsien stellen in der Veterinärmedizin die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des Gehirns bei Hund und Katze dar. Beim Hund sind idiopathische Epilepsien häufiger als symptomatische, wobei gewisse Rassedispositionen auftreten und in der Mehrzahl Rüden betroffen sind (LÖSCHER et al. 1985). Die medikamentöse Therapie erfolgt mit Präparaten aus der Humanmedizin, wobei nur wenige Antikonvulsiva aufgrund der unterschiedlichen Pharmakokinetik beim Tier zum Einsatz kommen. Beim Hund sind dies Phenobarbital und Primidon, bei der Katze Phenobarbital und Diazepam (LÖSCHER 1994). Allerdings werden nur etwa 40 % der Hunde unter der entsprechenden Therapie anfallsfrei, während 20 – 40 % der Tiere keine Veränderung im Krankheitsbild zeigen und als therapieresistent bezeichnet werden müssen. Bei den übrigen Hunden ist zumindest eine Reduktion der Anfallsfrequenz zu beobachten.

Die ungeklärte Pathophysiologie von Epilepsien, ihr häufiges Auftreten und die Problematik der medikamentösen Therapie zeigen deutlich den Forschungsbedarf, der hinsichtlich dieser Erkrankungen besteht. Da sich die komplexen Prozesse des Gehirns *in-vitro* nur unvollständig darstellen lassen, spielen Tiermodelle in der Epilepsieforschung eine entscheidende Rolle.

2.2 Tiermodelle

In der Epilepsieforschung sind zwei Arten von Tiermodellen einsetzbar. Zum einen Tiere mit Spontanmutationen, d.h. genetischen Veränderungen, die mit Epilepsien einhergehen. Zum anderen die Modelle, in denen durch bestimmte Manipulationen des Tiers die Symptome der Erkrankung erzeugt werden. Ein ideales Tiermodell sollte dabei folgende Anforderungen erfüllen (LÖSCHER 1999). Klinisches Erscheinungsbild, EEG- und pathophysiologische Veränderungen ähneln den entsprechenden Anfallsformen beim Menschen. Das Tiermodell ist prädiktiv für die Wirksamkeit von Substanzen gegen bestimmte Anfallsformen. Die Pharmakokinetik ermöglicht effektive Wirkstoffspiegel bei der akuten und chronischen Verabreichung von Antikonvulsiva, wobei die Plasmaspiegel mit denen von epileptischen Patienten vergleichbar sind. Spontane Anfälle treten wiederholt und mit hoher Frequenz auf. Kein Tiermodell erfüllt alle diese Kriterien, d.h. für jedes Forschungsvorhaben muß das am besten geeignete Modell ausgewählt werden.

Eine schematische Übersicht über die Tiermodelle in der Epilepsieforschung ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei den meisten verfügbaren Modellen handelt es sich eher um Anfalls- als um Epilepsiemodelle. In einem Anfallsmodell reagieren die Tiere auf

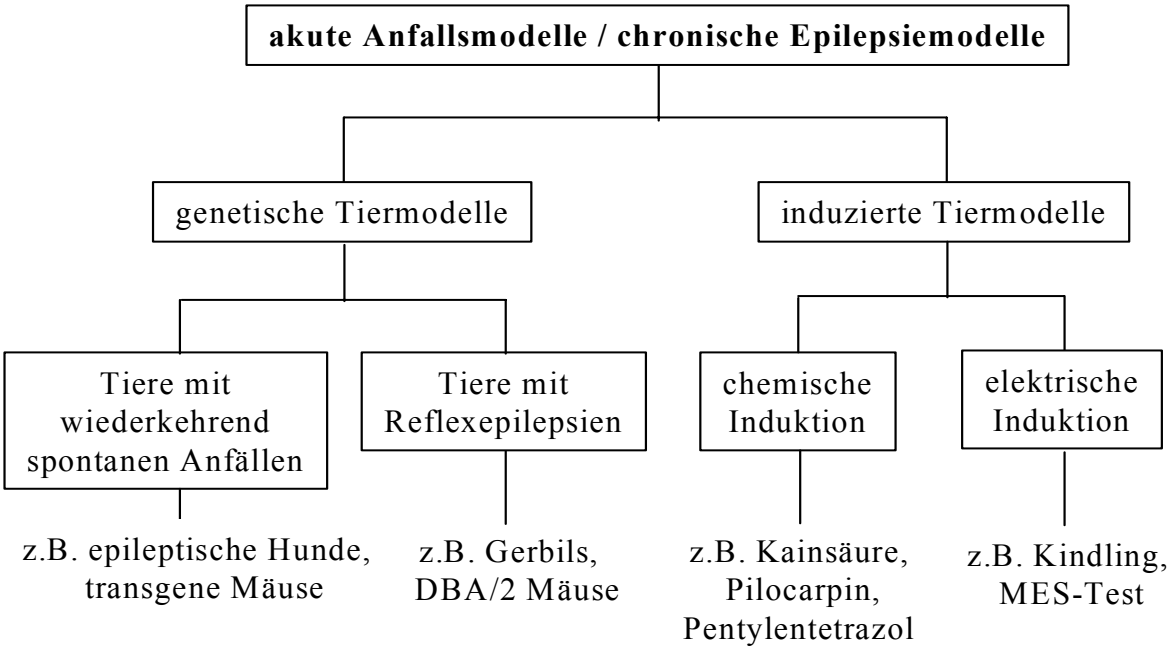


Abbildung 1:
Klassifikation der experimentellen Tiermodelle in der Epilepsieforschung (LÖSCHER 1999).
MES-Test: maximal electroshock seizure test.

einen bestimmten Stimulus akut mit einem epileptischen Anfall. Dagegen sind bei einem Epilepsiemodell die Tiere chronisch krank und zeigen spontan auftretende epileptische Anfälle. Akute sowie chronische Modelle können in genetische und induzierte Modelle unterteilt werden. Genetische Tiermodelle basieren in der Regel auf speziellen Zuchtlinien. Die zugrundeliegenden genetischen Mutationen treten dabei entweder spontan auf oder werden durch den Einsatz von transgenen Techniken oder die Applikation von mutagenen Substanzen erzeugt. Bei induzierten Modellen werden naive, nicht-epileptische Tiere verwendet. In der Regel werden diese Versuche an Ratten oder Mäusen durchgeführt. Die Induktion kann chemisch durch die Applikation einer konvulsiv wirkenden Substanz oder elektrisch durch die Stimulation einer bestimmten Hirnregion erfolgen.
Aus praktischen Erwägungen werden in der Epilepsieforschung häufig Anfallsmodelle eingesetzt. Da das gemeinsame Charakteristikum aller Epilepsien jedoch die spontanen Anfälle sind, stellen Epilepsiemodelle eine weitaus größere Annäherung an das Krankheitsbild beim Menschen dar.

2.2.1 Anfallsmodelle

Neue potentiell wirksame Substanzen werden in der Regel im Screening-Verfahren in Anfallsmodellen auf ihre antikonvulsive, unter Umständen auch prokonvulsive, Wirkung getestet. In sogenannten Krampfschwellentests muß dabei nach Applikation eines Antikonvulsivums der Stimulus zur Auslösung eines Anfalls entsprechend verstärkt werden. In Anfallsmodellen können auch Mechanismen der Iktogenese, d.h. die Entstehung, Ausbreitung und Terminierung eines einzelnen epileptischen Anfalls, untersucht werden. Vorteil des Einsatzes von Anfallsmodellen ist, daß die Anfälle gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgelöst werden können, um Effekte einer Substanzapplikation oder eines Anfalls unmittelbar zu studieren. Nachteil von Anfallsmodellen ist, daß sie die Komplexität der Erkrankung und die zugrundeliegende Pathophysiologie nicht widerspiegeln.
Es existieren eine Vielzahl von Anfallsmodellen, die mit verschiedenen Anfallsformen assoziiert sind (LÖSCHER u. SCHMIDT 1988). Häufig eingesetzt werden das Amygdala-Kindling-Modell, der Maximale Elektroschock- sowie der Pentylentetrazol-Test. Als „kindling“ wird die Entwicklung von Krämpfen bezeichnet, die durch regelmäßige fokale elektrische Stimulation einer Struktur im limbischen System

(meist der Amygdala) mit überschwelligen Stromstärken ausgelöst werden und dabei an Schwere und Dauer zunehmen (GODDARD et al. 1969). Wenn dieser Prozeß abgeschlossen ist, zeigen diese Tiere eine permanent erhöhte Empfindlichkeit hinsichtlich der elektrischen Induktion von Anfällen, d.h. die Krampfschwelle dieser Tiere ist dauerhaft erniedrigt. Das Kindling-Modell ist ein Modell für komplex-fokale Anfälle mit sekundärer Generalisation. Im Maximalen Elektroschock-Test werden supramaximale Stromstärken verwendet, wobei die Stimulation über Cornea- oder Ohrelektroden erfolgt. Dieses Modell ist prädiktiv für Substanzen, die gegen generalisierte tonisch-klonische Anfälle wirksam sind. Pentylentetrazol ist eine konvulsiv wirkende Substanz, die nach systemischer Applikation klonische, in höheren Dosierungen tonische generalisierte Anfälle auslöst. Die durch Pentylentetrazol induzierten klonischen Anfälle werden als Modell für die Wirksamkeit von Substanzen gegen generalisierte Absencen verwendet.
In den genannten drei Anfallsmodellen zeigen einige Tiere nach häufiger Wiederholung der akuten Anfallsinduktion auch spontane Anfälle. Für das Amygdala-Kindling-Modell ist dies systematisch an der Ratte untersucht worden (PINEL u. ROVNER 1978, BRANDT 2002). Zur Erstellung von Epilepsiemodellen ist diese Vorgehensweise allerdings wenig geeignet, da sie zum einen sehr zeitaufwendig und zum anderen die Ausbeute an epileptischen Ratten zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht berechenbar ist.

2.2.2 Genetische Epilepsiemodelle

Genetische Epilepsiemodelle können in zwei Gruppen eingeteilt werden, und zwar in Tiere mit wiederholt spontanen Anfällen und Tiere mit Reflexepilepsien.
Bei Hunden mit Epilepsie werden spontane primär und sekundär generalisierte tonisch-klonische Anfälle am häufigsten beobachtet (LÖSCHER 1986). Die Epilepsien sind vermutlich genetisch bedingt, da ein vermehrtes Auftreten innerhalb bestimmter Zuchtlinien beobachtet werden kann und bei den meisten Tieren keine Veränderungen des Gehirns festzustellen sind (LÖSCHER et al. 1985). Trotz vieler Ähnlichkeiten zum Menschen ist der Einsatz von Hunden in der Epilepsieforschung begrenzt. Dies liegt zum einen daran, daß der Aufbau einer entsprechenden Zucht zeit- und kostenintensiv ist. Zum anderen an der Pharmakokinetik beim Hund, der viele Antikonvulsiva schneller als der Mensch eliminiert (LÖSCHER 1986).

Weitere genetische Modelle sind zum Beispiel Ratten mit generalisierten Absencen (GAERS = Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg) oder die 'tottering' (torkelnde) Maus, bei der neben fokalen Anfällen auch Absencen beobachtet werden können (NOEBELS 1979, MARESCAUX et al. 1992). Transgene Mäuse, bei denen bestimmte Gene ausgeschaltet oder eingefügt worden sind, eröffnen neue Möglichkeiten hinsichtlich der Erforschung zellulärer Pathomechanismen und der Ursachen von Pharmakoresistenz (ALLEN u. WALSH 1996). Zum jetzigen Zeitpunkt sind allerdings noch keine transgenen Epilepsiemodelle etabliert, um die Pathogenese und pharmakologische Beeinflußbarkeit von Epilepsien und epileptischen Anfällen zu untersuchen.

Tiere mit Reflexepilepsien zeigen keine spontanen Anfälle, sondern reagieren auf einen bestimmten sensorischen Stimulus mit einem Anfall. Reflexepilepsien gehören zu den speziellen Syndromen und treten bei etwa 5 % aller epileptischen Patienten auf (SCHMIDT 1993). Bei Mongolischen Gerbils können durch verschiedene Stimuli altersabhängig fokale und generalisierte Anfälle ausgelöst werden, ohne daß eine spezielle Zuchtauswahl der Tiere notwendig ist (LÖSCHER 1991). Mäuse der Inzuchtlinie DBA/2 zeigen in einem bestimmten Alter nach audiogenen Reizen Rennanfälle, die in schwere generalisierte tonisch-klonische Anfälle übergehen (SEYFRIED 1979). Auch bei anderen Spezies treten Reflexepilepsien auf. Da dieses spezielle Syndrom beim Menschen selten ist, werden diese Tiermodelle in der Epilepsieforschung nur begrenzt verwendet.

2.2.3 Chemisch induzierte Epilepsiemodelle

Eine häufig angewandte Vorgehensweise zur Erzeugung epileptischer Tiere ist der Einsatz von konvulsiv wirkenden Substanzen. Als Chemokonvulsiva werden oftmals Kainsäure und Pilocarpin verwendet. Durch die in der Regel einmalige fokale oder systemische Applikation wird ein Status epilepticus induziert, der nach Verstreichen einer Latenzphase zu spontanen fokalen oder generalisierten Anfällen führt (Abbildung 2). In einem auf diese Weise generierten Tiermodell können verschiedene Phasen der Erkrankung sowie ihre pharmakologische Beeinflußbarkeit untersucht werden: (1) der akute Status epilepticus sowie seine Bedeutung als initialer Insult zur Induktion einer Epileptogenese; (2) Prozesse, die in der Latenzphase ablaufen und schließlich zum Auftreten spontaner Anfälle führen;

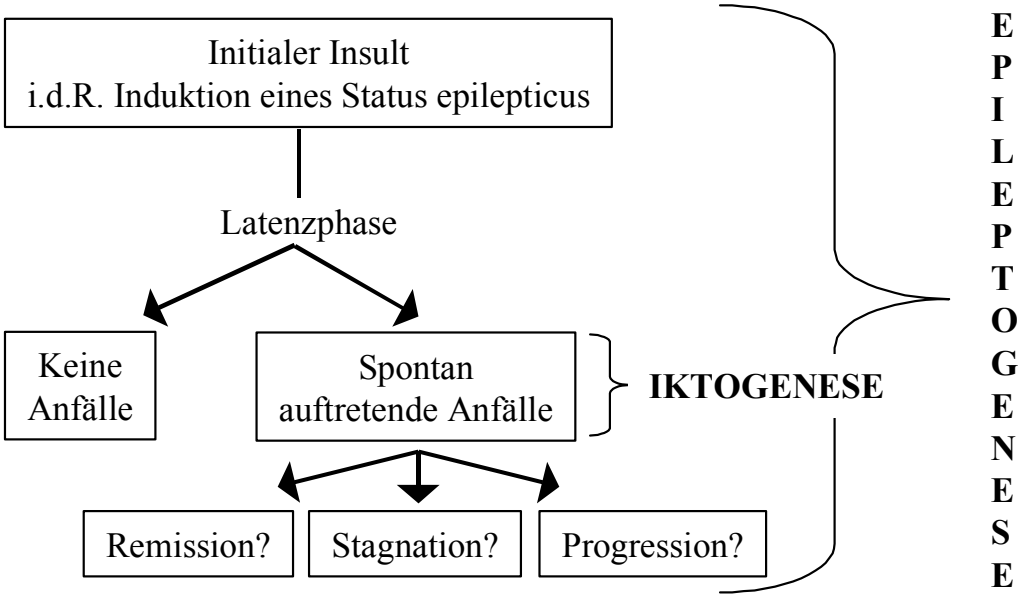


Abbildung 2:
Schematische Darstellung des Verlaufs und Untersuchungsmöglichkeiten in induzierten Epilepsiemodellen.

(3) der einzelne epileptische Anfall, sprich die Iktogenese; (4) die der Erkrankung zugrundeliegenden Pathomechanismen, sprich die Epileptogenese; (5) der möglicherweise progressive Verlauf von Epilepsien (Übersicht von COLE 2000).

Der Einsatz von Epilepsiemodellen ist verglichen mit Anfallsmodellen zeit- und arbeitsintensiver. Zunächst muß die Latenzphase abgewartet werden, deren Länge sowohl zwischen als auch innerhalb der verschiedenen Modelle variiert. Anschließend beginnt eine systematische Überwachung, um die epileptischen Tiere zu selektieren. Aufgrund des spontanen Auftretens der Anfälle ist während pharmakologischer Studien ein intensives Monitoring der Tiere erforderlich.

2.2.3.1 Kainsäure-Modell

Kainsäure wirkt stark exzitatorisch über die Bindung an einen nach ihr benannten Subtyp der Glutamatrezeptoren. Ursprünglich wurde sie aus der Seealge *Digenea simplex* gewonnen (TAKEMOTO 1978), ist heute aber auch synthetisch erhältlich. Für Untersuchungen mit Kainsäure werden in der Regel Ratten verwendet, allerdings wurden auch einige Studien mit Mäusen durchgeführt (z.B. KLEINROK et al. 1980,

GILLARDON et al. 1995). Die folgenden Literaturangaben beziehen sich ausschließlich auf Ratten.

Das Kainsäure-Modell ist ein Modell für Temporallappenepilepsie, da der durch die Applikation von Kainsäure induzierte Status epilepticus zu ähnlichen pathologischen Veränderungen im Gehirn führt wie sie bei Patienten mit Temporallappenepilepsie beobachtet werden können (BEN-ARI et al. 1980, SCHWOB et al. 1980, NADLER 1981). Außerdem treten einige Wochen nach dem Status epilepticus bei einem Teil der Ratten spontane Anfälle auf (PISA et al. 1980, CAVALHEIRO et al. 1982).

Die Applikation von Kainsäure kann fokal in verschiedene Gehirnstrukturen mit Dosierungen von 0,5 – 2 µg (NADLER et al. 1978, BEN-ARI et al. 1980, NELSON et al. 1980) oder systemisch i.p., i.v. oder s.c. in Dosierungen von 8 – 12 mg/kg (SCHWOB et al. 1980, ZUCKER et al. 1981, SPERK et al. 1983) erfolgen. Nach der systemischen Applikation vergehen etwa 15 min, bis die erste fokale Krampfaktivität zu erkennen ist (SPERK et al. 1983). Sogenannte 'wet dog shakes' werden häufig in dieser Phase beobachtet. Etwa eine Stunde später treten erste generalisierte Anfälle auf und zwischen 60 – 80 % aller Tiere entwickeln schließlich einen Status epilepticus, der für 3 bis 6 h anhält. Bei einer Kainsäure-Dosierung von 10 mg/kg versterben etwa 15 % der Tiere mit Status epilepticus in der akuten Phase (SPERK et al. 1983). Die Mortalitätsrate steigt auf 50 % bei Dosierungen > 10 mg/kg (CRONIN u. DUDEK 1988, BRINES et al. 1995).

Nach einer Latenzphase von 1 bis 3 Wochen treten bei etwa der Hälfte der Tiere spontane Anfälle auf (CAVALHEIRO et al. 1982, CRONIN u. DUDEK 1988, HELLIER et al. 1998). CAVALHEIRO et al. (1982) beschreiben die epileptische Phase nach fokaler Applikation von Kainsäure als transient, d.h. nach wenigen Wochen sind keine Anfälle mehr zu beobachten Ein aggressiveres Verhalten der Ratten in den Monaten nach dem Status epilepticus wird beschrieben (CAVALHEIRO et al. 1982, BARAN et al. 1988).

Ein Nachteil des Kainsäure-Modells ist die unterschiedliche Empfindlichkeit der Tiere gegenüber den Wirkungen der Kainsäure. Abhängig von Stamm, Geschlecht, Alter und Gewicht der verwendeten Ratten treten variierende Reaktionen auf, wobei auch Unterschiede zwischen Wurfgeschwistern beobachtet worden sind (SPERK et al. 1985, GOLDEN et al. 1991, WOZNIAK et al. 1991, BRINES et al. 1995). Um diese Variabilität zwischen den Tieren und die Mortalitätsrate zu minimieren, haben HELLIER et al. (1998) ein modifiziertes Vorgehen bei der Kainsäure-Applikation

vorgeschlagen. Hierbei wird Kainsäure stündlich in kleinen Dosen (jeweils 5 mg/kg i.p.) maximal 10 mal injiziert. Die Injektionen werden so lange fortgesetzt, bis die Tiere über einen Zeitraum von mehr als 3 h wiederholt generalisierte Anfälle zeigen. Durch dieses Vorgehen kann nach HELLIER et al. (1998) bei allen Tieren eine anhaltend generalisierte Krampfaktivität induziert werden, wobei die akute Mortalitätsrate mit 15 % angegeben wird. Nach einer durchschnittlichen Latenzphase von 11 Wochen haben 97 % der überlebenden Ratten spontane Anfälle entwickelt. Die Mehrzahl der Anfälle ist in der Hellphase beobachtet worden. Eine Remission der Anfälle in den Monaten nach Status epilepticus ist nicht erkennbar (HELLIER u. DUDEK 1999).

2.2.3.2 Pilocarpin-Modell

Im Pilocarpin-Modell werden vorwiegend Ratten verwendet, daher beziehen sich die nachfolgenden Angaben ausschließlich auf diese Spezies. CAVALHEIRO et al. (1996) haben das Modell allerdings auch an Mäusen beschrieben.

Pilocarpin wirkt agonistisch an Acetylcholin-Rezeptoren des muscarinergen Typs und führt nach einmaliger systemischer Applikation von 320 bis 400 mg/kg i.p. oder s.c. zu einem Status epilepticus (TURSKI et al. 1983). GIBBS et al. (1997) verabreichen eine weitere Pilocarpin-Dosis von 175 mg/kg i.p., wenn die Ratten nicht innerhalb von einer Stunde nach der ersten Applikation generalisierte Krampfaktivität zeigen. Wie das Kainsäure-Modell weist auch das Pilocarpin-Modell viele Charakteristika der menschlichen Temporallappenepilepsie auf, und dient daher als ein weiteres Modell für diese Form der Epilepsie (MELLO et al. 1993, LIU et al. 1994).

Da Pilocarpin eine starke cholinerge Wirkung hat, erhalten die Ratten 30 min vor der Pilocarpin-Applikation Methylscopolamin (i.p. oder s.c.) in einer Dosierung von 1 mg/kg. Dieser cholinerge Antagonist kann aufgrund seiner quartären Ammoniumgruppe nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, so daß nur die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilocarpins aufgehoben werden.

Wenige Minuten nach der Pilocarpin-Applikation sind die Tiere zunächst hypoaktiv und kurze Zeit später ist fokale Krampfaktivität wie Kauen und stereotypes Kopfnicken zu beobachten. 'Wet dog shakes' werden im Gegensatz zum Kainsäure-Modell selten gesehen. Generalisierte Krampfaktivität, die in einen Status epilepticus übergeht, tritt 20 – 60 min nach der Pilocarpin-Applikation bei 40 bis 100 % der Tiere

auf (TURSKI et al. 1983, CLIFFORD et al. 1987, COVOLAN u. MELLO 2000). Der induzierte Status epilepticus hält 5 bis 24 h an. Die in der Literatur angegebenen Mortalitätsraten zeigen eine gewisse Abhängigkeit zur applizierten Pilocarpin-Dosis und variieren zwischen 20 und 100 %. Eine Übersicht ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Senkung der Mortalität brechen einige Arbeitsgruppen den Status epilepticus nach einer bestimmten Zeit mit Diazepam und/oder einem Barbiturat ab, wobei einmalige oder wiederholte Applikationen beschrieben werden (CLIFFORD et al. 1987, LEITE u. CAVALHEIRO 1995, MELLO u. COVOLAN 1996, GIBBS et al. 1997). In Tabelle 1 sind Mortalitätsraten aus Veröffentlichungen dargestellt, in denen der Status epilepticus nach einer definierten Dauer abgebrochen worden ist, was allerdings nicht zu einer deutlichen Senkung der Sterblichkeit geführt hat.
Hinsichtlich der Verkürzung des Status epilepticus geht aus einer Untersuchung von LEMOS u. CAVALHEIRO (1995) hervor, daß eine Länge des Status epilepticus von

Pilocarpin-Dosis (mg/kg)	**Abbruch des Status epilepticus**	**akute Mortalität**	**Quelle**
400	nein	100 %	Jope et al. 1986
400	nein	83 %	Morrisett et al. 1987
400	nein	70 %	Liu et al. 1994
380	nein	41 %	Cavalheiro et al. 1991
380	nein	31 %	Liu et al. 1994
380	nein	20 %	Turski et al. 1983
350	nein	28 %	Arida et al. 1999b
350	nein	22 %	Priel et al. 1996
320-350	nein	30 %	Cavalheiro et al. 1994
300	nein	33 %	Turski 1989
300-400	nein	27 %	Turski et al. 1989
350	ja, nach 1,0 h	30 %	Mello et al. 1993
320	ja, nach 1,5 h	42 %	Longo u. Mello 1999
320	ja, nach 6,0 h	25 %	Leite u. Cavalheiro 1995

Tabelle 1:
Übersicht über die in der Literatur angegebenen Mortalitätsraten von Ratten innerhalb von 48 h nach pilocarpin-induziertem Status epilepticus.

30 min nicht ausreichend gewesen ist, um Tiere mit spontanen Anfällen zu erzeugen. Nach dieser Studie ist die Ausbeute an epileptischen Tieren sowie die Frequenz der spontanen Anfälle mit zunehmender Länge des Status epilepticus gestiegen bei gleichzeitiger Verkürzung der Latenzphase bis zum ersten Anfall.
An den Status epilepticus schließt sich eine Phase über einige Tage an, in der das Allgemeinbefinden der Tiere hochgradig gestört ist und intensive Betreuung notwendig ist (CAVALHEIRO et al. 1991, MELLO et al. 1993, GIBBS et al. 1997). Die Substitution von Flüssigkeit und Verabreichung von leichtverdaulicher Nahrung ist üblich, um die Überlebensrate zu erhöhen.

Nach einer durchschnittlichen Latenzphase von etwa 14 Tagen (zwischen 3 und 50 Tagen) entwickeln annähernd alle Tiere, die den Status epilepticus überleben, spontane Anfälle (CAVALHEIRO et al. 1991, MELLO et al. 1993, MELLO u. COVOLAN 1996, ARIDA et al. 1999a). Die Mehrzahl der Ratten zeigen dabei zunächst fokale Anfälle, die mit der Zeit an Schwere zunehmen und schließlich sekundär generalisieren. Tritt einmal ein sekundär generalisierter Anfall auf, sind auch die folgenden Anfälle meist durch diesen Anfallstyp bestimmt (CAVALHEIRO et al. 1991). In den ersten Wochen steigt die Zahl der Anfälle zunächst an und bleibt dann konstant, wobei sich auch Anfallsschwere und –dauer nicht verändern (ARIDA et al. 1999a). Die Anfallsfrequenz weist starke Unterschiede auf und reicht von mehreren Anfällen täglich bis zu einigen wenigen Anfällen im Monat, wobei mehr Anfälle in der Hell- als in der Dunkelphase beobachtet werden. Zahlreiche Tiere zeigen sogenannte Cluster, d.h. sie haben mehrere spontane Anfälle an einem Tag, gefolgt von einer anfallsfreien Phase über einige Tage. Eine Tendenz zur Spontanremission der Anfälle ist im Pilocarpin-Modell nicht zu erkennen (CAVALHEIRO et al. 1991, LEITE u. CAVALHEIRO 1995, ARIDA et al. 1999a).

Zahlreiche Substanzen sind in pharmakologischen Studien im Pilocarpin-Modell getestet worden, wobei generell drei Vorgehensweisen möglich sind. Erstens die Applikation einer Substanz **vor** der Pilocarpin-Applikation. Zweitens die Applikation einer Substanz **im** Status epilepticus. Drittens die Applikation einer Substanz **nach** dem Status epilepticus, wobei dies unmittelbar zu Beginn der Latenzphase oder nach Auftreten der spontanen Anfälle in der chronisch epileptischen Phase erfolgen kann. Zu den Wirkstoffen, die vor Pilocarpin appliziert worden sind und in der Lage waren,

die Induktion eines Status epilepticus zu verhindern, gehören Diazepam (10 mg/kg), Clonazepam (0,4 mg/kg), Phenobarbital (25 mg/kg), Valproat (100 mg/kg), Atropin (20 mg/kg) und Scopolamin (10 mg/kg) (TURSKI et al. 1983, TURSKI et al. 1987, CAVALHEIRO 1995). Atropin und Scopolamin zeigen keine Wirkung mehr, wenn der Status epilepticus bereits entwickelt ist. Es wird vermutet, daß Pilocarpin zwar durch seine cholinerge Wirkung epileptische Aktivität induziert, die anhaltende Krampfaktivität allerdings durch sekundäre glutamaterge Mechanismen aufrechterhalten wird (CLIFFORD et al. 1987).

Die Applikation von Antikonvulsiva im Status epilepticus soll zu einem Abbruch der anhaltenden Krampfaktivität führen. Wie bereits beschrieben werden hierzu Diazepam (4 – 10 mg/kg), Pentobarbital (30 mg/kg) oder Thiobarbiturate (25 mg/kg) eingesetzt (CLIFFORD et al. 1987, MELLO et al. 1993, LEITE u. CAVALHEIRO 1995, MELLO u. COVOLAN 1996).

Um festzustellen, ob ein Wirkstoff die Epileptogenese und somit das Auftreten spontaner Anfälle hemmt, muß die Behandlung unmittelbar nach dem auslösenden Insult beginnen. Dazu haben KLITGAARD et al. (2001) einen pilocarpin-induzierten Status epilepticus mit Diazepam abgebrochen und direkt anschließend mit einer chronischen Behandlung der Ratten mit Levetiracetam (50 – 300 mg/kg/Tag) oder Valproat (600 mg/kg/Tag) begonnen. Es sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Auftretens spontaner Anfälle zwischen behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren festgestellt worden.

In einer Studie von LEITE und CAVALHEIRO (1995) ist die Wirkung verschiedener Antikonvulsiva auf die spontanen Anfälle nach pilocarpin-induziertem Status epilepticus untersucht worden. Demnach kam es unter einer Behandlung mit Phenobarbital (40 mg/kg/Tag), Carbamazepin (120 mg/kg/Tag), Phenytoin (100 mg/kg/Tag) oder Valproat (600 mg/kg/Tag) zu einer signifikanten Reduktion der Anfallsfrequenz. Valproat in einer niedrigeren Dosierung (450 mg/kg/Tag) zeigte nur eine schwache und Ethosuximid (400 mg/kg/Tag) keine antikonvulsive Wirkung. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der Situation in der Humanmedizin, wo die genannten Substanzen eine entsprechende Wirkung auf komplex-fokale Anfälle haben.

2.2.3.3 Lithium-Pilocarpin-Modell

Da durch die alleinige Applikation von Pilocarpin nicht zuverlässig in allen Tieren ein Status epilepticus induziert werden kann, haben JOPE et al. (1986) ein modifiziertes Modell charakterisiert, das Lithium-Pilocarpin-Modell. Die Vorbehandlung mit Lithiumchlorid in einer Dosierung von 3 meq/kg i.p. (entspricht etwa 127 mg/kg) sensibilisiert die Tiere für die konvulsive Wirkung des Pilocarpins, so daß die Pilocarpin-Dosis zur Induktion eines Status epilepticus um mehr als eine Zehnerpotenz gesenkt werden kann (HONCHAR et al. 1983). Die Lithium-Applikation erfolgt meist 20 – 24 h vor der Pilocarpin-Applikation, wobei der zeitliche Abstand bei gleicher Wirksamkeit auf bis zu 2 h reduziert werden kann (MORRISETT et al. 1987, CHAUDHARY et al. 1999).

Der Wirkungsmechanismus von Lithium, der diese Verstärkung der konvulsiven Wirkung von Pilocarpin auslöst, ist nicht hinreichend geklärt. Es sind verschiedene Effekte von Lithium beschrieben worden. So vermindert Lithium die Freisetzung von Noradrenalin und Dopamin, was möglicherweise zu einer erhöhten Anfallsbereitschaft führt (ARNOLD et al. 1973). Lithium scheint auch direkt auf das cholinerge System zu wirken, indem es die Acetylcholin-Freisetzung erhöht und Veränderungen an muscarinergen Rezeptoren bewirkt (JOPE 1979, HRUSKA et al. 1984).

Verhaltensänderungen, elektrographische und neuropathologische Befunde im Lithium-Pilocarpin-Modell entsprechen denen im Pilocarpin-Modell (CLIFFORD et al. 1987). Etwa 25 min nach einer Pilocarpin-Applikation von 25 - 30 mg/kg i.p. bei mit Lithium vorbehandelte Ratten entwickeln annähernd alle Tiere einen Status epilepticus, der über mehrere Stunden anhält (JOPE et al. 1986, MORRISETT et al. 1987, WALTON u. TREIMAN 1988).

Die Mortalität nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus ist sehr hoch und wird mit 50 % (SANKAR et al. 1998) bzw. 92 – 100 % (JOPE et al. 1986, MORRISETT et al. 1987, WALTON u. TREIMAN 1988) angegeben. Durch einen vorzeitigen Abbruch des Status epilepticus mit Diazepam (20 mg/kg) ist eine Erhöhung der Überlebensrate möglich. In einer Untersuchung von WALTON u. TREIMAN (1988) hat sich allerdings gezeigt, daß mit zunehmender Länge des Status epilepticus die Zahl der Tiere sinkt, bei denen eine antikonvulsive Wirkung des Diazepams beobachtet werden kann. Selbst beim sichtbaren Erlöschen der motorischen Krampfaktivität waren noch iktale Entladungen im EEG vorhanden.

In diesem Modell ist wie im Kainsäure-Modell eine gesteigerte Aggressivität der Ratten in den folgenden Wochen zu beobachten (PERSINGER et al. 1993). Bezüglich der chronisch epileptischen Phase geht aus einer Untersuchung an 2 und 3 Wochen alten Jungtieren hervor, daß altersabhängig ein bzw. zwei Drittel der Tiere nach 3 – 4 Monaten spontane, in der Regel sekundär generalisierte Anfälle entwickeln (SANKAR et al. 1998). Bei adulten Ratten zeigen nach einer durchschnittlichen Latenzphase von 40 Tagen, wobei die Einzelwerte zwischen 14 und 66 Tagen liegen, 92 % der Tiere spontane Anfälle (ANDRE et al. 2000).

Hinsichtlich der Pharmakologie sind Unterschiede zwischen dem Pilocarpin- und dem Lithium-Pilocarpin-Modell festgestellt worden. So sind neben den Substanzen, die im Pilocarpin-Modell die Induktion eines Status epilepticus verhindern, zusätzlich Carbamazepin, Dizocilpin (MK-801) und Felbamat wirksam (ORMANDY et al. 1989, SOFIA et al. 1993). Haben die Tiere bereits einen Status epilepticus entwickelt, geht die Applikation von Phenobarbital (30 mg/kg), Diazepam (5 mg/kg), Carbamazepin (100 mg/kg), Phenytoin (200 mg/kg), Valproat (300 mg/kg) und Atropin (5 mg/kg) mit keiner deutlichen antikonvulsiven Wirkung einher (MORRISETT et al. 1987).
In einer aktuellen Studie (ANDRE et al. 2001) ist der Effekt einer chronischen Behandlung mit Vigabatrin auf die Entwicklung spontaner Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell untersucht worden. Vigabatrin erhöht die Spiegel der γ-Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Gehirn, durch eine Hemmung des GABA-abbauenden Enzyms. Zehn Minuten nach der Pilocarpin-Applikation wurde die Behandlung mit Vigabatrin in einer Dosierung von 250 mg/kg über 45 Tage eingeleitet. Kontrolltiere und behandelte Ratten entwickelten nach einer vergleichbaren Latenzphase spontane Anfälle.

2.2.4 Elektrisch induzierte Epilepsiemodelle

Es sind verschiedene Vorgehensweisen in der Literatur beschrieben, die durch elektrische Stimulation einer bestimmten Gehirnregion über eine gewisse Zeit zur Induktion eines Status epilepticus und später spontan auftretenden Anfällen führen. Vorteil dieser Modelle ist, daß keine Substanzen mit möglicherweise neurotoxischem Potential verabreicht werden, deren Wirkungen nicht von anfallsinduzierten Effekten unterschieden werden können. Nachteil ist ein erhöhter Arbeitsaufwand durch die

notwendige stereotaktische Implantation von Reizelektroden, über die die Stimulation der definierten Gehirnregion vorgenommen wird. Die Modellbeschreibungen in der Literatur beziehen sich generell auf Ratten.

Die Untersuchungen von McINTYRE et al. (1982) gehören zu den ersten Beschreibungen eines elektrisch induzierten Status epilepticus-Modells. Hierbei wurden vollgekindelte Ratten, d.h. Tiere, die nach wiederholten elektrischen Stimulationen eine permanent erhöhte Empfindlichkeit hinsichtlich der Induktion von Anfällen aufweisen, über einen Zeitraum von 60 min kontinuierlich in der Amygdala stimuliert. Rund zwei Drittel der Tiere entwickelten einen selbsterhaltenden fokalen Status epilepticus nach Stimulationsende, der über mehrere Stunden anhielt. Die akute Mortalität betrug ca. 10 %.

VICIDOMINI u. NADLER (1987) verwendeten zur Induktion eines Status epilepticus naive Ratten, die im Hippocampus über maximal 7 h elektrisch stimuliert wurden. Etwa 85 % der Tiere entwickelten nach Stimulationsende einen Status epilepticus.

Die chronischen Auswirkungen des Status epilepticus auf die Entwicklung spontaner Anfälle sind in beiden Studien nicht untersucht worden.

Das Modell der **'Perforant Path'** (Tractus perforans**)-Stimulation** ist von SLOVITER (1983) etabliert worden. Der Tractus perforans ist ein Faserzug, der im entorhinalen Cortex entspringt und die hauptsächliche Quelle für Eingangssignale in den Hippocampus, einer Struktur des limbischen Systems, darstellt. In diesem Modell werden anästhesierte Ratten über einen Zeitraum von 24 h kontinuierlich stimuliert. Verhaltensbeobachtungen während der Stimulation sind aufgrund der Anästhesie nicht möglich. Die neuropathologischen Veränderungen nach dieser Stimulation ähneln Befunden, die bei Patienten mit Temporallappenepilepsie erhoben werden können (SLOVITER 1991). Die akute Mortalität wird in diesem Modell mit ca. 30 % angegeben (SHIRASAKA u. WASTERLAIN 1994). Nach 3 – 4 Wochen treten bei etwa der Hälfte der Tiere spontane generalisierte Anfälle auf (SHIRASAKA u. WASTERLAIN 1994). Es sind verschiedene modifizierte Protokolle der elektrischen Stimulation des Tractus perforans zur Induktion eines Status epilepticus beschrieben worden, die insbesondere eine Verkürzung der Stimulationsdauer auf 60 – 90 min an nicht anästhesierten Tieren vorsehen (YLINEN et al. 1991, PITKÄNEN et al. 1996, GORTER et al. 2001).

Von LOTHMAN et al. (1989) ist das **Modell der kontinuierlichen Hippocampus-Stimulation** beschrieben worden. Es handelt sich um ein weiteres Modell für

Temporallappenepilepsie, da die neuropathologischen Veränderungen denen bei Menschen mit dieser Erkrankung ähneln (BERTRAM et al. 1990). Die elektrische Stimulation erfolgt im posterioren ventralen Hippocampus über 90 min, wodurch bei annähernd allen Ratten ein selbsterhaltender Status epilepticus induziert werden kann, der bis zu 12 h anhält. Die Verwendung von vollgekindelten oder naiven Ratten hat keinen Einfluß auf die Induktion eines Status epilepticus (LOTHMAN et al. 1989). Der induzierte Status epilepticus kann wirksam mit Diazepam (5 – 8 mg/kg) oder Phenobarbital (40 mg/kg) abgebrochen werden, wobei gelegentlich eine Nachinjektion zur vollständigen Unterdrückung der epileptischen Aktivität im EEG erforderlich ist (BERTRAM u. LOTHMAN 1990). Die akute Mortalitätsrate beträgt 10 – 20 %. Das Allgemeinbefinden der Tiere nach dem Status epilepticus wird als gut bezeichnet. Allerdings werden die Ratten extrem aggressiv (GOODMAN 1998). Nach etwa einem Monat zeigen 50 % der Tiere spontane Anfälle (LOTHMAN et al. 1990). In den ersten Wochen nehmen dabei die Zahl und Schwere der Anfälle zu, wobei große individuelle Unterschiede auftreten. Hauptsächlich werden fokale Anfälle beobachtet, die gelegentlich sekundär generalisieren. Etwa zwei Drittel der Anfälle werden in der Hellphase registriert. Eine Tendenz zu Spontanremissionen in den Monaten nach Status epilepticus ist nicht zu erkennen (BERTRAM u. CORNETT 1994).

Von NISSINEN et al. (2000) ist ein weiteres Modell für Temporallappenepilepsie charakterisiert worden, das **Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation**. Ein selbsterhaltender Status epilepticus wird in Ratten durch eine elektrische Stimulation über 20 bis 30 min im lateralen Nukleus der Amygdala induziert. Die Länge des Status epilepticus wird mit 6 – 20 h und die akute Mortalitätsrate mit 20 % angegeben. Knapp 90 % der Tiere mit Status epilepticus entwickeln nach einer durchschnittlichen Latenzphase von einem Monat spontane Anfälle. Eine Zunahme der individuellen Zahl von Anfällen ist nicht festgestellt worden, allerdings eine Verschiebung der Anfallsschwere von zunächst überwiegend sekundär generalisierten Anfällen zu später vermehrt fokalen Anfällen. Drei Viertel aller Anfälle sind in der Hellphase registriert worden.

Die Folgen einer chronischen Behandlung mit Vigabatrin auf die Entwicklung spontaner Anfälle im Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation sind von HALONEN et al. (2001) untersucht worden. Zwei Tage nach Induktion des Status epilepticus begann die Vigabatrin-Applikation in einer Dosierung von 75 mg/kg/Tag.

Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 10 Wochen fortgesetzt. Verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren konnte durch die prophylaktische Gabe des Antikonvulsivums Vigabatrin weder die Zahl epileptischer Tiere noch die Anzahl, Schwere oder Länge der spontanen Anfälle beeinflußt werden.
NISSINEN u. PITKÄNEN (2000) haben die Wirkungen der Antikonvulsiva Carbamazepin (120 mg/kg/Tag), Ethosuximid (400 mg/kg/Tag), Lamotrigin (20 mg/kg/Tag), Valproat (600 mg/kg/Tag) und Vigabatrin (250 mg/kg/Tag) in diesem Tiermodell in der chronisch epileptischen Phase untersucht. Unter der Behandlung mit Lamotrigin und Valproat war eine signifikante Reduktion der Anfallszahl bei allen Tieren zu beobachten. Carbamazepin, Ethosuximid und Vigabatrin zeigten auch eine antikonvulsive Wirkung, der Effekt war allerdings weniger deutlich und bei einer geringeren Anzahl von Tiere ausgeprägt.

2.3 Detektion spontaner Anfälle

Epilepsiemodelle stellen im Gegensatz zu Anfallsmodellen eine größere Annäherung an das Krankheitsbild beim Menschen dar, weil bei diesen Modellen **spontane** Anfälle auftreten, die das Charakteristikum aller Epilepsien sind. Dieser Vorteil bedingt allerdings einen größeren Zeit- und Arbeitsaufwand bei der praktischen Arbeit mit Epilepsiemodellen, da eine systematische Überwachung der Tiere zur Detektion der jederzeit auftretenden Anfälle notwendig ist. Es werden verschiedene Vorgehensweisen zur Erfassung spontaner Anfälle beschrieben, die sich hinsichtlich ihres technischen, personellen und zeitlichen Aufwands unterscheiden.
Aus der Literatur ist ersichtlich, daß in induzierten Epilepsiemodellen mehr Anfälle in der Ruhe- bzw. Inaktivitätsphase von Ratten, also der Hellphase, registriert werden können als in der aktiveren Dunkelphase (BERTRAM u. CORNETT 1994, ARIDA et al. 1999a, HELLIER u. DUDEK 1999, NISSINEN et al. 2000). Die einfachste, allerdings auch personal- und zeitaufwendigste Methode ist daher die direkte Beobachtung der Tiere in ihren Käfigen über mehrere Stunden am Tag wie sie z.B. von LEITE u. CAVALHEIRO (1995) beschrieben wird. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, daß keine nachprüfbare Dokumentation der Anfälle angelegt wird.
Eine Videoüberwachung der Tiere ist nur mit einem geringen technischen Aufwand verbunden und mit geeigneten Kameras sowohl in der Hell- als auch in der

Dunkelphase möglich (z.B. von ARIDA et al. 1999a eingesetzt). Vorteile dieser Methode sind die Zeitersparnis durch Nutzung des schnellen Vorlaufs des Videorecorders bei der Auswertung der Videobänder und eine dauerhafte Dokumentation der Anfälle. Ein Nachteil ist das mögliche Übersehen von spontanen Anfällen, sei es, weil die Tiere eine ungünstige Position zur Kamera einnehmen und ihr Verhalten nicht eindeutig beurteilbar ist oder weil der Anfall im schnellen Vorlauf des Videorecorders von der auswertenden Person nicht wahrgenommen wird.

Die technisch anspruchsvollste und kostenintensivste Methode ist die Kombination von EEG- und Videoüberwachung. Die von mehreren Ratten gleichzeitig abgeleiteten EEGs können entweder von einer Person oder mittels spezieller Programme (z.B. Harmonie®) ausgewertet werden. Anhand der Videobänder ist eine visuelle Kontrolle und Klassifikation spontaner Anfälle möglich. BERTRAM et al. (1997) beschreiben in einer Veröffentlichung detailliert den Aufbau einer EEG-Video-Überwachungseinheit mit der simultane Langzeitaufnahmen von bis zu 15 Tieren angefertigt werden können. Den Zeitaufwand zur Auswertung der EEG-Aufzeichnungen von 24 h beziffern sie mit 30 bis 90 min. Eine Überwachung mittels EEG setzt allerdings die Implantation von Tiefenelektroden oder Cortexschrauben voraus, was jedoch nur bei chemisch induzierten Epilepsiemodellen mit einer zusätzlichen Operation der Tiere verbunden ist. Als problematisch ist auch der eventuelle Verlust des Ableitungsaufbaus zu nennen, der ein Tier ohne erneute Operation von einer weiteren Überwachung mittels EEG ausschließt.

Eine neue Methode für EEG-Ableitungen, die keine Implantation einer Ableitungseinheit mehr erfordert, wird von MUMFORD u. WETHERELL (2001) für die Anfallsdetektion bei Meerschweinchen beschrieben. Die Hirnströme werden über Oberflächenelektroden gemessen und telemetrisch übertragen, d.h. die Tiere tragen einen Sender, der die Daten an einen Empfänger übermittelt.

Weitere Methoden, die eine schnelle und sichere Detektion spontaner Anfälle ermöglichen, sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

2.4 Levetiracetam

Levetiracetam ([S]-α-Ethyl-2-oxo-pyrrolidinacetamid) ist ein neues Antikonvulsivum, das seit September 2000 in Deutschland zur Komedikation bei Patienten mit pharmakoresistenter fokaler Epilepsie zugelassen ist. Der Begriff „neue Antikonvulsiva“ umfaßt die Substanzen, die innerhalb der letzten 30 Jahre zur Therapie der Epilepsie beim Menschen entwickelt und in den letzten ca. 10 Jahren klinisch eingeführt worden sind. Sie werden auch als Antikonvulsiva der zweiten Generation bezeichnet und stehen den Wirkstoffen der ersten Generation gegenüber, die zwischen 1910 und 1970 entwickelt und eingeführt wurden (LÖSCHER 1998). Die Entwicklung neuer Antikonvulsiva basiert hauptsächlich auf Screening-Verfahren oder strukturellen Variationen bekannter Substanzen (LÖSCHER u. SCHMIDT 1994).

Der antikonvulsive Wirkungsmechanismus von Levetiracetam ist bislang nicht vollständig geklärt. Er scheint nicht auf den bisher bekannten Mechanismen anderer Antikonvulsiva zu beruhen, sondern auf der selektiven Inhibition bestimmter Calcium-Kanäle (LUKYANETZ et al. 2001). Levetiracetam zeigte zunächst in der präklinischen Prüfung einige widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich seiner antikonvulsiven Wirksamkeit in klassischen Anfallsmodellen (siehe Übersicht von KLITGAARD 2001). Doch in klinischen Studien bei Patienten mit therapieresistenten fokalen Epilepsien konnte ein deutlicher antikonvulsiver Effekt von Levetiracetam als Zusatztherapie beobachtet werden. Je nach Studie führte Levetiracetam in Dosierungen von 1000 – 3000 mg/Tag zu einer 50 %igen Reduktion der Anfallsfrequenz bei 23 - 42 % der Patienten, wobei einige Patienten unter der Behandlung sogar anfallsfrei wurden (BEN-MENACHEM u. FALTER 2000, CEREGHINO et al. 2000, SHORVON et al. 2000). Die unerwünschten Wirkungen von Levetiracetam werden dabei als mild bis moderat beschrieben und umfassen Mattigkeit, grippeähnliche Symptome und Somnolenz. Über das mögliche teratogene Potential von Levetiracetam liegen bisher keine Daten vor.

Daten zur Kombinationstherapie bei Kindern, zur Monotherapie bei der Erstbehandlung neu diagnostizierter Epilepsien sowie zur Wirksamkeit von Levetiracetam bei primär generalisierten Epilepsien sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht oder nur unzureichend vorhanden.

2.5 Fragestellung

Der Einsatz von Tiermodellen stellt ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung der Pathophysiologie und medikamentösen Behandlung von Epilepsien dar. In Anfallsmodellen wird nur ein Symptom dieser Erkrankungen akut simuliert, ohne die weitreichenden chronischen Veränderungen bei epileptischen Patienten zu erfassen. Dagegen spiegeln Epilepsiemodelle, die sich durch das spontane Auftreten von Anfällen auszeichnen, zahlreiche Aspekte der Situation in der Human- und Tiermedizin wider.

Die Verwendung von Epilepsiemodellen ist generell zeit- und arbeitsaufwendig. Zudem ergeben sich in induzierten Epilepsiemodellen häufig Einschränkungen hinsichtlich der Praktikabilität in der Erstellung des Modells. Im Kainsäure-Modell ist die stark variierende Anzahl von Tieren, die einen Status epilepticus entwickeln, von Nachteil. Durch die fraktionierte Applikation von Kainsäure läßt sich zwar der Anteil von Ratten mit Status epilepticus erhöhen, dieses Vorgehen ist allerdings sehr zeitaufwendig. Im Pilocarpin- bzw. Lithium-Pilocarpin-Modell ist die hohe Mortalität ein Nachteil. Im Modell der 'Perforant Path'- oder Hippocampus-Stimulation beträgt die Ausbeute an chronisch epileptischen Ratten nur etwa 50 %. Die Nachteile in den genannten Modellen bedingen so den Einsatz größerer Tierzahlen, um in der chronischen Phase ausreichende Gruppengrößen zur Verfügung zu haben.

Die erste Fragestellung meiner Arbeit war, ob durch Modifikationen in den Vorgehensweisen zur Erzeugung von Epilepsiemodellen Verbesserungen hinsichtlich der Mortalität und der Ausbeute epileptischer Ratten zu erzielen sind. Auf das Lithium-Pilocarpin-Modell sollte die für das Kainsäure-Modell beschriebene wiederholte Applikation kleiner Dosen übertragen werden. Gleichzeitig sollte der Einfluß der Länge des Status epilepticus auf die Mortalität und die chronische Phase untersucht werden. Die Ergebnisse sollten mit denen von Tieren verglichen werden, die nach der klassischen Weise mit Lithium und Pilocarpin behandelt wurden.

Parallel sollten in einem neuen Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation die Auswirkungen von Geschlecht und Stamm der Ratten auf die Induktion eines Status epilepticus und die später auftretenden spontanen Anfälle untersucht werden. Der induzierte Status epilepticus und sein möglicher Einfluß auf die Entwicklung spontaner Anfälle sollten gleichzeitig näher charakterisiert werden.

Bereits zu Beginn der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde festgelegt, daß C. BRANDT (2002) einen Teil der Tiere für weiterführende neuropathologische Untersuchungen übernimmt.

In einem zweiten Schritt sollte die Wirkung von Levetiracetam als Monotherapie in beiden Epilepsiemodellen getestet werden, wobei zwei unterschiedliche Versuchsdesigns gewählt wurden. Im Lithium-Pilocarpin-Modell sollte die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam untersucht werden, d.h. in dieser Studie wurden Ratten verwendet, die bereits über viele Wochen spontane Anfälle gezeigt hatten. Dagegen sollten im neuen Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation antiepileptogene und antikonvulsive Effekte von Levetiracetam untersucht werden, d.h. die chronische Behandlung der Tiere sollte einen Tag nach der Induktion eines Status epilepticus beginnen. Es sollte geprüft werden, ob Levetiracetam die Epileptogenese und somit das Auftreten spontaner Anfälle hemmt (antiepileptogener Effekt) oder die Anfallsfrequenz bei den behandelten Ratten (antikonvulsiver Effekt) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren reduziert.

Die dritte Fragestellung meiner Arbeit war, ob Beschleunigungssensoren, die bei der Beurteilung von Schreckreaktionen eingesetzt werden (KOCH et al. 1998), als „Bewegungsmelder“ zur Detektion spontaner Anfälle sinnvoll eingesetzt werden können. Voruntersuchungen sind hierzu bereits von H. VOIGT (1999) im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt worden. Diese nicht-invasive Methode der Überwachung könnte gegebenenfalls eine praktische Alternative zu EEG-Ableitungen darstellen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten sowie weibliche und männliche Sprague-Dawley-Ratten (Versuchstierzucht Harlan-Winkelmann, Borchen) verwendet, die bei ihrer Ankunft ein Gewicht von 190 – 220 g hatten. Die Ratten wurden während der gesamten Versuchszeit unter kontrollierten Umweltbedingungen bei einer Umgebungstemperatur von 22 – 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % gehalten. Das Lichtprogramm war auf einen Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h eingestellt, wobei die Hellphase von 5.00 – 17.00 MEZ dauerte. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futterpellets (Altromin 1324-Standarddiät, Fa. Altrogge, Lage) und Leitungswasser aus Makrolonflaschen. Die Haltung erfolgte auf Standardeinstreu für Labortiere (Altromin, Fa. Altrogge, Lage). Mindestens einmal wöchentlich wurden die Ratten in neue Käfige umgesetzt, das Trinkwasser erneuert und Futterpellets nachgefüllt. Tiere, bei denen für die Versuche Elektrodenimplantationen vorgesehen waren, wurden direkt nach ihrer Ankunft einzeln in Makrolonkäfigen Typ III untergebracht. Ratten für die Studien mit Pilocarpin wurden zunächst zu 5 – 6 Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV gehalten. Nach dem induzierten Status epilepticus wurde auf Einzelhaltung umgestellt, um zu verhindern, daß das zunehmend aggressive Verhalten zu Verletzungen von anderen Ratten führt (PERSINGER et al. 1993). Alle Tiere konnten sich wenigstens sieben Tage vor Beginn der Experimente an die neue Umgebung adaptieren. Männliche und weibliche Tiere wurden in getrennten Ställen gehalten. Nur für die Zeit der Videoüberwachung wurden die Böcke in den Aufzeichnungsraum gebracht, in dem die weiblichen Tiere dauerhaft gehalten wurden. Während der gesamten pharmakologischen Studien waren ausschließlich weibliche Ratten im Aufzeichnungsraum.

3.1.2 Verwendete Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
Chloramphenicol-Succinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Ratiopharm GmbH, Ulm
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	E. Merck AG, Darmstadt
Entellan-Eindeckmittel	E. Merck AG, Darmstadt
Ethacridinlactat (Rivanol®)	Chinosol, Hannover
Ethanol vergällt	Euro Alkohol, Hannover
Fentanylcitrat (Fentanyl-Janssen®)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gentamicin (Friseo-Gent®)	Essex Tierarznei, München
Kunststoff, Kaltpolymerisat (Paladur®)	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts
Levetiracetam	UCB Pharma, Braine-l'Alleud, Belgien
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methohexital-Natrium (Brevimytal®-Natrium)	Lilly Deutschland GmbH, Giessen
Methylscopolaminbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium-Chlorid-Lösung (isoton)	Delta-Pharma, Pfullingen
Pilocarpinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Terpineol	Roth, Karlsruhe
Thionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Xylol-Ersatz-Medium (Rotihistol®)	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2:
Übersicht der verwendeten Substanzen inklusive Bezugsquelle

3.1.3 Material und Geräte

Material und Geräte	Bezugsquelle
Elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala	
Stereotaktischer Apparat	Fa. Kopf, Tujunga, CA, USA
Accupulser Modell A310C	World Precision Instruments, Berlin
Stimulus Isolator A365	World Precision Instruments, Berlin
Detektion von spontanen Anfällen	
Beschleunigungssensor K-BEAM 8303A10M1	Kistler Instrumente GmbH, Ostfildern
Petrowachs Typ 8432	Kistler Instrumente GmbH, Ostfildern
Stabilisierte Netzgeräte Typ 2224.0	Straton Gerätetechnik GmbH, Fürstenwalde
8-Kanal Verstärker CyberAmp 380	Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA
PowerLab/800s einschließlich Programm „Chart4 for Windows“	ADInstruments Ltd, Hastings, East Sussex, UK
Personal Computer mit Intel Pentium-II Prozessor mit 400 MHz, 512 KB internem Cache-Arbeitsspeicher, 128 MB Arbeitsspeicher, 9.1 GB SCSI-Festplatte, Betriebssystem Windows NT 4.0	Anders & Rodewyk GmbH, Hannover
CCD-Kamera-Module für Schwarz-Weiß-Aufnahmen	Conrad Electronic GmbH, Hannover
Videorecorder Philipps VR685 (Aufzeichnung) Videorecorder AIWA FX7500 (Aufzeichnung) Videorecorder Panasonic NV-HS900 (Aufzeichnung) Videorecorder Thomson VTH 6020G (Auswertung) Videorecorder Samsung SV-6233X (Auswertung)	
Fernseher Barco FC1487 (Aufzeichnung) Fernseher Sharp 37EM-33S (Aufzeichnung) Monitor Mitsubishi EUM-1491A (Auswertung) Fernseher Samsung CB-5079T (Auswertung)	
Videokassetten Kodak HS E-240	
EEG-Kabel: Kabelentzwirler einschließlich Anschlußkabel und Westernbuchse, 2-adriges, abgeschirmtes, ummanteltes Kabel, BNC-Stecker, Krokodilklemme, Binder-Stecker	Elektronik Menzel, Hannover
Vorex® Kunststoffplatten (Barriere im Makrolonkäfig Typ IV)	

Tabelle 3:
Übersicht der eingesetzten Materialien und Geräte inklusive Bezugsquelle

3.2 Methodik

3.2.1 Krampfparameter

Epileptische Anfälle wurden während der akuten Induktion eines Status epilepticus und während der chronischen Überwachungsphase hinsichtlich Krampfschwere und Krampfdauer beurteilt. Die Einteilung der **Krampfschwere** basierte auf einer Skala nach RACINE (1972), modifiziert nach LÖSCHER und SCHMIDT (1988), in der entsprechend der klinischen Symptomatik Anfälle in verschiedene Stadien eingeordnet werden. Das Stadium 1 ist durch Immobilität der Ratten gekennzeichnet und geht in der Regel mit dem Schließen eines oder beiden Augen einher. Häufig ist auch Zittern der Tasthaare und stereotypes Schnüffeln zu beobachten. Schwere Fazialklonien in Form von klonischen Kaubewegungen und stereotypes Nicken mit dem Kopf charakterisieren das Stadium 2. In Stadium 3 zeigen die Tiere einen einseitigen Vorderextremitätenklonus, der in Stadium 4 beidseitig und mit Aufrichten der Tiere auftritt. Aus Stadium 4 kann sich durch Verlust der Stellreflexe Stadium 5 entwickeln, wobei die Tiere nach hinten oder zur Seite umfallen und generalisierte klonische Krämpfe zeigen. Zusätzlich zu diesen 5 „klassischen“ Stadien wurden 3 weitere Stadien bei der Beurteilung der Krampfschwere verwendet. 'Running and bouncing' (explosionsartig einsetzende Rennanfälle in Verbindung mit hohen Sprüngen) wurde als Stadium 1,5 bewertet; als Stadium 4,5 bzw. (5) wurde ein generalisierter klonischer Anfall ohne vorheriges Aufrichten und Umfallen der Tiere bezeichnet; bei Stadium 6 handelt es sich um einen generalisierten klonischen Anfall mit anschließendem 'running and bouncing'. Während die Stadien 1 – 3 fokale Krampfaktivität anzeigen, repräsentieren die Stadien 4 – 6 ein generalisiertes Krampfgeschehen (LÖSCHER und SCHMIDT 1988).

Die **Anfallsdauer** beschreibt den Zeitraum von Beginn der ersten sichtbaren motorischen Krampfaktivität bis zu deren Ende.

Als **Status epilepticus** wurde entweder eine kontinuierliche fokale oder generalisierte Krampfaktivität definiert oder zahlreiche Anfälle hintereinander, wobei die Tiere in den dazwischenliegenden Pausen nicht das Bewußtsein wiedererlangten.

Krampfschwere	Anfallscharakteristika
Stadium 1	Immobilität, schwache Fazialklonien
Stadium 1,5	'Running and bouncing'
Stadium 2	Schwere Fazialklonien
Stadium 3	Unilateraler Vorderextremitätenklonus
Stadium 4	Aufrichten und bilateraler Vorderextremitätenklonus
Stadium 4,5	Generalisierter klonischer Anfall ohne Aufrichten und Umfallen
Stadium 5	Aufrichten und anschließender Verlust der Stellreflexe, generalisierter klonischer Anfall
Stadium 6	Generalisierter klonischer Anfall mit 'running and bouncing'

Tabelle 4:
Modifizierte Klassifikation der Anfallsstadien nach RACINE (1972), LÖSCHER und SCHMIDT (1988)

3.2.2 Lithium-Pilocarpin-Modell

Für diese Versuche wurden ausschließlich weibliche Wistar-Ratten eingesetzt. Die Entscheidung für Ratten dieses Geschlechts und Stammes beruhte darauf, daß in anderen Studien aus dem Institut für Pharmakologie ebenfalls weibliche Wistar-Ratten verwendet worden sind und so eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Anfalls- und Epilepsiemodellen ermöglicht wurde. Alle Tiere wurden an mindestens drei Tagen vor dem geplanten Versuch durch Handling (Injektionen, Wiegen, Bestimmung der rektalen Körpertemperatur) an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Die Experimente wurden immer zwischen 8.00 – 9.00 Uhr begonnen, um mögliche Einflüsse durch die circadiane Rhythmik zu minimieren (STEWART et al. 2001).

3.2.2.1 Induktion und Abbruch des Status epilepticus

Alle Tiere erhielten 20 – 24 h vor der ersten oder einzigen Pilocarpin-Applikation Lithiumchlorid (Bezugsquellen siehe Kapitel 3.1.2) in einer Dosierung von 3 meq/kg i.p. (127 mg/kg gelöst in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung, pH-Wert 6 - 7). Um die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilocarpins zu antagonisieren, wurden alle Tiere 30 min vor der ersten oder einzigen Pilocarpin-Applikation mit

Methylscopolamin (1 mg/kg i.p., gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung, pH-Wert 6) vorbehandelt. Die Injektion von Pilocarpin erfolgte bei einer Gruppe von Tieren einmalig mit einer Dosis von 30 mg/kg i.p., gelöst in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH-Wert 6). Eine zweite Gruppe von Ratten wurde fraktioniert mit Pilocarpin behandelt. Bei den Ratten dieser Gruppe wurden alle 30 Minuten 10 mg/kg i.p., gelöst in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung, injiziert. Tiere, die einen Status epilepticus entwickelten, erhielten keine weiteren Injektionen. Wenn ein generalisierter Anfall beobachtet wurde, ohne daß sich im weiteren zeitlichen Verlauf ein Status epilepticus einstellte, wurde erst 30 min nach dem letzten generalisierten Anfall erneut Pilocarpin appliziert. Die Pilocarpin-Applikation wurde auf maximal vier Injektionen begrenzt. In Untersuchungen von VOIGT (1999) und eigenen Vorversuchen, in denen bis zu 10x 10 mg/kg Pilocarpin verabreicht wurden, entwickelten Tiere, die nach der 4. Injektion noch keine anhaltende Krampfaktivität zeigten, auch nach weiteren Applikationen keinen Status epilepticus.

Die Ratten wurden während der Versuche für bis zu 5 Stunden in offenen Makrolonkäfigen Typ IV beobachtet. Injektionszeitpunkte, generalisierte Anfälle und der Beginn des Status epilepticus wurden mit der genauen Uhrzeit festgehalten. Zudem wurde für jedes Tier protokolliert, ob fokale Krampfaktivität erkennbar war. Die rektale Körpertemperatur aller Tiere wurde vor der Methylscopolamin-Applikation (ca. 30 min nach Verbringen der Tiere in den Versuchsraum) und kurz vor Abbruch des Status epilepticus mittels eines Temperaturfühlers einschließlich Handgerät (ALMEMO®2096-1, Ahlborn Mess- und Regelungstechnik, Holzkirchen) gemessen.

Bei Tieren, die einen Status epilepticus entwickelten, wurde dieser nach einer bestimmten Zeit durch eine Injektion von Diazepam abgebrochen. Diazepam wurde in einer Dosierung von 10 mg/kg i.p. (Injektionsvolumen der kommerziell erhältlichen Lösung 2 ml/kg) einmalig verabreicht. Nur in der ersten Versuchsgruppe wurde Diazepam in geringeren Dosierungen mehrmals nachdosiert (je 2 Tiere mit 60 bzw. 90 min Status epilepticus nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation). Um die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse zu gewährleisten, wurde diese Vorgehensweise in den weiteren Experimenten zu Gunsten einer einmaligen Applikation geändert. Anhand der Art der Pilocarpin-Applikation und der Länge des Status epilepticus waren 4 Tiergruppen zu unterscheiden (siehe Tabelle 5). Nach Abbruch des Status epilepticus wurde jedes Tier einzeln in einen Makrolonkäfig Typ III gesetzt und stündlich die rektale Körpertemperatur kontrolliert. Wenn diese

unter 36 °C absank, wurde die Ratte auf eine Wärmeplatte gelegt, bis die rektale Körpertemperatur auf einen Wert von mindestens 37 °C anstieg. Alle Ratten erhielten am Tag des Status epilepticus zwei Injektionen von jeweils 5 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p., um ein Dehydrieren der Tiere zu verhindern. Dies wurde in der Regel am folgenden Tag wiederholt, es sei denn das Allgemeinbefinden des Tieres wurde als gut beurteilt. Ab dem zweiten Tag nach Status epilepticus wurden alle Ratten mit kommerziell erhältlichem Babybrei aus der Spritze gefüttert. Dieser Brei wurde außerdem in Petrischalen im Käfig zur freien Aufnahme zur Verfügung gestellt. Durch tägliches Wiegen wurde der Gewichtsverlauf der Tiere protokolliert. Wenn über zwei Tage eine konstante Gewichtszunahme zu beobachten war, wurde die individuelle Fütterung eingestellt und die Tiere erhielten wieder ihre normale Standarddiät.

Pilocarpin-Applikation	Länge des Status epilepticus	Überwachung	Frequenz-Analyse	Levetiracetam-Studie
einmalig:				
n = 21	**90 min**: n = 17	n = 9	n = 7	n = 2
fraktioniert:				
n = 64	**60 min**: n = 15	n = 12	n = 7	n = 1
	90 min: n = 15	n = 13	n = 9	n = 4
	120 min: n = 8	n = 3	n = 3	n = 1

Tabelle 5:
Eingesetzte Tierzahlen im Lithium-Pilocarpin-Modell und Gruppengröße (n) bei nachfolgenden Untersuchungen.

3.2.2.2 Detektion von spontan auftretenden Anfällen: Beschleunigungssensoren und Videoaufzeichnungen

Die systematische Überwachung der Ratten auf spontane Anfälle begann 3 Wochen nach Induktion des Status epilepticus. Epileptische Anfälle, die vor diesem Zeitpunkt oder während der gesamten späteren Überwachung zufällig während Manipulationen an den Tieren beobachtet werden konnten, wurden mit dem Datum, der Uhrzeit, der

Krampfschwere und der ungefähren Anfallsdauer registriert. Es wurde nach einem k.o.-Verfahren vorgegangen, d.h. alle Tiere, bei denen ein spontaner Anfall beobachtet wurde, wurden von einer weiteren Überwachung ausgeschlossen. Jedes Tier wurde mindestens 12 h pro Woche überwacht, wobei sich die Überwachungsintensität aufgrund der k.o.-Vorgehensweise bei einzelnen Tieren auf bis zu 56 h pro Woche ausdehnte. Die Ratten wurden für mindestens 300 h überwacht, bevor die Aufzeichnungen eingestellt wurden und diese Tiere als anfallsfrei betrachtet wurden. Es konnten bis zu vier Tiere gleichzeitig mittels Beschleunigungssensoren und Videoaufnahme beobachtet werden.

Da im Pilocarpin-Modell die Zahl der Anfälle während der Hellphase höher ist als in der Dunkelphase (ARIDA et al. 1999a), wurden alle Aufzeichnungen in der Hellphase vorgenommen. Der Beschleunigungssensor wurde mittels eines Wachses zentral unter dem leicht erhöht positionierten Makrolonkäfig befestigt. Gleichspannungsregler lieferten die Versorgungsspannung von +/- 10 Volt. Die Signale dieser als „Bewegungsmelder“ eingesetzten Sensoren wurden von einem 8-Kanal CyberAmp 380 verstärkt und gefiltert. Die Aufzeichnung erfolgte durch einen PowerLab/800s (Digitalwandler) mit dem Programm „Chart4“ auf einem Computer. In „Chart4“ wurde als Aufzeichnungsbereich +/- 500 mV und als Aufzeichnungsfrequenz 200 Hz eingestellt. Um die externe Beeinflussung der Signale zu minimieren, wurde der Notch-Filter aktiviert, der Signale in einem schmalen Frequenzbereich um 50 Hz (Netzstrom) herausfiltert. Zusätzlich wurde ein Hochfrequenzfilter von 400 Hz verwendet, der keine Signale mit einer Frequenz > 400 Hz passieren läßt. Zur Verbesserung der Signalübertragung trug auch die Erdung aller nicht benutzten Kanäle am CyberAmp bei. Für eine störungsfreie Aufnahme erwies sich die zusätzliche Erdung von einem der vier Beschleunigungssensoren als unerläßlich.

Für die Videoaufzeichnungen wurde ein CCD-Kamera-Modul für Schwarz-Weiß-Aufnahmen verwendet, das an einen Videorecorder und einen Fernseher angeschlossen war. Alle Aufzeichnungen wurden auf Bändern mit 4 h Laufzeit im Standardmodus angefertigt. Um das Verhalten der Ratten besser beurteilen zu können, wurden die normalen Käfigdeckel gegen eigens für diesen Zweck angefertigte hohe Deckel aus Maschendraht ausgetauscht.

Zu Beginn der Versuche wurden die Aufzeichnungen der Beschleunigungssensoren und die Videobänder unabhängig voneinander vollständig ausgewertet. Die in „Chart4“ aufgenommenen Daten wurden in der um den Faktor 10 gestauchten

Version betrachtet. Ereignisse, die mit deutlichen Bewegungen der Tiere einhergingen, wurden vermerkt. Durch den Abgleich mit der Videoaufnahme war es im Laufe der Zeit möglich, generalisierte Anfälle von anderen Bewegungsmustern wie Fressen, Graben oder Putzen zu unterscheiden. Die Videobänder wurden zu Beginn im schnellen Vorlauf (ca. 7fache Geschwindigkeit) angeschaut. Wenn ein Tier anfalls-ähnliche Aktivität zeigte, wurde der entsprechende Abschnitt bei normaler Geschwindigkeit analysiert. Später wurden die Daten der „Bewegungsmelder" benutzt, um potentielle Anfälle auf den Videobändern schneller zu lokalisieren. Von jedem Anfall wurde Datum, Uhrzeit, Krampfschwere und –dauer protokolliert. Es wurden nur eindeutig mittels Video erkennbare Anfälle registriert. Videobänder mit epileptischen Anfällen wurden aufbewahrt.

Spontane Anfälle nach pilocarpin-induziertem Status epilepticus sind für mindestens 12 Monate bei den Tieren zu beobachten (LEITE u. CAVALHEIRO 1995). Um festzustellen, ob die Länge des Status epilepticus einen Einfluß auf die Anzahl der spontanen Anfälle hat, wurde bei 26 Tieren eine **Frequenz-Analyse** durchgeführt (siehe Tabelle 5). Etwa 4 Monate nach Status epilepticus wurden die Ratten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h in der Hellphase in der bereits beschriebenen Weise mittels Beschleunigungssensoren und Videoaufzeichnungen überwacht.

3.2.2.3 Pharmakologische Untersuchung – Levetiracetam

Um die pharmakologische Beeinflußbarkeit der spontanen Anfälle nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus zu untersuchen, wurde die Substanz Levetiracetam auf ihre antikonvulsive Wirkung in diesem Epilepsiemodell geprüft.

3.2.2.3.1 Auswahl der Tiere und Versuchsdesign

Für die Levetiracetam-Studie wurden 9 Tiere ausgewählt, die während der Frequenz-Analyse (siehe Kapitel 3.2.2.2) mindestens 2 Anfälle hatten. Die Auswahl erfolgte unabhängig von der Art der Pilocarpin-Applikation und der Länge des Status epilepticus, entscheidend war nur, daß der Status epilepticus durch Lithium und Pilocarpin induziert worden war. Ein Tier zeigte während der gesamten Versuchsdauer keinen Anfall und die Daten dieses Tieres wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen. Vehikel bzw. Wirkstoff wurden mittels osmotischer Minipumpen chronisch appliziert. Dieses Vorgehen gewährleistete konstante

Wirkstoffspiegel und ersetzte die bei diesen aggressiven Ratten schwierig durchzuführenden wiederholten täglichen Injektionen. Die Studie gliederte sich in 3 aufeinanderfolgende Phasen von jeweils 2 Wochen Länge (Abb. 3). In den ersten 2 Wochen wurde die Grundfrequenz der Anfälle bestimmt (*predrug control period*). Die implantierten Minipumpen (näheres siehe Kapitel 3.2.2.3.2) waren mit Vehikel gefüllt (isotone Kochsalzlösung). Anschließend bekamen die Tiere Pumpen, die Levetiracetam enthielten (*drug period*). Nach der ersten Behandlungswoche wurde während des Wechsels der Pumpen auch Blut entnommen (Kapitel 3.2.2.3.2), ebenso nach der zweiten Behandlungswoche. In den letzten zwei Kontrollwochen wurden wieder wirkstofffreie Minipumpen implantiert (*postdrug control period*).

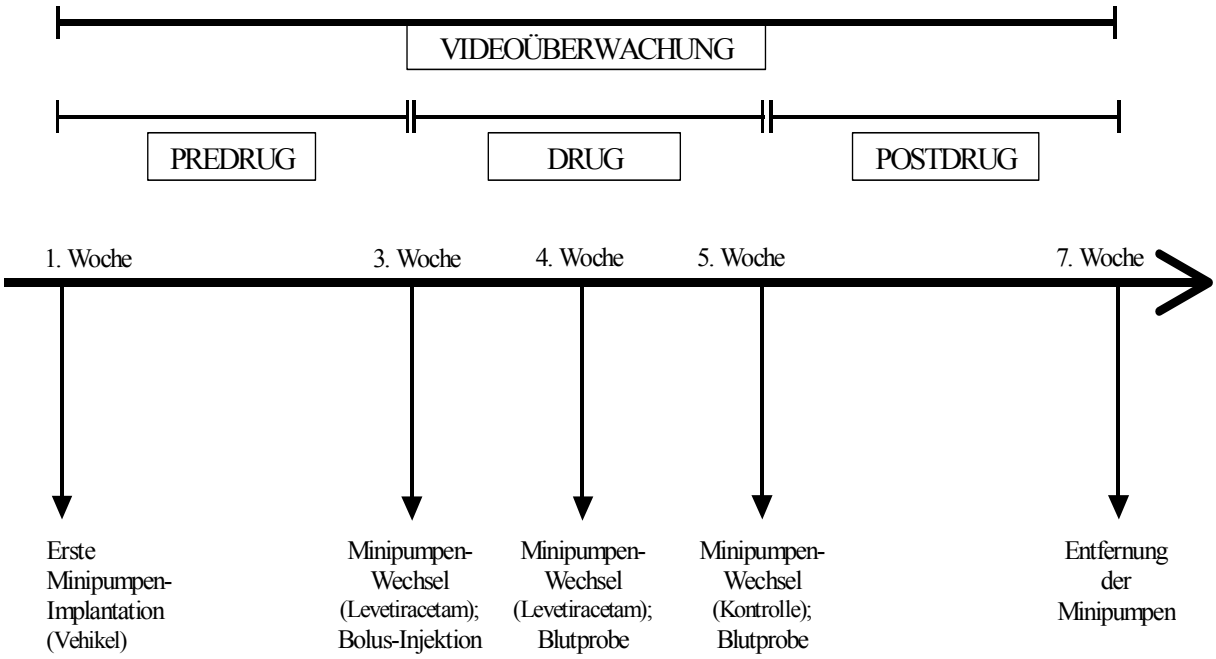


Abbildung 3:
Aufbau der Studie zur Untersuchung der Wirkung von Levetiracetam auf spontane Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell.

3.2.2.3.2 Vorbereitung und Implantation der osmotischen Minipumpen

Für diese Studie wurden osmotische Minipumpen des Typs 2ML1 (ALZET, ALZA Corp., CA, USA) verwendet. Pumpen dieses Typs haben ein Füllvolumen von 2 ml und geben über einen Zeitraum von 1 Woche konstant 10 µl/h ab. Diese Daten, mittleres Füllvolumen und mittlere Pump-Rate einschließlich der entsprechenden Standardabweichungen, werden für jede Charge durch Herstellerangaben näher

spezifiziert. Um eine Befüllung von mindestens 90 % zu gewährleisten, wurden die steril verpackten Pumpen zunächst entnommen und leer gewogen. Während der ersten Phase der Studie (*predrug control period*) wurde isotone Natrium-Chlorid-Lösung in die Pumpen eingegeben. In der Behandlungsphase (*drug period*) bestand die Füllung aus einer Levetiracetam-Lösung (1000 mg Levetiracetam gelöst in 2 ml aqua dest., pH-Wert 5,5 – 6). Da Ratten Levetiracetam schneller als Menschen eliminieren (LÖSCHER et al. 1998a), wurde diese relativ hohe Dosierung gewählt, um Plasmakonzentrationen zu erreichen, die denen von epileptischen Patienten vergleichbar sind (persönliche Information der Firma UCB Pharma, Belgien). Anhand der Differenz des Gewichts der befüllten Pumpe und ihrem Leergewicht konnte sichergestellt werden, daß das Mindestfüllvolumen eingebracht wurde. Alle Pumpen wurden anschließend einzeln in markierten Bechergläsern bei 37 °C in isotoner Natrium-Chlorid-Lösung für mindestens 6 h vorinkubiert. Dieses Vorgehen gewährleistet die sofortige maximale Pump-Rate im Tier.

Da Injektionen aufgrund der Aggressivität der Tiere schwierig durchzuführen waren, wurden die Ratten zunächst in ihren Käfigen durch Begasung mit CO_2 sediert. Diese leichte Sedierung ermöglichte die Applikation des Narkotikums Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml aqua injectabila i.p.). Nachdem die Haare in dem Bereich zwischen den Schulterblättern entfernt worden waren, wurde mit einem Schnitt die Haut in dieser Region des Rückens durchtrennt. Durch stumpfes Präparieren wurde im subkutanen Bindegewebe eine Tasche in caudaler Richtung geformt, in welche die Pumpe eingeschoben wurde. Dabei ist zu beachten, daß die Pumpe mit ihrer Austrittsöffnung voran, dem sogenannten „Flow moderator“, eingeführt wird und diese Öffnung sich dann auf der von der Wunde abgewandten Seite befindet. Die Hautinzision wurde anschließend mit Einzelheften verschlossen. Zu Beginn der Behandlungsphase erhielten alle Tiere zusätzlich eine Bolus-Injektion von 200 mg/kg Levetiracetam i.p. (gelöst in 3 ml isotoner NaCl-Lösung), damit sofort therapeutisch wirksame Plasmaspiegel erreicht wurden.

Bei den aus den Tieren entnommenen Pumpen wurden die Restvolumina bestimmt. Die Pumpen aus der ersten Kontrollphase waren aufgrund ihrer längeren Verweildauer im Tier vollständig leer. Diese Pumpen wurden gereinigt und zur Desinfektion in 3 %ige Jod-Lösung über 24 h eingelegt. Sie wurden während der zweiten Kontrollphase (*postdrug period*) als Dummies erneut implantiert. Bei den Pumpen der ersten bzw. zweiten Behandlungswoche wurde das jeweilige

Restvolumen durch eine in die Pumpe eingeführte Spritze aspiriert. Anhand des ursprünglichen Füllvolumens und des Restvolumens konnte eine durchschnittliche Pump-Rate berechnet werden, die mit den Angaben des Herstellers in jedem Fall übereinstimmte.

Am Ende der ersten und der zweiten Behandlungswoche wurde während der Narkose zur Minipumpen-Implantation gleichzeitig Blut entnommen. Dazu wurde der retrobulbäre Venenplexus mittels der stumpfen Seite einer in der Mitte durchgebrochenen heparinisierten Hämatokritkapillare punktiert. Durch die Kapillare wurden ca. 500 µl Blut in einem Eppendorfhütchen aufgefangen, das 20 µl EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zur Gerinnungshemmung enthielt. Um retrobulbäre Nachblutungen zu vermeiden, erfolgte anschließend eine kühlende Augenkompresse. Das Blut wurde unmittelbar im Anschluß an die Operation bei 12000 Umdrehungen/min in einer Eppendorf Zentrifuge für die Dauer von 3 min zentrifugiert. Das abpipettierte Plasma wurde bis zur Abgabe an UCB Pharma (Braine-l'Alleud, Belgien) bei – 25 °C aufbewahrt. UCB Pharma bestimmte die quantitativen Plasmaspiegel von Levetiracetam mittels HPLC (high pressure liquid chromatography).

3.2.2.3.3 Videoüberwachung während Behandlungs- und Vehikelphasen

Über die gesamten 6 Wochen der Studie wurden die Ratten konstant von Montag bis Freitag in den 12 Stunden der Hellphase mittels Videoaufzeichnungen überwacht. Die Operationen erfolgten grundsätzlich freitags nach Abschluß der Aufzeichnung, um die Überwachung so wenig wie möglich zu beeinflussen. Makrolonkäfige Typ IV wurden mit einer Kunststoffbarriere (Vorex®), die mit Silikon im Käfig befestigt wurde, in zwei Sektionen unterteilt. Bis auf 2 Tiere, die sich in Vorversuchen als verträglich erwiesen, saßen die Ratten getrennt. Jedes Tier hatte freien Zugang zu Wasser, Pellets wurden täglich erneuert. Durch diese Anordnung war eine simultane Aufzeichnung aller 9 Tiere bei guter Beurteilbarkeit des individuellen Verhaltens mit einer Kamera möglich. Die Auswertung der Videobänder erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben. Aus den protokollierten Daten ließ sich für jede der drei Versuchsphasen für jedes Tier die Zahl der Anfälle, die durchschnittliche Krampfschwere und –dauer sowie die kumulative Krampfdauer als Summe der Längen der einzelnen Anfälle bestimmen.

Die zunächst unter den Käfigen befestigten Beschleunigungssensoren waren während dieser Studie keine Hilfe. Dies hatte zwei Gründe. Zum einen waren aufgrund des höheren Gewichts und der Ausmaße dieser Käfige bei ungünstiger Positionierung des Tieres verschiedene motorische Aktivitäten kaum oder nicht voneinander zu unterscheiden. Zum anderen wurden während dieser Studie zum ersten Mal fokale Anfälle, die nicht sekundär generalisierten, im Lithium-Pilocarpin-Modell beobachtet. Diese Anfälle gehen nur mit einer sehr geringen motorischen Aktivität einher und sind folglich nicht mit „Bewegungsmeldern“ zu detektieren.

3.2.3 Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala

Basierend auf einer Studie von NISSINEN et al. (2000), in der bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten ein selbsterhaltender Status epilepticus durch elektrische Stimulation im lateralen Nukleus der Amygdala induziert wurde, sollte ein modifiziertes elektrisches Epilepsiemodell im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmakologie etabliert werden. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit den bisher in diesem Institut erhobenen Ergebnissen in Anfalls- und Epilepsiemodellen zu ermöglichen, wurde die Modelletablierung parallel an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley- sowie weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt. Es sollte untersucht werden, inwieweit sich die beiden Geschlechter bzw. Stämme in der Art des selbsterhaltenden Status epilepticus und den später auftretenden spontanen Anfällen unterscheiden. Wie bereits erwähnt war die Erstellung des Modells sowie die Verhaltensbeobachtung der Tiere eine Aufgabe dieser Arbeit, während die anschließenden neuropathologischen Untersuchungen von C. BRANDT (2002) durchgeführt worden sind.

3.2.3.1 Elektrodenimplantation

Die Elektrodenimplantation erfolgte eine Woche nach Ankunft der Tiere in den rechten basolateralen Nukleus der Amygdala (BLA). Zur Narkose wurde Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml destilliertem Wasser i.p.) verwendet. Bei Bedarf wurde die Narkose mit einem Drittel der Anfangsdosis verlängert. Zunächst wurde der Operationsbereich geschoren und die Haut anschließend mit 70 %igem Alkohol

desinfiziert. Zur Fixierung des Schädels wurden die Ratten mit Hilfe zweier Ohr- und eines Schneidezahnbalkens in einem stereotaktischen Apparat eingespannt. Die Oberkieferhalterung war dabei auf den für den Stamm entsprechenden Wert ventral der Intraaurallinie eingestellt (Tabelle 6). Dadurch wird gewährleistet, daß Lambda und Bregma (Abbildung 4), die Bezugspunkte des stereotaktischen Atlas von PAXINOS und WATSON (1998), auf gleicher Höhe liegen. Nach wiederholter Desinfektion wurde eine Inzision von ungefähr 3 cm Länge in rostrocaudaler Richtung gesetzt. Faszien und Knochenhaut wurden großflächig bis zur angrenzenden Muskulatur entfernt und der nun freiliegende Schädelknochen mit 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung gesäubert. Neben der Blutstillung dient dies auch der deutlicheren Darstellung von Bregma, dem Schnittpunkt der Sutura sagittalis und der Sutura coronalis. Bregma ist nach dem Atlas von PAXINOS und WATSON (1998) der Bezugspunkt für die Angabe der drei Raumkoordinaten rostrocaudal, lateral und ventral einer bestimmten Hirnregion (Tabelle 6).

Mit Hilfe einer Nadel wurden die Koordinaten von Bregma bestimmt und davon ausgehend die Koordinaten für die Trepanationen der Schädeloberfläche berechnet und entsprechend markiert. Mit einem 0,9 mm starken Dentalbohrer wurde die Schädeldecke unter Schonung der Dura mater an vier Stellen trepaniert: dem Bohrloch für die bipolare Elektrode gegenüberliegend das Bohrloch für die Erdungsschraube sowie zwei weitere Bohrlöcher rostral und caudal der Elektrode im Os frontale dexter und Os parietale dexter für die Fixationsschrauben (Abbildung 4). Eine Erdungsschraube setzt sich zusammen aus einer Schädelschraube und einem teflon-isolierten Draht, der mit einer Messingbuchse verbunden ist. Nachdem eventuell auftretende Blutungen gestillt worden waren, wurden Erdungs- und

	Schneidezahnbalken	**rostrocaudal**	**lateral**	**ventral**
Wistar	- 3,3	- 2,2	-4,8	- 8,5
Sprague-Dawley	- 3,9	- 2,2	- 4,7	- 8,7

Tabelle 6:
Übersicht über die Koordinaten in mm zu Bregma für die Implantation der Elektrode in die rechte basolaterale Amygdala bei Ratten der Stämme Wistar und Sprague-Dawley (männliche und weibliche Tiere). Die Koordinaten wurden in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Löscher bestimmt.

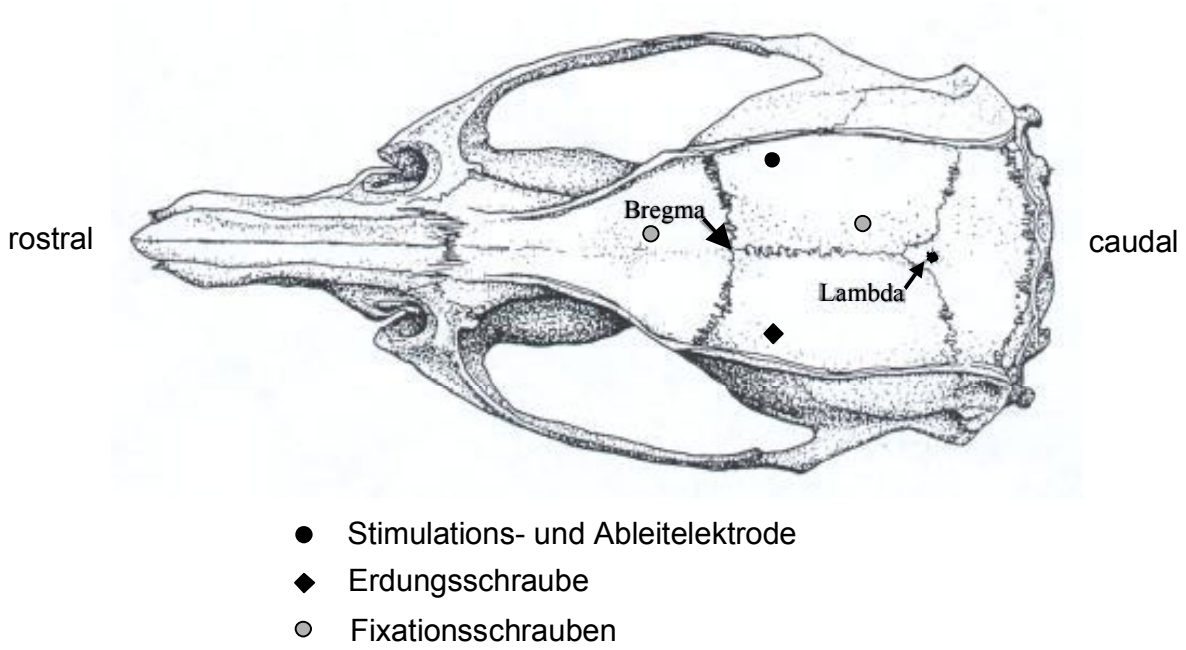


Abbildung 4:
Aufsicht auf den knöchernen Schädel der Ratte nach PAXINOS und WATSON (1998) mit Darstellung der Lokalisation von Stimulations- und Ableitelektrode, Erdungsschraube und Fixationsschrauben.

Fixationsschrauben in den Schädelknochen eingedreht. Anschließend wurde die bipolare Elektrode in der Halterung des Stereotakten befestigt, gerade ausgerichtet und erneut die Koordinaten der BLA anhand von Bregma bestimmt. Eine bipolare Elektrode besteht aus zwei umeinander gewundenen Drähten. Diese Edelstahldrähte haben einen Durchmesser von 0,25 mm und sind mit Teflon beschichtet. An einem Ende sind die Drähte jeweils mit einer Messingbuchse verbunden, durch die später der Anschluß an das Stimulationskabel erfolgt. An der Elektrodenspitze haben die Drähte einen Abstand von ca. 0,5 mm zueinander. Die Elektrode wurde entsprechend der Zielkoordinaten in das Gehirn abgesenkt. Sobald die Schädeloberfläche abgetrocknet war, wurde mit einer ersten Schicht eines kaltpolymerisierenden Kunststoffs (Paladur®) zunächst die Elektrode fixiert. Um Wundinfektionen zu verhindern, war dieser ersten Schicht Gentamicinsulfat zu 2,1 % beigemischt. Nach Trocknung des Zahnzements wurden die Drähte der bipolaren Elektrode unter Schonung der Teflonbeschichtung vorsichtig auseinandergewickelt und die beiden Messingbuchsen sowie die Buchse der Erdungsschraube mit einem dreipoligen Stecker verbunden. Dieser Stecker dient als Platzhalter und gewährleistet, daß die Buchsen im ausgehärteten Zahnzement so eingebettet sind,

daß das Stimulationskabel exakt angeschlossen werden kann. In mehreren Schritten wurde um sämtliche Metallteile ein Kunststoffaufbau geformt. Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethacridinlactat wurden die Wundränder mit Einzelheften aus nichtresorbierbaren Nahtmaterial adaptiert und der als Platzhalter dienende Stecker entfernt.
Zur Prophylaxe etwaiger Wundinfektionen wurden den Ratten direkt im Anschluß an die Operation 20 mg/kg Gentamicin i.m. sowie an den nächsten zwei Tagen dieselbe Dosis s.c. injiziert. An den darauffolgenden fünf Tagen wurden zweimal täglich 100 mg/kg Chloramphenicol-Succinat i.m. appliziert.

3.2.3.2 Elektrische Induktion eines Status epilepticus

Die elektrische Stimulation wurde 13 - 19 Tage nach der Elektrodenimplantation durchgeführt. Da nur zwei Stimulationseinheiten zur Verfügung standen, wurden die Tiere nacheinander stimuliert, so daß der individuelle Versuchsbeginn zwischen 8.00 – 14.00 Uhr lag. Zunächst wurden die Ratten gewogen, die rektale Körpertemperatur gemessen und ein basales EEG über ca. 5 min aufgezeichnet. Anschließend startete die 25-minütige Stimulation. Die Stimulationsbedingungen wurden in Vorversuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Löscher bestimmt. Der Reizstrom setzte sich aus bipolaren Einzelpulsen zusammen, wobei die Einzelpulsdauer 1 ms betrug und pro Sekunde zwei Pulsserien über jeweils 100 ms mit einer Frequenz von 50 Hz ausgelöst wurden. Mit einer Stromstärke von 700 µA wurde kontinuierlich über 25 min gereizt. Vokalisierte ein Tier kurz nach Beginn der Stimulation, wurde diese sofort abgebrochen und die Ratte als nicht stimulierbar bezeichnet. Während der Stimulation wurde jegliche Krampfaktivität mit Schwere, ungefährer Dauer und Zeitpunkt des Auftretens protokolliert. Nach Beendigung der Stimulation wurde jede Ratte mittels EEG-Aufzeichnung hinsichtlich anhaltender Krampfaktivität beobachtet. Als Kriterium galten mindestens 3 Spikes pro Sekunde mit einer doppelt so hohen Amplitude wie das Ruhe-EEG. Wurde diese Bedingung nicht erfüllt, wurde die elektrische Stimulation für weitere 5 min gestartet und anschließend erneut ein EEG aufgezeichnet.
Nach Beendigung der Stimulation konnte der induzierte Status epilepticus anhand der beobachteten Krampfaktivität (siehe Kap. 3.2.1) der Tiere in drei Typen unterteilt werden:

- *fokaler Status epilepticus* (Krampfschwere Stadium 1 – 3)
- *fokaler Status epilepticus mit einzelnen generalisierten Anfällen* (Krampfschwere Stadium 1 – 3, unterbrochen von einzelnen Anfällen des Stadiums 4 – 6)
- *generalisierter Status epilepticus* (Krampfschwere 4 – 6).

Ein generalisierter Status epilepticus ging grundsätzlich nach einer gewissen Zeit in einen fokalen Status epilepticus mit oder ohne generalisierte Anfälle über. Für die Länge des Status epilepticus wurden von daher bei diesen Tieren zwei Angaben gemacht. Zunächst die Länge der generalisierten Phase und dann die Gesamtdauer der epileptischen Aktivität. Da kontinuierliche EEG-Aufzeichnungen aus technischen Gründen nicht möglich waren, wurde die Länge des Status epilepticus durch Beurteilung der sichtbaren motorischen Krampfaktivität der einzelnen Ratten bestimmt. Jedes Tier wurde stündlich für 10 min beobachtet und anhand des Verhaltens als noch im Status epilepticus befindlich oder nicht eingestuft. Wenn diese Entscheidung nicht eindeutig zu treffen war, wurde das EEG als Hilfsmittel hinzugezogen, wobei hier mehr als 1 Spike in der Sekunde mit doppelter Amplitude wie das Ruhe-EEG als Fortbestehen des Status epilepticus bewertet wurde. Hierzu wurden die Spikes im EEG über einen Zeitraum von 5 Minuten ausgezählt. Die Angabe über die Länge des Status epilepticus konnte für einige Tiere nur in einem groben Zeitrahmen erfolgen. Da die Verhaltensbeobachtung der Tiere in der

	weibliche Wistar	weibliche Sprague-Dawley	männliche Sprague-Dawley
Elektroden-implantation	n = 22	n = 10	n = 14
elektrische Stimulation	n = 18	n = 10	n = 12
Überwachung auf spontane Anfälle	n = 11	n = 8	n = 12
Frequenz-Analyse	n = 4	n = 7	n = 10

Tabelle 7:
Eingesetzte Tierzahlen für die Erstellung des Modells der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala und Gruppengröße (n) bei nachfolgenden Untersuchungen.

Dunkelphase eingestellt wurde, war abhängig vom Beginn der Stimulation für einige Ratten die Beobachtungsphase entsprechend kürzer und konnte erst am nächsten Morgen fortgesetzt werden.
Obwohl der Status epilepticus bei diesen Tieren im Gegensatz zu Ratten aus der Lithium-Pilocarpin-Studie nicht abgebrochen wurde, war das Allgemeinbefinden der Tiere an den folgenden Tagen in der Regel als gut zu bezeichnen. Durch tägliches Wiegen wurde die Gewichtsentwicklung der Ratten beobachtet und gegebenenfalls die normalen Futterpellets in Wasser eingeweicht in einer Petrischale in den Käfig gestellt.

3.2.3.3 Detektion von spontan auftretenden Anfällen: EEG- und Videoaufzeichnungen

Die systematische Überwachung der Ratten auf spontane Anfälle begann durchschnittlich 4 Wochen nach Induktion des Status epilepticus. Entsprechend den Angaben in Kapitel 3.2.2.2 wurde auch hier nach einem k.o.-Verfahren vorgegangen. Die Mindestaufnahmezeit pro Tier betrug 12 h pro Woche und wurde je nach Auslastung der Aufnahmestation auf bis zu 56 h pro Woche erhöht. Tiere, die nach über 300 h Überwachung keinen epileptischen Anfall gezeigt hatten, wurden als anfallsfrei eingestuft und die Überwachung eingestellt. Alle Aufzeichnungen wurden analog zu dem Lithium-Pilocarpin-Modell während der Hellphase angefertigt.
Die Tiere wurden mittels EEG und Video überwacht. Für die EEG-Aufzeichnung wurden ebenfalls der CyberAmp und die PowerLab-Chart-Kombination benutzt. Die einzige Modifizierung war die 100fache Verstärkung des Signals durch den CyberAmp. Da der PowerLab acht eingehende Signale parallel verarbeiten kann, war theoretisch die Aufzeichnung von 8 Tieren gleichzeitig möglich. In der Regel wurde täglich aber nur bei 4 Tieren das EEG abgeleitet, da die anderen vier Kanäle durch die Beschleunigungssensoren besetzt waren. Der simultane Einsatz von EEG und „Bewegungsmelder“ war nicht störungsfrei möglich. Die zusätzliche Erdung von einem der Beschleunigungssensoren mußte entfernt werden und dafür der PowerLab zusätzlich geerdet werden.
Die Länge der EEG-Aufzeichnungen war grundsätzlich kürzer als 12 h, da es nicht möglich war, die Tiere über Nacht an den EEG-Kabeln zu belassen. Aus diesem Grund mußten die Tiere erst morgens an die Kabel angeschlossen werden, so daß

die Hirnströme täglich über 9 – 10 h gemessen werden konnten. In die EEG-Kabel war ein Telefonentzwirler eingebaut, damit sich die Tiere frei bewegen können, ohne die Verbindungskabel aufzudrehen. Die aufgezeichneten EEGs wurden im Programm „Chart4“ in der um den Faktor 10 gestauchten Version analysiert und die registrierten Anfälle anhand der entsprechenden Videosequenz hinsichtlich Krampfschwere und –dauer näher charakterisiert. Ratten, bei denen sich während der Überwachungsphase der Elektrodenaufbau vom Schädel löste, wurden nur noch mittels Video überwacht. „Bewegungsmelder“ erwiesen sich in diesem Tiermodell als zu ungenau bezüglich der Detektion von fokalen Anfällen.
Die Videoaufzeichnungen erfolgten analog zu den Beschreibungen in Kapitel 3.2.2.2. In Phasen, in denen die Ratten noch nicht ans EEG angeschlossen waren oder sich ein Tier vom EEG-Kabel gelöst hatte, wurden die Videos vollständig im schnellen Vorlauf des Videorecorders angeschaut. Alle aufgezeichneten und zufällig während Manipulationen an den Tieren beobachteten epileptischen Anfälle wurden mit Datum, Uhrzeit, Krampfschwere und –dauer protokolliert.

Aus der Literatur (NISSINEN et al. 2000) ist bekannt, daß die individuelle Anzahl spontaner Anfälle nach elektrischer Induktion eines Status epilepticus relativ konstant ist. Da die Auslastung des Überwachungsraumes und der hohe Zeitaufwand keine kontinuierliche Überwachung der Tiere zuließen, wurde eine **Frequenz-Analyse** der Anfälle wie im Lithium-Pilocarpin-Modell durchgeführt. Dazu wurden 21 Tiere etwa 4 Monate nach Induktion des Status epilepticus an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h in der Hellphase wie zuvor beschrieben überwacht (siehe Tabelle 7).

3.2.3.4 Pharmakologische Untersuchung – Levetiracetam

Im Modell der BLA-Stimulation sollte die Wirkung einer chronischen Behandlung mit Levetiracetam auf die Entwicklung von spontanen Anfällen nach elektrischer Induktion eines Status epilepticus untersucht werden. Im Vergleich zwischen einer Substanz- und einer nicht behandelten Kontrollgruppe sollte festgestellt werden, ob Levetiracetam antiepileptogenes oder antikonvulsives Potential in diesem Epilepsiemodell hat, d.h. das Auftreten von spontanen Anfällen bei behandelten Tieren verhindert oder die Zahl der Anfälle reduziert.

3.2.3.4.1 Auswahl der Tiere und Versuchsdesign

Aufgrund der Ergebnisse der Etablierung des Modells der elektrischen BLA-Stimulation wurden in dieser Studie weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Elektrodenimplantation und die elektrische Induktion des Status epilepticus erfolgten wie in Kapitel 3.2.3.1 bzw. 3.2.3.2 beschrieben. Abweichend war nur der Zeitraum zwischen Operation und Stimulation, der bei diesen Ratten zwischen 28 und 34 Tagen lag. Bei allen Tieren wurde vor der Stimulation und etwa 2 h nach Beginn der Stimulation im Status epilepticus die rektale Körpertemperatur gemessen. Aus einer Gruppe von insgesamt 40 Tieren mit Status epilepticus wurden 20 Tiere für die Studie ausgewählt. Davon zeigten 18 Ratten einen generalisierten und 2 Ratten einen fokalen Status epilepticus mit zahlreichen generalisierten Anfällen. Von Tieren mit diesen Statustypen war aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt, daß sie sicher spontane Anfälle entwickeln. Die Tiere wurden zufällig und gleichmäßig auf die Behandlungs- und Kontrollgruppe verteilt. Zwei Ratten verstarben während des ersten Wechsels der Minipumpen, so daß die Kontrollgruppe nur noch aus 8 Tieren bestand.

Genau 24 h nach Induktion des Status epilepticus wurde jedem Tier die erste Minipumpe implantiert. Diese Pumpe enthielt für die Behandlungsgruppe Levetiracetam, für die Kontrollgruppe isotone Kochsalzlösung. Die Pumpen wurden alle zwei Wochen über einen Zeitraum von 8 Wochen ersetzt, wobei bei jedem Wechsel auch Blutproben von jedem Tier entnommen wurden. Nach der 4. Behandlungs- bzw. Kontrollwoche startete die Überwachung und wurde bis zur 12. Woche, d.h. 4 Wochen nach Behandlungsende, fortgesetzt (Abbildung 5). Die Tiere wurden alternierend in zwei gemischten, aus behandelten und nichtbehandelten Tieren bestehenden Gruppen jede zweite Woche von Montag bis Freitag 12 h in der Hellphase überwacht. Die individuelle Überwachungszeit war damit für jedes Tier 2 Wochen unter Substanz bzw. Vehikel und 2 Wochen in der darauffolgenden Periode. In der „überwachungsfreien“ Woche fanden jeweils die Implantationen der Minipumpen statt. Von jeder Ratte wurde ein- bis zweimal wöchentlich das Körpergewicht und die rektale Körpertemperatur bestimmt.

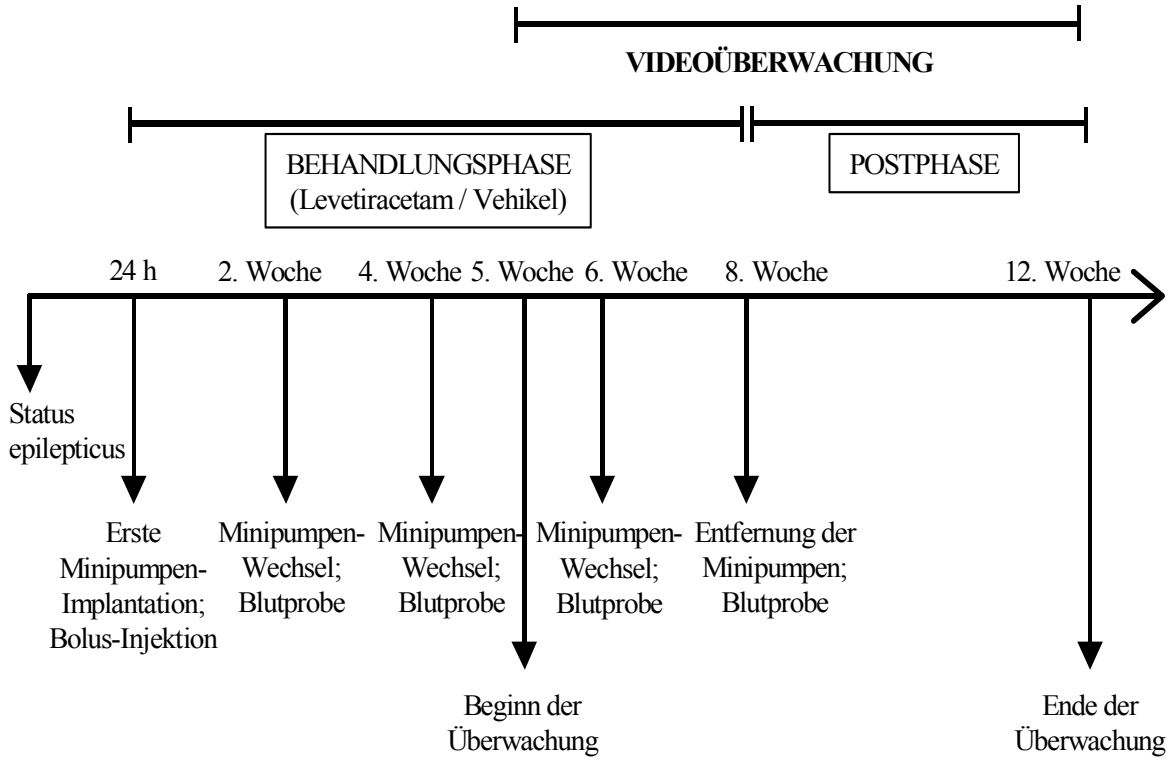


Abbildung 5:
Aufbau der Studie zur Untersuchung der Wirkung von Levetiracetam auf die Entwicklung von spontanen Anfällen nach elektrischer Induktion eines Status epilepticus.

3.2.3.4.2 Vorbereitung und Implantation der osmotischen Minipumpen

In dieser Studie wurden osmotische Minipumpen des Typs 2ML2 (ALZET, ALZA Corp., CA, USA) eingesetzt. Diese Pumpen werden mit 2 ml befüllt und geben über einen Zeitraum von 2 Wochen konstant 5 µl/h ab. Die generellen Vorgehensweisen zur Befüllung und Präinkubation der Pumpen, der Implantationstechnik und der Bestimmung der Restvolumina sind in Kapitel 3.2.2.3.2 dargestellt.

Tiere der Behandlungsgruppe erhielten Pumpen, die mit 1000 mg Levetiracetam gelöst in 2 ml aqua dest. gefüllt waren. In die Pumpen der Kontrollgruppe wurden 2 ml isotone Kochsalzlösung eingebracht. Bei der ersten Operation erhielten alle Tiere eine Bolus-Injektion, entsprechend der Gruppenzugehörigkeit entweder 200 mg/kg Levetiracetam gelöst in NaCl-Lösung (Injektionsvolumen 3 ml/kg) oder 3 ml/kg NaCl-Lösung. Die Applikation der Bolus-Injektion sowie alle Implantationen waren verblindet, d.h. es war nicht bekannt, welches Tier welcher Gruppe angehörte.

Bei dem ersten subkutanen Einbringen der Minipumpen, 24 h nach Beginn der elektrischen Stimulation, wurden die Ratten mit Methohexital (30 mg/kg i.p.) und

Fentanyl (0,05 mg/kg i.p.) anästhesiert. Während des ersten Wechsels der Pumpen nach 2 Wochen, hatten 2 Ratten der Kontrollgruppe einen Atemstillstand unter dieser Narkose und verstarben. Daraufhin wurde die Narkose geändert und Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml aqua injectabila i.p.) verwendet.
Nach der 2., 4., 6. und 8. Woche der Behandlungsphase wurde von jedem Tier während der Narkose zur Minipumpen-Implantation gleichzeitig retrobulbär Blut entnommen. Die Entnahme, Aufbereitung und Lagerung des Blutes erfolgte dabei wie bereits in Kapitel 3.2.2.3.2 beschrieben. Nach Aufdeckung der Gruppenzugehörigkeit jedes Tieres am Ende der Studie wurden nur die Proben der mit Levetiracetam behandelten Ratten an UCB Pharma (Braine-l'Alleud, Belgien) geschickt. Dort wurden die quantitativen Plasmaspiegel von Levetiracetam mittels HPLC bestimmt.

3.2.3.4.3 EEG- und Videoüberwachung

Über die gesamte Zeitdauer der Studie wurden alle Anfälle protokolliert, die während Manipulationen an den Tieren beobachtet wurden.
Die Videoüberwachung begann 34 Tage nach der elektrischen Stimulation. Jedes Tier wurde in einem Einzelkäfig jede zweite Woche 2 Monate lang von Montag bis Freitag in der Hellphase 12 h aufgezeichnet. Zusätzlich wurden von jeder Ratte pro Überwachungswoche an mindestens 2 Tagen EEG-Aufzeichnungen angefertigt und unabhängig von den Videos analysiert. Die Videobänder wurden im schnellen Vorlauf des Videorecorders betrachtet, wobei die Auswertung verblindet war. Datum, Uhrzeit, Krampfschwere und –dauer wurden für jeden Anfall notiert. Die kumulative Krampfdauer ergab sich als Summe der Längen der einzelnen Anfälle in der entsprechenden Phase.

3.2.3.5 Histologische Aufarbeitung und Bestimmung der Elektrodenlokalisation

Die exakte Lokalisation von implantierten Elektroden bei Tieren mit spontanen epileptischen Anfällen über einen Zeitraum von mehreren Monaten erweist sich meist aufgrund von Veränderungen im Gehirn (Läsionen, Hydrocephalus) als nicht möglich (BRANDT 2002). Zur Überprüfung des Versuchsprotokolls wurden daher in

Vorversuchen Probeimplantationen an jeweils 5 Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten vorgenommen, diese anschließend transkardial perfundiert und der Sitz der Elektrode an histologischen Schnitten der entsprechenden Gehirnregion kontrolliert.

Zur Perfusion wurden Abdomen und Thorax der Ratten unter einer tiefen Chloralhydrat-Narkose (etwa 500 mg/kg i.p.) eröffnet. Anschließend wurde das Herz freipräpariert und eine Knopfkanüle über die linke Herzkammer in die Aorta eingeführt. Nach Eröffnung der rechten Vorkammer wurde über die Knopfkanüle 0,01 M phosphatgepufferte NaCl-Lösung (pH 7,4) in den Körperkreislauf gespült. Wenn das Blut annähernd vollständig aus dem Körper entfernt war, wurde die Spülung mit 250 ml einer 4 %igen 0,1 M phosphatgepufferten Formaldehyd-Lösung fortgesetzt. Hierdurch wurde das Gehirn für die histologische Aufarbeitung fixiert. Nach Entfernen des Elektrodenaufbaus wurde der Schädel eröffnet, das fixierte Gehirn entnommen und zur Kryoprotektion für mindestens 48 h in 40 ml einer 0,1 M phosphatgepufferten 30 %igen Saccharose-Lösung bei 5 °C gelagert. Das Anfertigen der 52 µm dicken histologischen Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Frigomobil Modell 1205, Fa. Jung, Heidelberg). Jeder zweite Schnitt wurde in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen und auf entfettete Objektträger mit Hilfe von flüssiger Gelatine-Chromalaun-Lösung aufgezogen. Nach der Trocknung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe hydratisiert (jeweils 3 min in 96, 70, 50 %igem Alkohol sowie destilliertem Wasser), für etwa 90 sec in einer wässrigen Thionin-Lösung gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Dauer und Konzentration entsprachen der absteigenden Reihe) wieder entwässert. Die Konservierung der Schnitte erfolgte für jeweils 3 min in einer Terpineol-Xylolersatzmedium (XEM)-Mischung und zweimal in XEM-Lösung. Direkt im Anschluß wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Deckgläschen und Entellan® eingedeckt.

Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Auflichtmikroskop bei 25facher Vergrößerung durchgemustert und der tiefste Punkt des Elektrodenstichkanals bestimmt. Die Koordinaten der Elektrodenspitze wurden anhand eindeutiger anatomischer Strukturen im Bereich der rechten ventralen Gehirnhälfte und unter Zuhilfenahme des Gehirnatlas von PAXINOS und WATSON (1998) ermittelt.

3.2.4 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem EDV-Programm Sigma-Stat 1.0 unter Windows durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Erstellung des Lithium-Pilocarpin-Modells:

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Die Bewertung der prozentualen Anteile von Ratten, die nach einmaliger oder fraktionierter Pilocarpin-Applikation einen Status epilepticus entwickelten, erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test. Der exakte Test nach Fisher wurde für den Vergleich der Mortalität sowie die Anzahl epileptischer Ratten zwischen den verschiedenen Gruppen verwendet, da hier einzelne Gruppengrößen kleiner fünf waren.

Die rektale Körpertemperatur vor Versuchsbeginn und im Status epilepticus wurde innerhalb bzw. zwischen den Versuchsgruppen mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Post hoc wurde der Student-Newman-Keuls-Test verwendet.

Die Auswertung der Entwicklung des Körpergewichts nach dem Status epilepticus erfolgte zwischen den Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und innerhalb einer Gruppe mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen. An letzteren schloß sich post hoc der Dunnett's-Test an, wobei als Kontrollgewicht das Gewicht am Tag der Status-Induktion verwendet wurde und jeweils mit dem Körpergewicht an den auf den Status folgenden Tagen verglichen wurde.

Die Längen der Latenzphasen zwischen den verschiedenen Gruppen wurden als parametrische Daten mit einfaktorieller Varianzanalyse untersucht. Die Gesamtzahl der während der Frequenz-Analyse ermittelten Anfälle wurde zwischen den Gruppen mit der nicht parametrischen Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis verglichen.

Erstellung des Modells der elektrischen BLA-Stimulation:

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Für die Auswertung der prozentualen Anteile weiblicher Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten bzw. männlicher Sprague-Dawley-Ratten mit einer bestimmten Art des selbsterhaltenden Status epilepticus wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Dieser Test wurde auch für den Vergleich der Mortalität zwischen den Geschlechtern und Stämmen herangezogen.

Die Beurteilung der Anzahl generalisierter Anfälle während der elektrischen Stimulation und induziertem Typ des Status epilepticus bzw. Geschlecht und Stamm der Tiere wurde mittels der nicht parametrischen Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Die Kriterien „Latenz in Minuten bis zum Auftreten des ersten generalisierten Anfalls“ und „kumulative generalisierte Krampfdauer“ während der Stimulation wurden mit dem gleichen Test zwischen den Status-Typen bzw. Geschlechtern und Stämmen verglichen. Die Längen der drei verschiedenen Status-Typen wurden ebenfalls mit dem Test nach Kruskal-Wallis untersucht. Gegebenenfalls wurde der Dunn’s-Test post hoc verwendet.

Die während der Stimulation ermittelten Werte hinsichtlich der Latenz bis zum ersten generalisierten Anfall, der Anzahl generalisierter Anfälle und der kumulativen generalisierten Krampfdauer sowie die Längen der induzierten Status epilepticus wurden für Ratten mit einem fokalen Status epilepticus weitergehend ausgewertet. Die entsprechenden Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt, in Tiere, die später spontane Anfälle entwickelten, und Tiere, bei denen keine spontanen Anfälle registriert wurden. Um Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festzustellen, wurde der Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Die rektale Körpertemperatur von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten vor und 2 h nach Beginn der Stimulation im generalisierten oder fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen wurde zunächst mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Als post hoc-Test wurde der Student-Newman-Keuls-Test eingesetzt.

Der Anteil epileptischer Ratten zwischen den Geschlechtern und Stämmen bzw. den verschiedenen Status-Typen wurde mit dem exakten Test nach Fisher verglichen. Die Länge der Latenzphase bis zum ersten spontanen Anfall in diesen Gruppen wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Die Gesamtzahl der während der Frequenz-Analyse ermittelten Anfälle wurde zwischen den Gruppen mit der nicht parametrischen Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis ausgewertet.

Für den Vergleich des Überwachungsaufwands im Lithium-Pilocarpin-Modell und dem Modell der elektrischen BLA-Stimulation wurde der Chi-Quadrat Test verwendet.

Wirkung von Levetiracetam auf spontane Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell:

Der Vergleich zwischen den Dosierungen und Blutplasmaspiegeln nach der ersten und zweiten Behandlungswoche wurde mit einem t-Test für verbundene Daten

durchgeführt. Zur Bestimmung von Korrelationen zwischen den Dosierungen und Plasmaspiegeln wurde die Methode nach Pearson für parametrische Daten verwendet.

Alle Tests hinsichtlich der Zahl der Anfälle und der Krampfparameter wurden einseitig vorgenommen, da die Arbeitshypothese von einer antikonvulsiven Wirkung des Levetiracetams ausging. Die Ergebnisse der *Predrug*, *Drug* und *Postdrug Phase* wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Für den Vergleich zwischen den einzelnen Phasen bzw. Wochen wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verwendet.

Wirkung von Levetiracetam auf die Entwicklung von spontanen Anfällen im Modell der elektrischen BLA-Stimulation:

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Die Entwicklung des Körpergewichts wurde innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppe mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen ausgewertet, zur Feststellung möglicher Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse verwendet. Die Dosierungen sowie Blutplasmaspiegel von Levetiracetam wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen innerhalb der Behandlungsdauer von 8 Wochen verglichen. Der Student-Newman-Keuls-Test wurde post hoc eingesetzt. Zur Bestimmung von Korrelationen zwischen Körpergewicht, Dosierungen und Plasmaspiegeln wurde die Methode nach Pearson für parametrische Daten verwendet.

Innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden Unterschiede in der Zahl, der Dauer und der kumulativen Krampfdauer der Anfälle zwischen Substanz- bzw. Vehikelphase und der anschließenden *Post* Phase mit einem t-Test für gepaarte Daten ausgewertet, für die Krampfschwere wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen eingesetzt. Entsprechend wurden Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe mit einem Student’s t-Test und dem Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben verglichen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Detektion spontan auftretender Anfälle

Im Rahmen der Etablierung von zwei Tiermodellen mit spontanen epileptischen Anfällen sollte, neben den „klassischen“ Überwachungsmethoden der Tiere mittels Video- und EEG-Aufzeichnungen, eine neue Vorgehensweise zur Anfallsdetektion eingesetzt und auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden. Hierzu wurden unter den Tierkäfigen befestigte Beschleunigungssensoren als „Bewegungsmelder“ verwendet und die registrierten Bewegungsmuster anschließend ausgewertet.

4.1.1 Beschleunigungssensoren

Beschleunigungssensoren wurden bereits in der Diplomarbeit von VOIGT (1999) eingesetzt. Allerdings beschreibt er zahlreiche Störungen, die zum großen Teil die Aufzeichnungen so gravierend beeinflußten, daß eine gezielte Anfallsdetektion mit dem von ihm verwendeten Aufbau nicht möglich war. Diese Probleme wurden von mir im Rahmen der vorliegenden Arbeit behoben.

Eine möglichst störungsfreie Funktion der Beschleunigungssensoren war nur möglich, wenn einer der verwendeten Beschleunigungssensoren zusätzlich geerdet wurde. Das Hintergrundrauschen war in diesem Fall mit einer maximalen Amplitude von ± 1,5 mV bei einem konstanten Erscheinungsbild gering und störte nicht die Registrierung von Bewegungsaktivitäten (Abbildung 6 a). Bei der gleichzeitigen Nutzung der Überwachungseinheit für EEG-Aufzeichnungen mußte allerdings die zusätzliche Erdung entfernt werden, um eine ausreichende Qualität der EEG-Ableitungen zu gewährleisten. Dies führte an den „Bewegungsmeldern“ zu Störungen (Abbildung 6 b), die durch verschiedene Modifikationen am Versuchsaufbau nicht behoben werden konnten und die gesamte Aufzeichnung beeinflußten. Diese Störungen bildeten Wellen unterschiedlicher Länge, wobei die Signale mit einer konstanten Frequenz von 50 Hz und einer maximalen Amplitudendifferenz von 10 mV auftraten. Generalisierte Krampfaktivität war in der Regel trotz des starken Hintergrundrauschens gut zu erkennen. Für die Beschreibung und Auswertung normaler Bewegungsmuster und motorischer Krampfaktivität hinsichtlich der maximalen Amplitudendifferenz, Frequenz und Dauer wurden nur störungsfreie Aufzeichnungen verwendet.

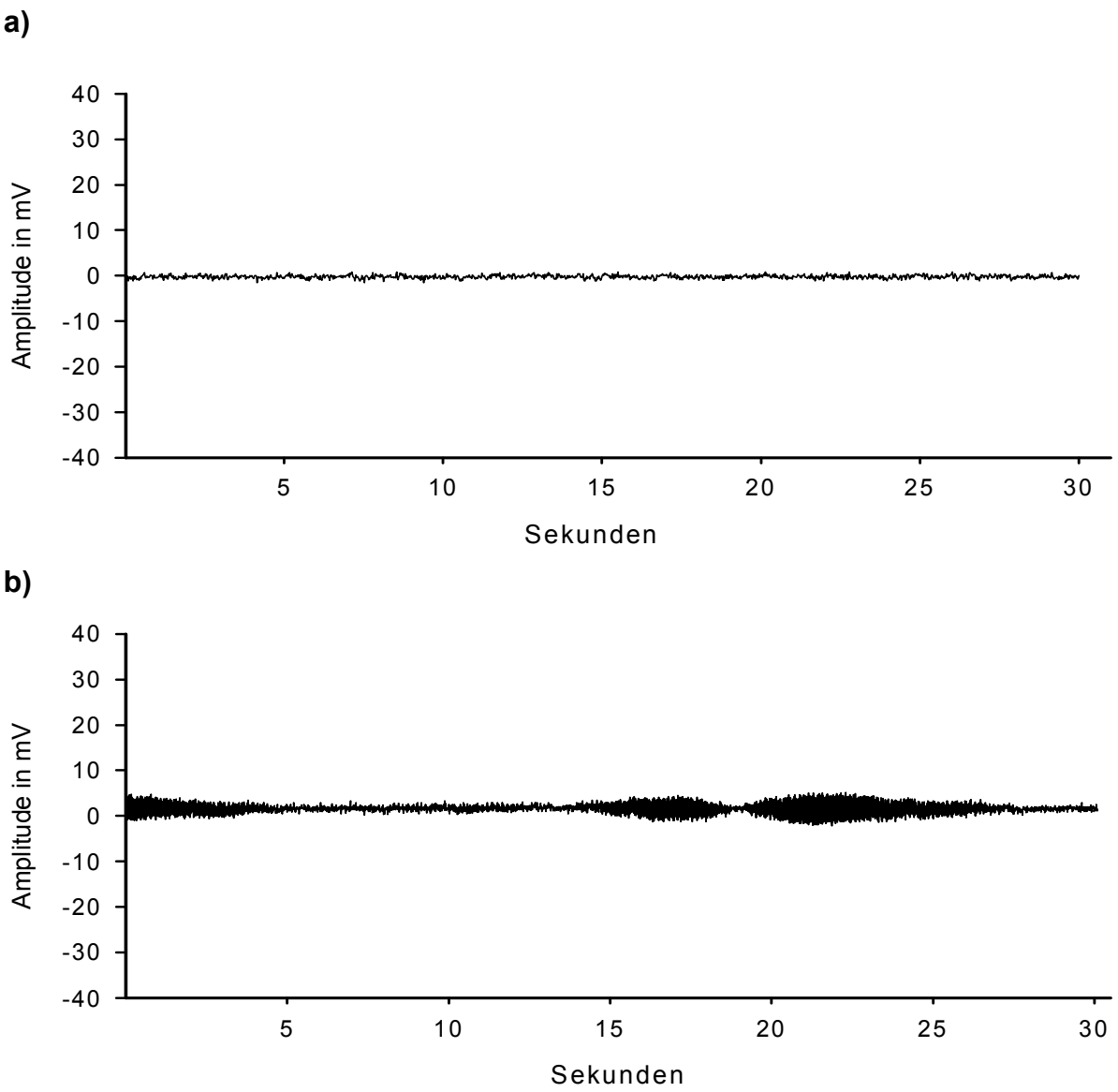


Abbildung 6:
Darstellung der Spannungsamplitude des Hintergrundrauschens eines Beschleunigungssensors
a) mit zusätzlicher Erdung.
b) ohne zusätzliche Erdung. Es traten unterschiedlich lange, wellenförmige Störungen mit einer konstanten Frequenz von 50 Hz und einer maximalen Amplitude von ± 5 mV auf.

4.1.1.1 Aufzeichnung normaler Verhaltensweisen

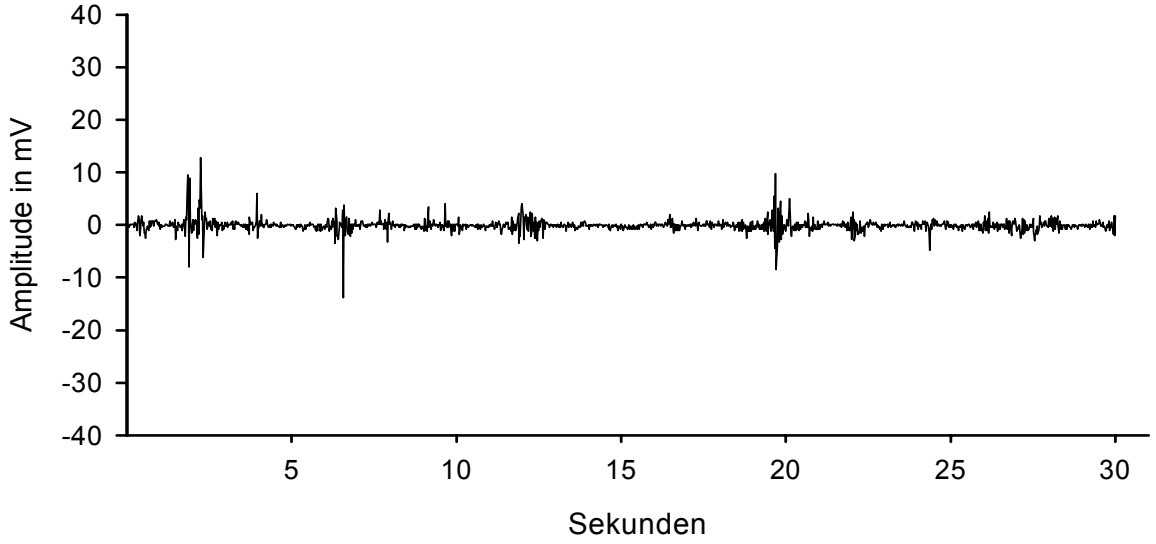
Das normale Verhalten einer Ratte spiegelte sich in mehr oder weniger stark ausgeprägten Bewegungsmustern wider, wobei starke individuelle Unterschiede zwischen den Tieren bestanden. Die folgende Beschreibung dieser Muster faßt zusammen, wodurch bestimmte Verhaltensweisen in der Regel charakterisiert waren.

Umherlaufen im Käfig stellte sich durch Signale über einen längeren Zeitraum dar, die durch bewegungslose Pausen, in denen die Tiere schnüffelten oder sich

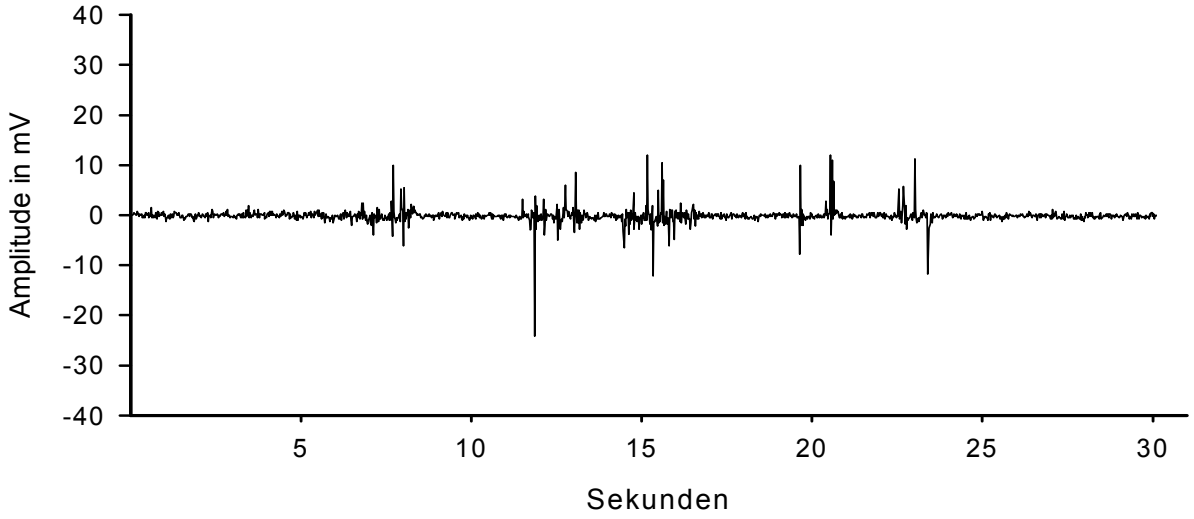
umsahen, unterbrochen wurden (Abbildung 7 a). Die Spannungsamplituden der Signale waren unregelmäßig und eher gering, konnten im Einzelfall aber große Differenzen von bis zu 70 mV aufweisen. Die maximale Frequenz lag in der Regel deutlich unter 20 Hz. Körperpflege der Tiere (Putzen, Kratzen mit dem Hinterbein) äußerte sich in etwa 1 min langen Bewegungsmustern, in denen immer wieder kurze Pausen auftraten (Abbildung 7 b). Die Amplituden der Signale zeigten Schwankungen, einzelne Spitzen konnten Differenzen von über 70 mV aufweisen. Die Frequenz dieser Bewegungen variierte zwischen 10 und 30 Hz, wobei „Putzen“ im unteren und „Kratzen“ als eine sehr schnelle, rhythmische Bewegung im oberen Bereich lag. Besonders starke Signale wurden registriert, wenn die Ratten in der Einstreu gruben (Abbildung 7 c). Dieses Verhalten wurde meist über einige Minuten gezeigt, dazwischen traten immer wieder kurze Pausen ohne Bewegungsaktivität auf. Die Spannungsamplituden waren in der Regel größer als bei allen anderen normalen Verhaltensweisen, die Differenzen konnten Werte von deutlich über 100 mV erreichen. Die Frequenz dieses Bewegungsmusters lag unter 20 Hz. Signale, die die Tiere durch Fressen ihrer Pellets erzeugten (Bodenfütterung), waren in ihrer zeitlichen Ausdehnung sehr unterschiedlich und reichten von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten (Abbildung 7 d). Wie bei allen bisher beschriebenen Bewegungen konnten häufig Pausen beobachtet werden. Die Stärke der Signale bewegte sich meist zwischen ± 10 mV, in seltenen Fällen erreichten einzelne Spitzen ± 50 mV. Die Frequenz war mit unter 15 Hz als eher gering zu bezeichnen. Trinkwasser wurde den Tieren in Flaschen angeboten, die mit Bügeln an den für die Videoaufzeichnungen angefertigten Käfigdeckeln befestigt worden waren. Um diese zu erreichen, mußten sich die Ratten aufrichten, wobei sie sich während der Trinkens an den Deckeln festhielten. Dies führte zu einer deutlichen Übertragung der motorischen Aktivität auf die Beschleunigungssensoren (Abbildung 7 e). Signale konnten in der Regel anhaltend über einige wenige Minuten registriert werden. Ihre Amplitude war diskontinuierlich, einzelne hohe Spitzen mit ± 20 mV waren häufig eingestreut. Die Frequenz dieser Bewegung lag um 15 Hz.

Zusammengefaßt zeichneten sich die normalen Bewegungen der Ratten durch diskontinuierliche Muster wechselnder Intensität aus. Signale mit hoher Amplitude traten häufig als einzelne, gut abgesetzte Spitzen zwischen der aus Ausschlägen mit geringen Amplituden bestehenden Grundbewegung auf.

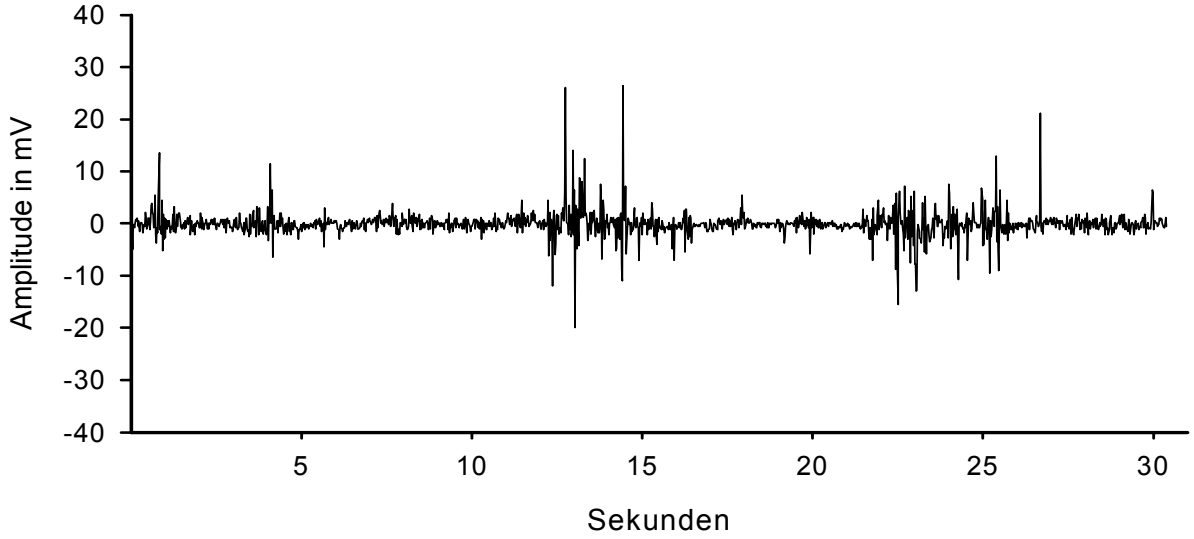
a)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

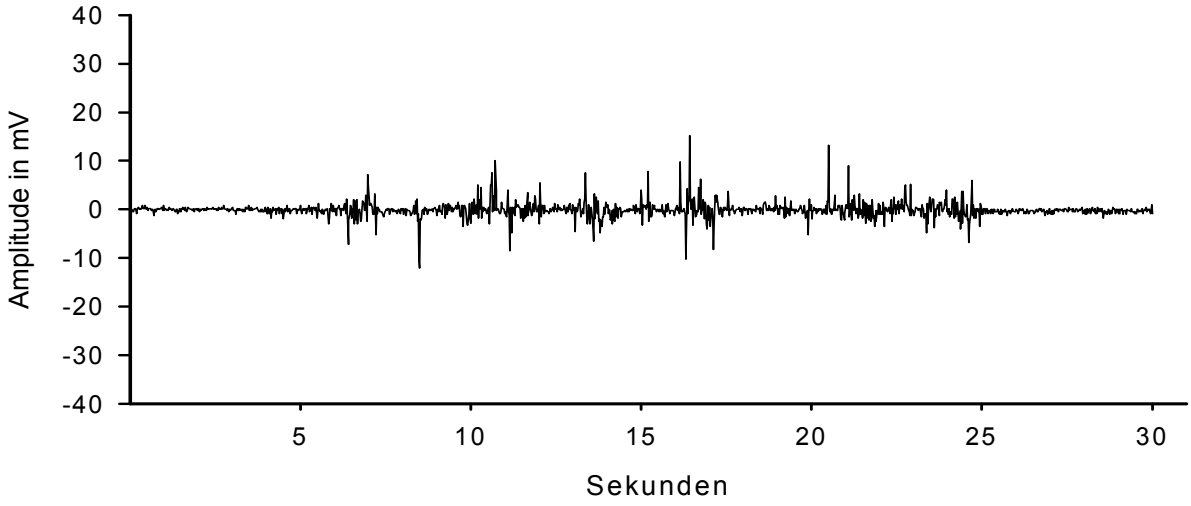
b)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

c)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

d)



e)

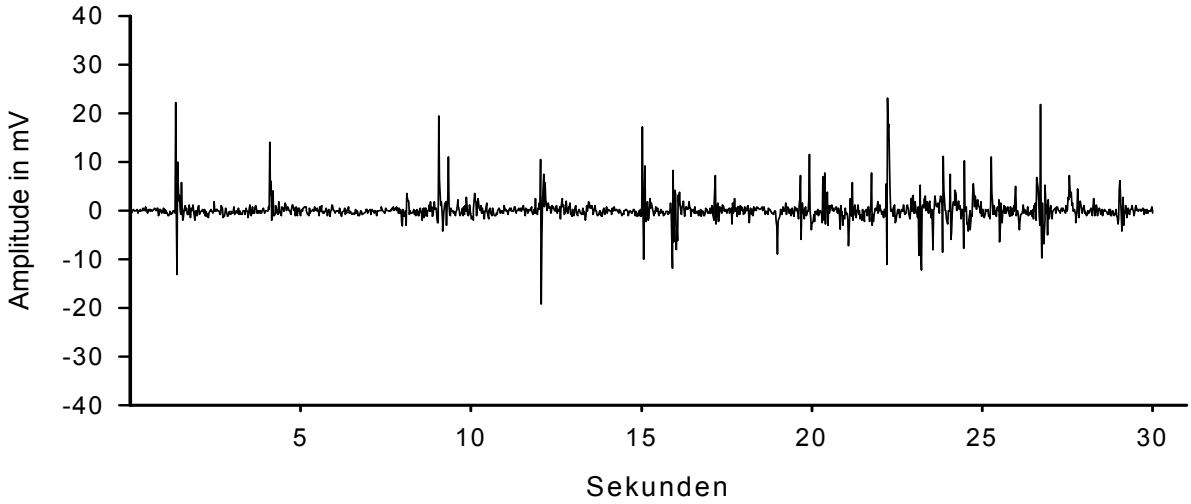


Abbildung 7:
Darstellung der Spannungsamplitude eines Beschleunigungssensors während normaler Verhaltensweisen einer Ratte.

a) **Umherlaufen im Käfig:** geringe Ausschläge unterschiedlicher Amplitude, Bewegung von Ruhephasen unterbrochen.
b) **Körperpflege:** Gruppen von Ausschlägen mit zunehmender oder gleichbleibender Intensität.
c) **Graben in der Einstreu:** dichte Gruppen von Ausschlägen mit großer Intensität, unterbrochen von Bewegungen mit geringer Amplitude.
d) **Fressen:** anhaltende Signale unterschiedlicher Amplitude, gefolgt von Pausen. Diese Komplexe traten meist alternierend über einen längeren Zeitraum auf.
e) **Trinken:** abgegrenzte konstante Bewegung über einen längeren Zeitraum mit vielen einzelnen Spitzen hoher Amplitude.

4.1.1.2 Aufzeichnung epileptischer Anfälle

Generalisierte epileptische Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell, die sich durch motorische Krampfaktivität des gesamten Körpers auszeichnen, ließen sich bis auf wenige Ausnahmen gut anhand der Aufzeichnungen der Beschleunigungssensoren erkennen und von anderen Verhaltensmustern unterscheiden. Die Ausnahmen ergaben sich durch folgende Situationen: die motorische Aktivität war nur gering ausgeprägt, die Anfälle waren sehr kurz (< 10 sec) oder das Tier war ungünstig in einer Käfigecke positioniert. In Abbildung 8 a ist ein generalisierter Anfall des Stadiums 4 dargestellt, der nur eine geringe motorische Bewegungskomponente in Form der Spannungsamplitude aufwies und ohne Videokontrolle nicht von anderen physiologischen Bewegungen zu unterscheiden gewesen wäre.

Bei der Mehrzahl der registrierten Anfälle waren zwei Merkmale charakteristisch. Die Krämpfe entwickelten sich meist in den Ruhephasen der Tiere, d.h. vor dem Ereignis waren über einen Zeitraum von einigen Minuten keine Ausschläge der Sensoren zu beobachten. Bei den Anfällen selbst handelte es sich um zeitlich begrenzte, rhythmische Bewegungsmuster ohne Pausen, an die längere Phasen ohne Aktivität (postiktale Depression) anschlossen. Die Bestimmung der Anfallsdauer anhand der Signale des „Bewegungsmelders“ konnte zu niedrigeren Werten (etwa 20 %) führen

Abbildung 8:
Darstellung der Spannungsamplitude eines Beschleunigungssensors während spontaner epileptischer Anfälle nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus.

a) **Anfall des Stadiums 4**: dichte Gruppe von Ausschlägen mit geringer Amplitude.

b) **Anfall des Stadiums 4**: dichte Gruppe von Signalen mit zunächst zunehmender und dann abnehmender Intensität. Die hohen Spitzen erklärten sich durch das wiederholte Absinken auf die Vorderbeine und sofortige Wiederaufrichten des Tieres ohne Verlust der Stellreflexe.

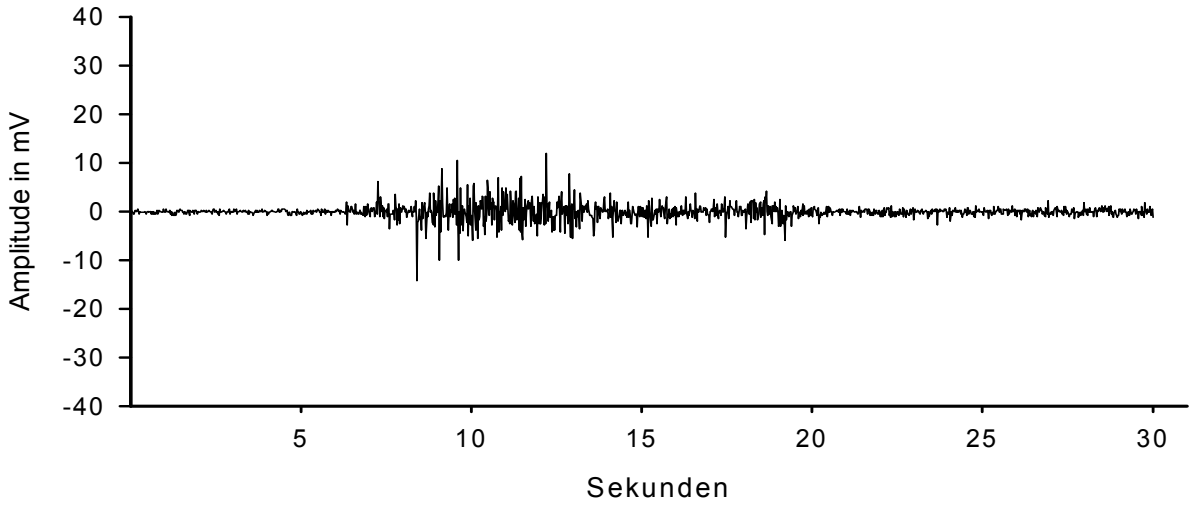
c) **Anfall des Stadiums (5)**: dichte Gruppe von Ausschlägen wechselnder Amplitude.

d) **Anfall des Stadiums 5**: dichte Gruppe von Ausschlägen mit zunächst starker Intensität, die den Verlust der Stellreflexe und das wiederholte unwillkürliche Umfallen des Tieres widerspiegelten. Im weiteren Verlauf krampfte das Tier auf der Seite liegend weiter, was sich in Signalen mit geringerer Amplitude äußerte.

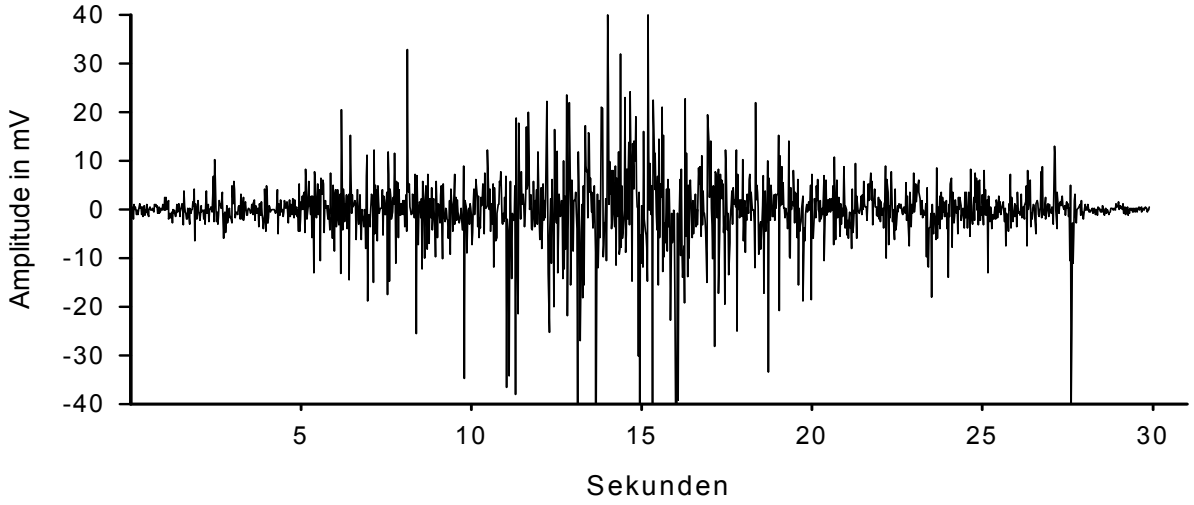
e) **Anfall des Stadiums 5 mit 'running and bouncing'**: hochfrequente Ausschläge mit hoher Amplitude. Die tonisch-klonische Komponente eines Anfalls mit Renn- und Springbewegungen ließ sich eindrucksvoll durch Beschleunigungssensoren darstellen.

f) **'running and bouncing'** im Anschluß an einen generalisierten Anfall: der generalisierte Anfall selbst ist in der Darstellung nicht enthalten. Etwa 30 sec nach dem Anfall zeigte die Ratte plötzlich von tonischen bewegungslosen Pausen unterbrochene Renn- und Springbewegungen. Man beachte die veränderte Skalierung der y-Achse.

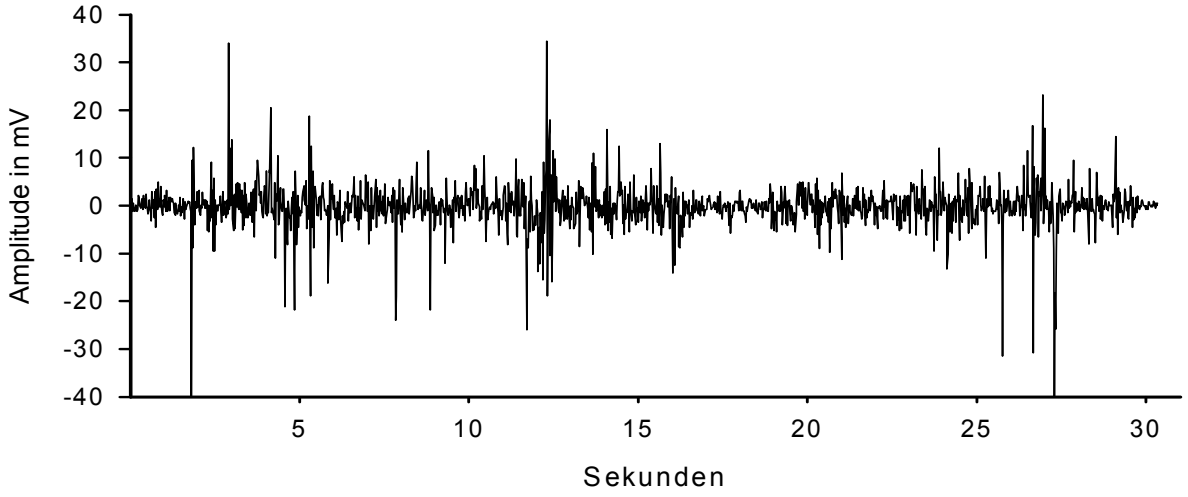
a)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

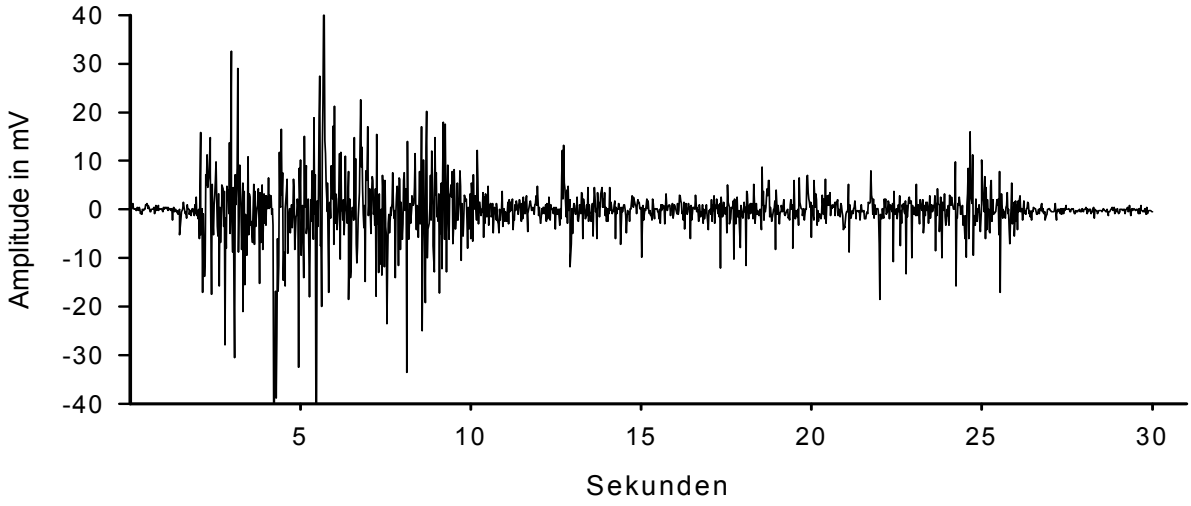
b)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

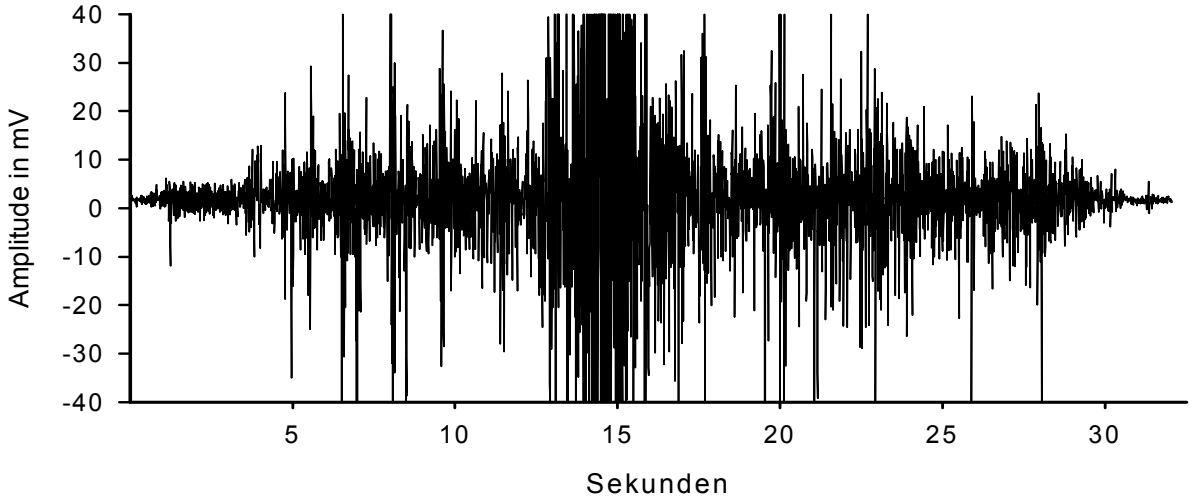
c)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

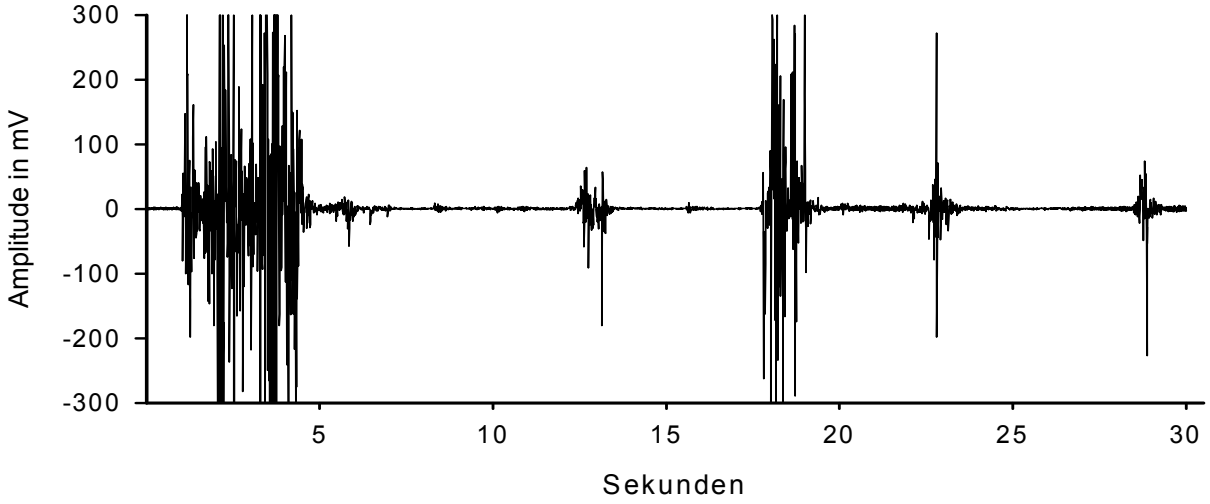
d)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

e)


40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

f)


300
200
100
0
-100
-200
-300
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

als die Videoauswertung des entsprechenden Ereignisses. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die spontanen Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell in der Regel sekundär generalisierten. Daher war bei guter Positionierung des Tieres zur Kamera zwar die erste fokale Krampfaktivität auf dem Video erkennbar, diese stellte sich allerdings aufgrund ihrer geringgradigen Stärke nicht am Beschleunigungssensor dar. Damit ist bereits ein Nachteil dieses Detektionssystems genannt. Fokale Anfälle waren mit keinen oder so geringen Signalen verbunden, daß sie leicht übersehen werden konnten.

Die Intensität der registrierten Signale während eines generalisierten Anfalls wies eine große Variationsbreite auf. Im allgemeinen waren Anfälle des Stadiums (5), bei denen sich die Tiere nicht aufrichten und umfallen, mit einer geringeren maximalen Amplitudendifferenz verbunden (Abbildung 8 c). Im Durchschnitt lagen die Werte bei 150 mV, es wurden allerdings auch Werte von 30 bis 667 mV registriert. Die Amplitudendifferenz der Signale, die durch Anfälle des Stadiums 4 hervorgerufen wurden, war im Vergleich mit durchschnittlich 220 mV höher (Abbildung 8 b). Einzelne Ereignisse blieben mit knapp 50 mV deutlich unter diesem Wert (Abbildung 8 a), andere wiesen mit 430 mV eine fast doppelt so hohe maximale Differenz auf. Die höchste Intensität der Signale wurde in der Regel bei Anfällen des Stadiums 5 gemessen (Abbildung 8 d). Die maximalen Spannungsdifferenzen lagen im Mittel bei 310 mV, variierten allerdings in einem weiten Bereich von unter 50 mV bis über 800 mV. Besonders eindrucksvoll wurde das Bild, wenn die Anfälle eine 'running and bouncing'-Komponente aufwiesen (Abbildung 8 e) bzw. isolierte Renn- und Springanfälle aufgezeichnet wurden (Abbildung 8 f). Hierbei wurden Werte von ± 500 mV registriert.

Die maximale Frequenz der Bewegungsmuster, die durch spontane Anfälle hervorgerufen wurden, war weitgehend unabhängig von der Schwere des Anfalls und betrug etwa 24 Hz (von 17 bis 32 Hz). Somit lag sie in einem Bereich, der auch bei Verhaltensweisen wie „Kratzen“ oder „Graben“ beobachtet werden konnte.

Der Einsatz von Beschleunigungssensoren sollte den Zeitaufwand der Auswertung von Videobändern reduzieren, indem selektiv nur Ereignisse mit einer starken Bewegungskomponente auf einem Band angesehen werden und hinsichtlich dem Auftreten spontaner Anfälle ausgewertet werden. Dazu wurde an 30 Tagen die genaue Länge der Auswertung der „Chart“-Aufzeichnungen (10:1 gestaucht)

einschließlich der Videokontrolle sowie die Zahl und Art der später auf Video angefahrenen Ereignisse notiert. Um ein 4 h Videoband im schnellen Vorlauf anzusehen, benötigt man durchschnittlich 35 min, abhängig von der Zahl der Ereignisse, die in Echtzeit betrachtet werden müssen. Bei reiner Videoauswertung einer 12 h Überwachung ergibt sich dadurch ein zeitlicher Aufwand von ca. 105 min. Die Auswertung einer 12 h Überwachung mittels „Bewegungsmelder“ und anschließender Videokontrolle dauerte durchschnittlich 43 min, wobei im Mittel 3 Ereignisse auf Video angefahren wurden (von 0 bis 13 Ereignisse). Bei 20 % dieser Ereignisse handelte es sich um externe Beeinflussungen der Aufzeichnungen (z.B. Manipulationen an der Überwachungseinheit), die vermeidbar gewesen wären. Weitere 45 % der Ereignisse beruhten auf normalem Tierverhalten (Umherlaufen im Käfig, Fressen, Putzen, Graben, Kratzen), wobei im Kreis drehen und Scharren der Tiere in der Einstreu vor dem Hinlegen die häufigste Ursache der falsch positiven Detektion war. Bei etwa 5 % der Geschehnisse konnte die Ursache für die verstärkten Ausschläge der Beschleunigungssensoren mittels Video nicht bestimmt werden. Bei dem letzten Drittel der Ereignisse handelte es sich um spontane Anfälle.

Um die Zuverlässigkeit der Detektion mittels „Bewegungsmeldern“ zu überprüfen, wurden die Videos über einen Zeitraum von sechs Wochen vollständig durchgesehen, um möglicherweise nicht registrierte Anfälle zu entdecken. Durch die Beschleunigungssensoren konnten gut 80 % der Anfälle prospektiv detektiert werden, bei 20 % der Krämpfe war dies nicht möglich. Hiervon waren ein Drittel fokal und gingen mit keiner sichtbaren Veränderung der Signalübertragung einher. Die übrigen zwei Drittel setzten sich aus kurzen generalisierten Anfällen zusammen, die nur mit einer geringen motorischen Aktivität verbunden waren und aus diesem Grund nicht als Krampfaktivität erkannt worden waren.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der Einsatz von Beschleunigungssensoren zur Anfallsdetektion den Zeitaufwand der Videoauswertung durch das gezielte Anfahren bestimmter Sequenzen auf dem Videoband um gut die Hälfte reduziert. Trotz der großen Varianz im Erscheinungsbild der generalisierten Anfälle lassen sich diese in der Regel gut von anderen Ereignissen unterscheiden. Die Detektion von fokalen sowie von kurzen, nur schwach konvulsiven generalisierten Anfällen ist allerdings nicht oder nur kaum möglich. Hierbei sollte bedacht werden,

daß die mit der Auswertung betraute Person einen Kompromiß eingeht und aus ihrer Erfahrung heraus Grenzen hinsichtlich einzelner Ereignisse und ihrer Videokontrolle zieht. Würde jede Signalveränderung der Beschleunigungssensoren auf Video kontrolliert, wäre der zeitliche Gewinn dieses Detektionssystems aufgehoben.

4.1.2 EEG-Aufzeichnungen

Von Ratten, bei denen die BLA elektrisch stimuliert worden war, konnten über die implantierten Reizelektroden auch bipolare EEG-Aufzeichnungen abgeleitet werden. Die eingehenden Signale wurden dabei im Gegensatz zu den Signalen der Beschleunigungssensoren 100fach verstärkt, um eine gute Darstellung epileptiformer Entladungen im EEG zu erreichen. Alle Aufzeichnungen wurden in der Hellphase an freibeweglichen Ratten angefertigt, was in der Signalübertragung zu Bewegungsartefakten führen konnte.

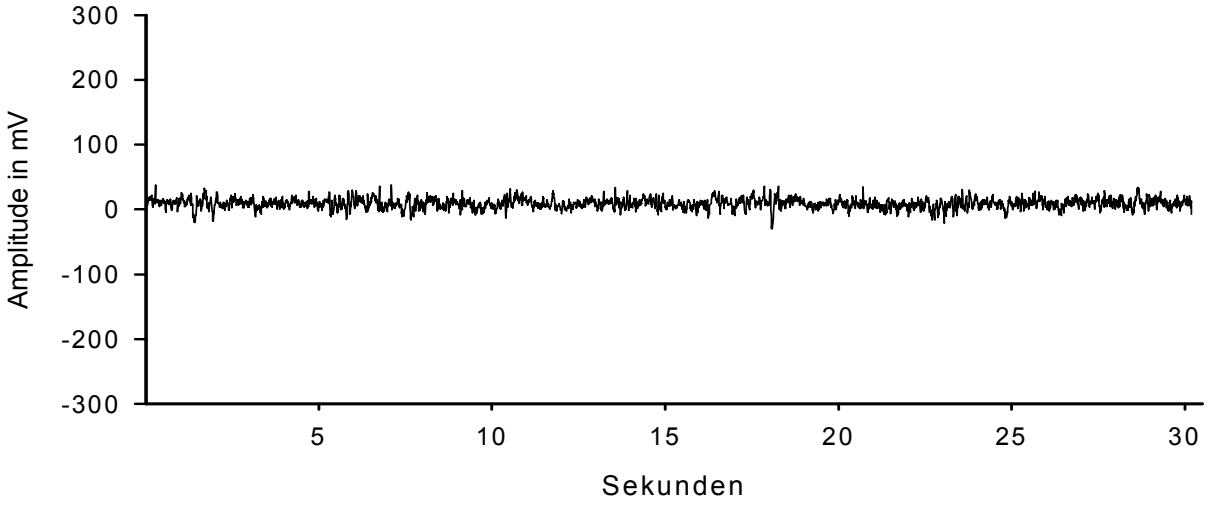
Die EEG-Grundaktivität (Abbildung 9 a) setzte sich aus langsamen und schnelleren Wellen mit einer Frequenz von 3 bis 8 Hz und einer wechselnden geringen Amplitude von max. ± 50 mV (beachte Signalverstärkung) zusammen. Bei einigen epileptischen Tieren konnte gelegentlich eine abnorme interiktale EEG-Tätigkeit beobachtet werden (Abbildung 9 b). Einzelne oder gruppierte Spitzen (Spikes) mit einer maximalen Amplitudendifferenz von etwa 100 mV traten in unregelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von einigen Minuten auf. Das Verhalten der Tiere in diesen Phasen war unauffällig.

Elektrographische Anfallsmuster gingen immer mit einer vergleichbaren Verhaltensbeobachtung am Tier einher. Es wurde auch in keinem Fall ein spontaner Anfall bei einem mittels EEG überwachten Tier beobachtet, der nicht mit epileptiformen Entladungen im EEG einherging. Generell war die Schwere eines Anfalls nicht an den EEG-Veränderungen, weder an der Amplitude noch an der Frequenz, zu erkennen (Abbildung 9 c). Allerdings wurden fokale Anfälle vergleichsweise selten registriert, so daß diese Aussage nur auf wenigen Beobachtungen basiert. Die Anfallsmuster zeigten folgende charakteristischen Merkmale (Abbildung 9 d). In der normalen EEG-Grundtätigkeit traten plötzlich Spikes mit hoher Frequenz (im Durchschnitt 11 Hz, von 4 – 20 Hz) auf, deren Amplitude zunahm (maximale Amplitudendifferenz im Durchschnitt 330 mV, von 210 - 510 mV). Im weiteren Verlauf nahm die Frequenz der Spikes bei

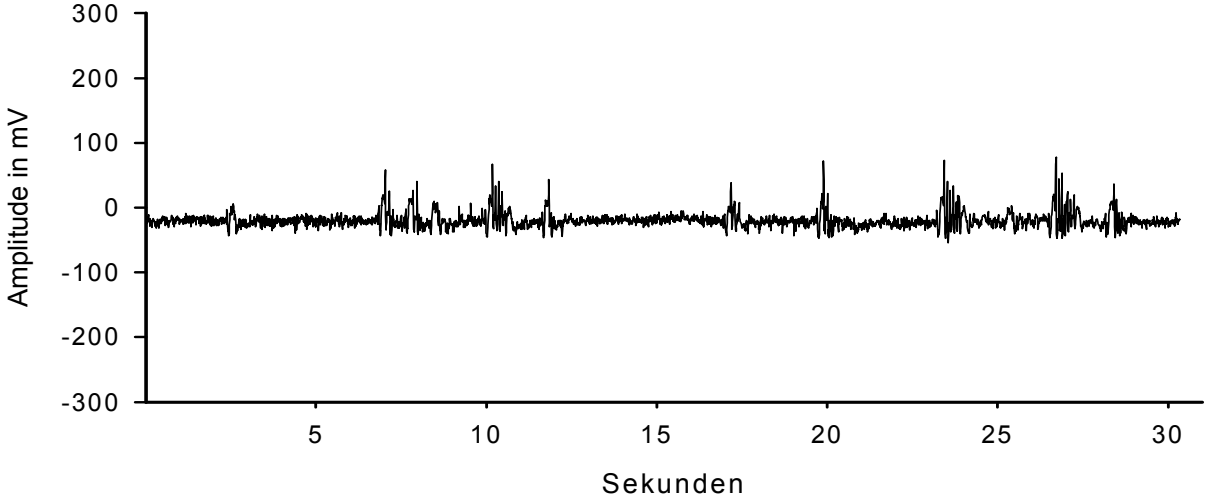
gleichbleibender oder weiter zunehmender Amplitude ab, wobei vermehrt Spike-Wave-Komplexe, gelegentlich auch Polyspike-Wave-Komplexe, auftraten. Kurz vor dem abrupten Ende eines Anfalls waren häufig nur noch Spike-Wave-Komplexe (etwa 3/sec) vorhanden. Die EEG-Grundtätigkeit nach einem Anfall zeigte häufig vermehrt langsame Wellen mit geringer Amplitude. Vereinzelt konnten einige Sekunden nach einem Anfall sekundäre Nachentladungen registriert werden (Abbildung 9 e). Diese bestanden aus langsamen Wellen oder Spike-Wave-Komplexen, die mit einer Frequenz von 3–4/sec auftraten und deren Amplitude allmählich zunahm. Die Nachentladungen endeten nach etwa 30 sec abrupt und es stellte sich wieder die normale EEG-Grundaktivität ein.
Die Bestimmung der Anfallslänge anhand der EEG-Aufzeichnungen führte, im Gegensatz zu den Beschleunigungssensoren, in der Regel zu höheren Werten als die Messung der motorischen Krampfaktivität auf den Videobändern. Das elektrographische Anfallsmuster war im Durchschnitt 40 % länger als das sichtbare motorische Anfallsgeschehen.

Der Zeitaufwand zur Auswertung der EEG-Aufzeichnungen von 1 h (10:1 gestaucht) betrug etwa 4 min. Da die EEG-Aufzeichnungen nicht mit der Hellphase begannen, mußten die Videobänder bis zum Anschließen der Ratten an die Ableitungskabel komplett angesehen werden. Entsprechend der Dauer der reinen Videoüberwachung (zwischen 60 und 90 min), ergab sich dadurch ein zeitlicher Gesamtaufwand von etwa 60 min für die Auswertung einer vollständig überwachten Hellphase (12 h).
Ein Vorteil der EEG-Aufzeichnungen war die Eindeutigkeit registrierter Ereignisse, d.h. die Videokontrolle war mehr oder weniger auf Anfallsaktivitäten reduziert. Es konnte fokale und generalisierte Krampfaktivität detektiert werden. Nur defekte Kabel führten in einigen Fällen zu Signalen, die Anfallsmustern ähnelten. Ein Nachteil war der insgesamt größere Zeitaufwand verglichen mit der Überwachung mittels Beschleunigungssensoren. Zum einen fielen häufig Reparaturen an den Kabeln an. Zum anderen mußten die Videobänder in den Phasen, wo die Tiere noch nicht angeschlossen waren bzw. sich von den Ableitungskabeln abgehängt hatten, vollständig durchgesehen werden.

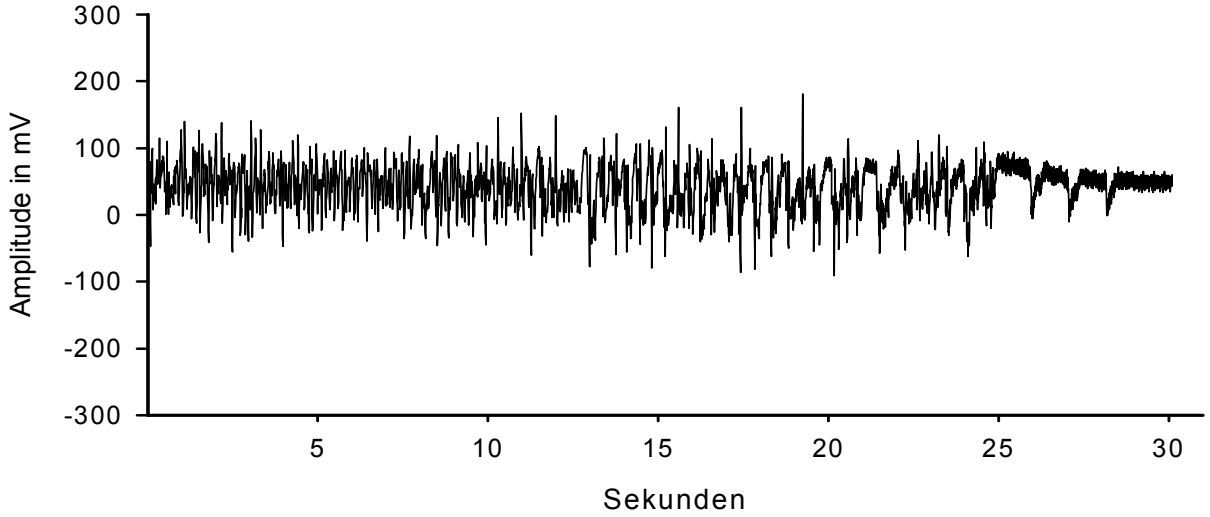
a)


300
200
100
0
-100
-200
-300
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

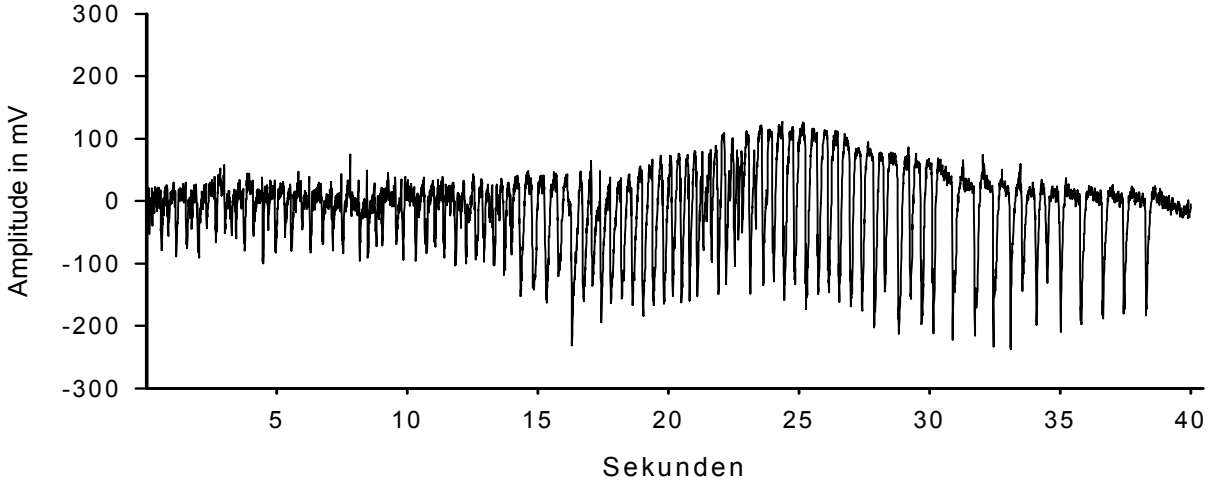
b)


300
200
100
0
-100
-200
-300
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

c)


300
200
100
0
-100
-200
-300
Amplitude in mV
5
10
15
20
25
30
Sekunden

d)



e)

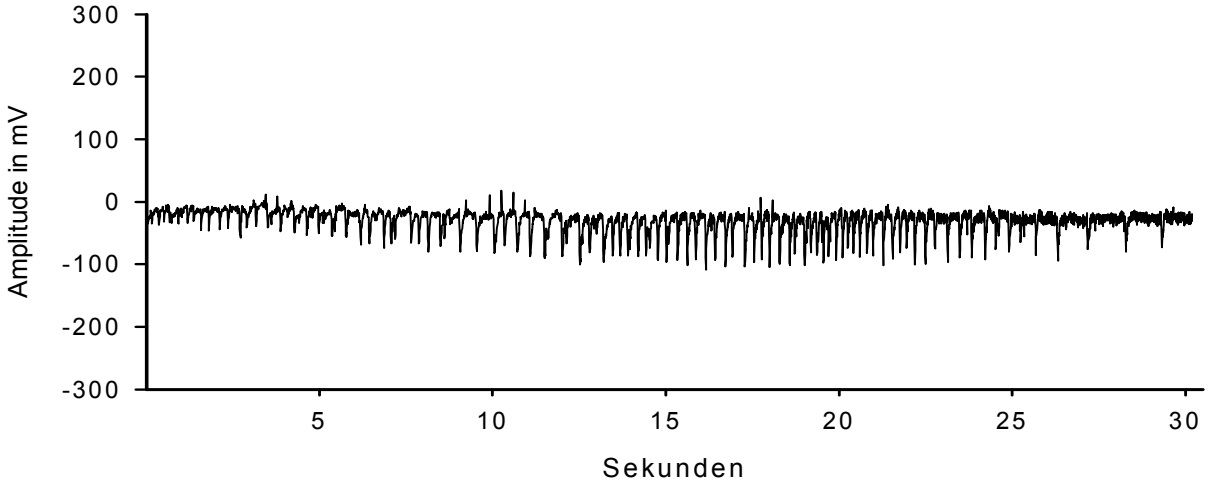


Abbildung 9:
Darstellung verschiedener EEG-Aufzeichnungen, die von freibeweglichen epileptischen Ratten in der Hellphase angefertigt wurden. Die Signale wurden 100fach verstärkt.

a) **EEG-Grundaktivität**: regelmäßige Wellen mit geringer Amplitude und einer Frequenz von 3 – 8 Hz.
b) **Interiktale epileptiforme Entladungen**: einzelne oder gehäuft auftretende Spitzen mit hoher Amplitude waren in die normale Grundtätigkeit eingelagert. Diese EEG-Tätigkeit konnte gelegentlich über unterschiedlich lange Zeiträume registriert werden (1–20 min).
c) **Spontaner fokaler Anfall (Stadium 3)**: späte Phase und Ende eines elektrographischen Anfallsmusters. Charakteristisch waren Spikes hoher Amplitude, die allmählich in Spike-Wave-Komplexe mit abnehmender Frequenz übergehen. Nicht von generalisierter Krampfaktivität zu unterscheiden.
d) **Spontaner generalisierter Anfall (Stadium 5)**: zu Beginn Spikes hoher Frequenz, deren Amplitude und Synchronizität zunehmen. Zum Ende Übergang zu Spike-Wave-Komplexen gleicher Amplitude, aber geringerer Frequenz. Charakteristisch war auch das abrupte Ende der epileptiformen Entladungen. Man beachte die veränderte Skalierung der x-Achse zur besseren Darstellung.
e) **Sekundäre Nachentladungen**: langsame Wellen bzw. Spike-Wave-Komplexe (3–4/sec) mit zunehmender Amplitude konnten gelegentlich im Anschluß an einen epileptischen Anfall registriert werden. Diese dauerten etwa 30 sec an und endeten abrupt.

4.2 Erstellung des Lithium-Pilocarpin-Modells

4.2.1 Status epilepticus

Im Rahmen der Modelletablierung wurden von mir insgesamt 85 weibliche Wistar-Ratten mit Lithium vorbehandelt. Davon erhielten anschließend 21 Tiere einmalig (30 mg/kg) und 64 Tiere fraktioniert (10 mg/kg alle 30 min) Pilocarpin. In der vorliegenden Arbeit wurden zudem Daten berücksichtigt, die von H. VOIGT (1999) und C. BRANDT (2002) gewonnen wurden.
Diese Daten beinhalteten die Status epilepticus-Induktion bei 28 Tieren nach einmaliger Pilocarpin-Applikation. Der Status epilepticus wurde bei 12 Tieren nach 90 min abgebrochen. Die Mortalitätsrate dieser 12 Tiere wurde ebenfalls einbezogen. Weiterhin wurden die Daten hinsichtlich der Status epilepticus-Induktion bei 39 Tieren nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und die dazu benötigte individuelle Anzahl von Injektionen berücksichtigt. Die Mortalitätsrate von 7 dieser Tiere, deren Status epilepticus nach 120 min abgebrochen wurde, ging ebenso in die Auswertung ein.
Diese weiblichen Wistar-Ratten wurden nach demselben Versuchsprotokoll behandelt wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

4.2.1.1 Induktion und Abbruch des Status epilepticus

Alle Ratten zeigten direkt nach der Applikation von Lithium eine für mehrere Stunden anhaltende geringgradige Sedation.
Von den insgesamt 49 Tieren, die 20 - 24 h nach Lithium einmalig Pilocarpin erhielten (30 mg/kg), entwickelten 37 Tiere einen Status epilepticus (76 %). Kurz nach der Injektion war in der Regel bei allen Tieren zunächst fokale Krampfaktivität (Kaubewegungen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Kopfnicken, Immobilität) zu beobachten. Diese endete nach ca. 1 h spontan bei Tieren, die keinen Status epilepticus entwickelten. Der erste generalisierte Anfall trat durchschnittlich 31 min (min. 12, max. 69 min; Auswertung der Daten von 29 Tieren) nach der Pilocarpin-Applikation auf und führte in der Regel zu einem Status epilepticus. Dieser begann im Mittel 41 min (min. 20, max. 80 min) nach der Pilocarpin-Applikation, jedes Tier

hatte zuvor mindestens einen isolierten generalisierten Anfall gezeigt. Von den 12 Tieren, die keinen Status epilepticus entwickelten, hatten 3 Ratten einen einzelnen generalisierten Anfall.

Bei den 103 mit Lithium vorbehandelten Ratten, die fraktioniert Pilocarpin (10 mg/kg alle 30 min) erhielten, konnte fokale Krampfaktivität bereits nach der ersten Injektion von Pilocarpin beobachtet werden. Diese Automatismen waren nicht von denen nach einer einmaligen Pilocarpin-Applikation zu unterscheiden. Ein Tier wurde aufgrund einer hochgradigen Atemdepression nach der zweiten Injektion von Pilocarpin euthanasiert.

Von den verbliebenen 102 Ratten entwickelten 63 Tiere einen Status epilepticus (62 %), was sich nicht signifikant von dem Ergebnis nach einmaliger Pilocarpin-Applikation unterschied (Abbildung 10, Chi-Quadrat Test, p = 0,14). Es waren mindestens 2 Injektionen notwendig, um generalisierte Anfälle bzw. den Status epilepticus auszulösen. Der erste generalisierte Anfall (Auswertung der Daten von 38 Tieren) konnte im Durchschnitt 63 min (min. 31, max. 117 min) nach der ersten Pilocarpin-Applikation beobachtet werden. Der Status epilepticus setzte durchschnittlich 70 min (min. 40, max. 117 min) nach der ersten Pilocarpin-

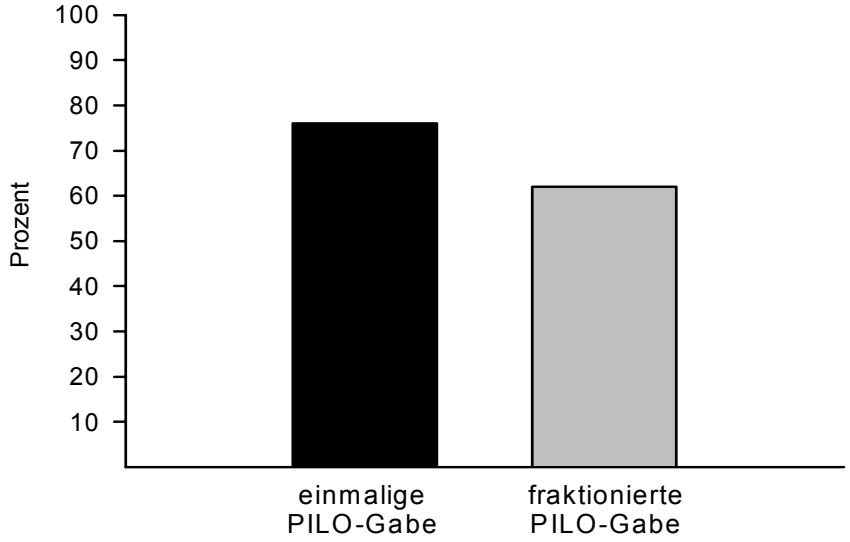


Abbildung 10:
Prozentualer Anteil von Ratten mit Status epilepticus (SE) an der Gesamtzahl der behandelten Tiere im Lithium-Pilocarpin (PILO)-Modell. Nach einmaliger Pilocarpin-Applikation (30 mg/kg) entwickelten 37 von 49 Tieren einen SE. Nach fraktionierter Verabreichung von Pilocarpin (10 mg/kg alle 30 min) entwickelten 63 von 102 Tieren einen SE. Die Ausbeute an Ratten mit SE war zwischen den beiden Versuchsprotokollen nicht signifikant unterschiedlich.

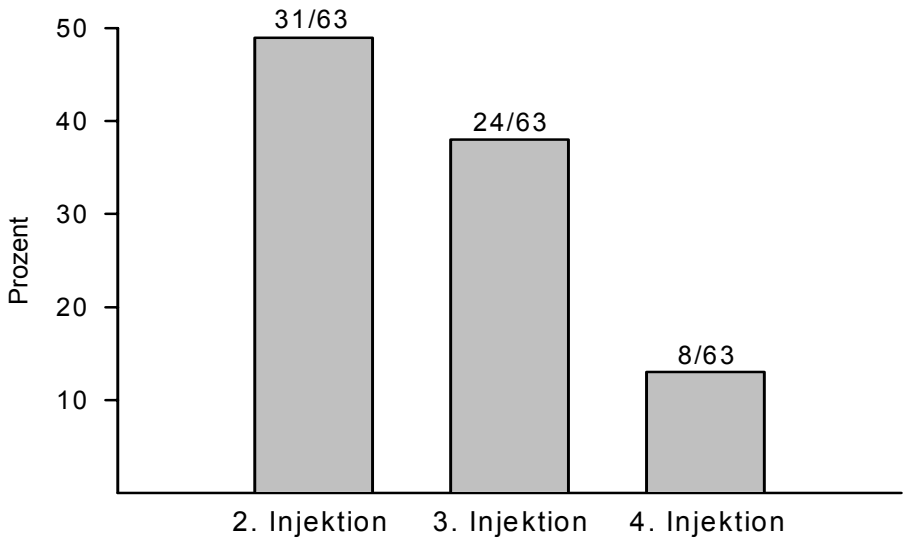


Abbildung 11:
Relative Anteile der Ratten, die nach der 2., 3. oder 4. Injektion von Pilocarpin (jeweils 10 mg/kg alle 30 min) einen Status epilepticus entwickelten. Die absoluten Tierzahlen sind über den Balken angegeben. Bei keinem Tier konnte durch die 1. Injektion von Pilocarpin ein Status epilepticus induziert werden.

Applikation ein. Die durchschnittliche Pilocarpin-Dosis zur Induktion des Status epilepticus betrug 26,35 mg/kg (min. 20, max. 40 mg/kg). Der Status epilepticus begann bei 49 % der Ratten nach der zweiten, bei 38 % nach der dritten und 13 % nach der vierten Injektion (Abbildung 11). Bei 2 Tieren begann der Status epilepticus unmittelbar mit dem ersten generalisierten Anfall. Bei 5 Tieren konnte jeweils ein generalisierter Anfall beobachtet werden, der im weiteren Verlauf nicht zu einem Status epilepticus führte.

Der Status epilepticus selbst unterschied sich nicht zwischen Tieren, die einmalig oder fraktioniert Pilocarpin erhielten. Wenige Minuten nach der ersten bzw. einmaligen Pilocarpin-Applikation konnten fokale Anfälle der Stadien 1 und 2 beobachtet werden. Diese fokale Krampfaktivität ging bei den meisten Tieren nach einer gewissen Zeit in einen einzelnen generalisierten Anfall des Stadiums 4 oder 5 über. Nach dem ersten generalisierten Anfall trat in der Regel eine Pause auf, in der die Tiere keine motorische Krampfaktivität zeigten. Das darauf folgende Krampfgeschehen stellte den Beginn des Status epilepticus dar und war durch anhaltende generalisierte Anfälle der Stadien 4 bis 5 gekennzeichnet. Es wurde gelegentlich durch einzelne Anfälle des Stadiums 3 unterbrochen. Diese vorwiegend generalisierte motorische Krampfaktivität hielt bis zum Abbruch des Status

epilepticus mit Diazepam konstant an, wobei sich die Verhaltensbeobachtungen mit zunehmender Länge des Status epilepticus nicht änderten.

Bei allen Tieren, die ich im Rahmen der Modelletablierung mit Pilocarpin behandelt hatte, wurde 30 min nach Verbringen der Tiere in das Labor vor der ersten Injektion (Methylscopolamin) die rektale Körpertemperatur gemessen. Die Ratten waren an den Tagen vor dem Versuch an das Labor und die Temperaturmessung adaptiert worden. Bei Tieren, die einen Status epilepticus entwickelten, wurde die rektale Körpertemperatur erneut unmittelbar vor der Applikation von Diazepam bestimmt, so daß diese Messung nach 60, 90 bzw. 120 min, je nach Länge des Status epilepticus, erfolgte. Die durchschnittliche Körpertemperatur aller Ratten betrug 38,1 °C (St.D. 0,4) vor der ersten Injektion. Es gab signifikante Unterschiede sowohl innerhalb der Gruppen beim Vergleich der Temperatur vor der ersten Injektion und kurz vor Abbruch des Status epilepticus als auch zwischen den Gruppen beim Vergleich der Temperatur nach verschiedenen Status epilepticus-Längen (Abb. 12, zweifaktorielle Varianzanalyse, $p < 0,01$ für beide Parameter).
Unabhängig von der Vorgehensweise bei der Pilocarpin-Applikation stieg die Körpertemperatur innerhalb der Versuchsgruppen erst ab einer Status epilepticus-Länge von 90 min signifikant an (post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).
Die Auswertung der Körpertemperatur zwischen den vier Versuchsgruppen im Status epilepticus zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Status-Längen von 60, 90 und 120 min, d.h. je länger der Status epilepticus andauerte, desto höher war der Temperaturanstieg (post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).
Der Abbruch des Status epilepticus mit Diazepam führte in der Regel innerhalb weniger Minuten zu einer Verminderung oder dem Erlöschen der sichtbaren motorischen Krampfaktivität. Die rektale Körpertemperatur der Tiere sank in den folgenden Stunden ab und machte bei einigen Tieren die Haltung auf einer beheizbaren Wärmeplatte nötig, bis wieder Werte oberhalb von 37 °C meßbar waren. Von einer weiteren Erwärmung der Tiere wurde abgesehen, da im Allgemeinen beobachtet werden konnte, daß bei wieder ansteigender Temperatur die Krampfbereitschaft zunahm. So zeigten abends einige Ratten beim Transport in den Tierstall erneut Stereotypien (Laufbewegungen mit den Vorderextremitäten) oder kurze, isoliert auftretende generalisierte Anfälle. Am nächsten Morgen war keine motorische Krampfaktivität mehr zu erkennen.

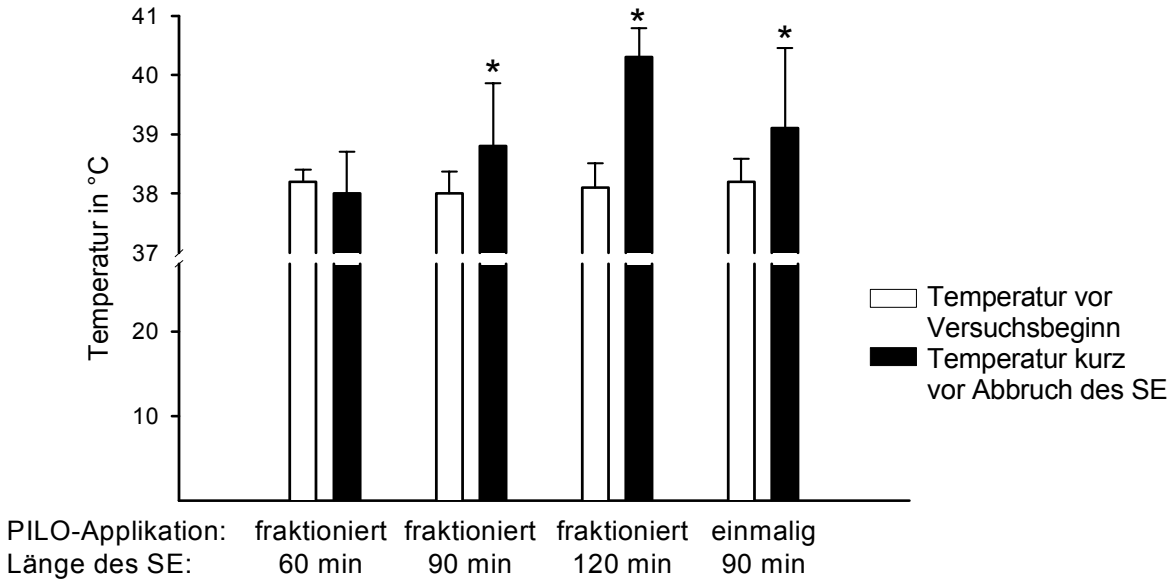


Abbildung 12:
Veränderung der rektalen Körpertemperatur unmittelbar vor Abbruch des Status epilepticus (SE) mit Diazepam in Abhängigkeit von der Länge des SE und der Art der Pilocarpin (PILO)-Applikation (fraktioniert: 10 mg/kg alle 30 min bis zu 4x, einmalig: 30 mg/kg). Als weiße Säulen dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Körpertemperatur der jeweiligen Gruppen vor der ersten Injektion (Methylscopolamin), die schwarzen Säulen geben Mittelwerte und Standardabweichungen der Körpertemperatur im SE kurz vor dessen Abbruch mit Diazepam an. Bei fraktionierter Verabreichung von PILO und einer SE-Länge von 60 min (n = 15) gab es keine signifikante, bei 90 min (n = 15) und 120 min SE (n = 8) eine signifikante Änderung der Temperatur. Nach einmaliger PILO-Applikation und einer SE-Dauer von 90 min (n = 17) war ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Temperatur zu beobachten. (* post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$.)

4.2.1.2 Mortalität

Innerhalb von 48 h nach Status epilepticus verstarben von 29 Tieren, die einmalig Pilocarpin erhielten und deren Status epilepticus nach 90 min abgebrochen wurde, 12 Tiere (41 %). Eine weitere Ratte aus dieser Gruppe verstarb 9 Tage nach Status epilepticus.

Nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status epilepticus-Länge von 120 min verstarben von 15 Tieren 6 (40 %), was sich nicht signifikant von der Mortalitätsrate nach einmaliger Pilocarpin-Applikation unterschied (Fisher Exact, $p = 1,0$). Nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und der Reduzierung der Länge des Status epilepticus auf 90 bzw. 60 min sank die Mortalität signifikant auf 7 % ab ($p = 0,03$ bzw. 0,04), d.h. von jeweils 15 Tieren dieser Gruppen verstarb nur je 1 Tier innerhalb von 48 h (Abbildung 13).

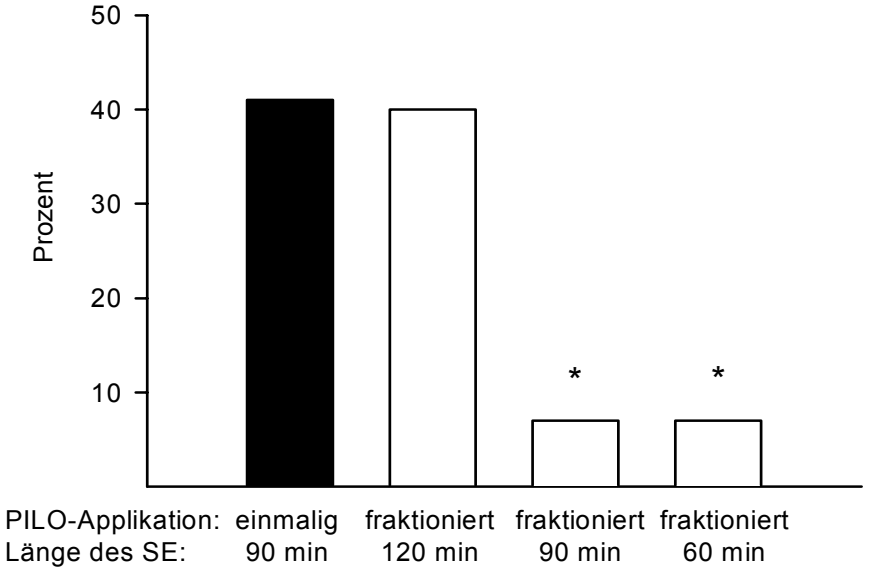


Abbildung 13:
Prozentualer Anteil der innerhalb von 48 h verstorbenen Ratten an der Gesamtzahl der Tiere mit Status epilepticus (SE) in Abhängigkeit von der Art der Pilocarpin (PILO)-Applikation und der Länge des SE. Nach einmaliger PILO-Applikation verstarben 12 von 29 Tieren mit SE, nach fraktionierter PILO-Applikation und einer SE-Länge von 120 min 6 von 15 Ratten mit SE. Diese beiden Gruppen unterschieden sich signifikant von den Gruppen mit fraktionierter PILO-Applikation und einer Länge des SE von 90 bzw. 60 min, in denen jeweils nur ein Tier von 15 Tieren mit SE verstarb (Fisher Exact, $p < 0,05$).

4.2.1.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus

Das Allgemeinbefinden aller Ratten, die einen durch Lithium und Pilocarpin induzierten Status epilepticus überlebten, war an den folgenden Tagen erheblich gestört. Die Ratten waren entweder apathisch oder hyperlokomotorisch und zeigten eine Hyperexzitabilität, d.h. sie reagierten hochgradig empfindlich auf jede Form der Berührung. Einige Tiere zeigten einen stark ausgeprägten Beißtrieb und verbissen sich in die angebotene Spritze mit Futter oder ihre Käfige. Die Akzeptanz, Babybrei aus einer Spritze aufzunehmen, war zunächst gering, stieg nach einer Gewöhnungsphase von zwei bis drei Tagen aber deutlich an. Die Dauer der individuellen Fütterung variierte von Tier zu Tier und lag zwischen 1 und 10 Tagen, im Durchschnitt bei 3 Tagen.

Alle Tiere verloren nach dem Status epilepticus an Körpergewicht (Abbildung 14). Das durchschnittliche Gewicht dieser Ratten lag vor Versuchsbeginn bei 225 g, der durchschnittliche maximale Gewichtsverlust betrug 36 g pro Tier (Minimum 16 g, Maximum 56 g), d.h. jedes Tier verlor im Mittel 16 % an Gewicht. Unabhängig von

der Vorgehensweise bei der Pilocarpin-Applikation (einmalig oder wiederholt kleine Dosen) und der Länge des Status epilepticus hatten die Ratten nach ungefähr zwei Wochen wieder ihr ursprüngliches Körpergewicht erreicht. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede an den einzelnen Tagen zwischen den drei Gruppen (einfaktorielle Varianzanalyse). Allerdings traten innerhalb der drei Gruppen statistisch signifikante Unterschiede im Körpergewicht auf (einfaktorielle

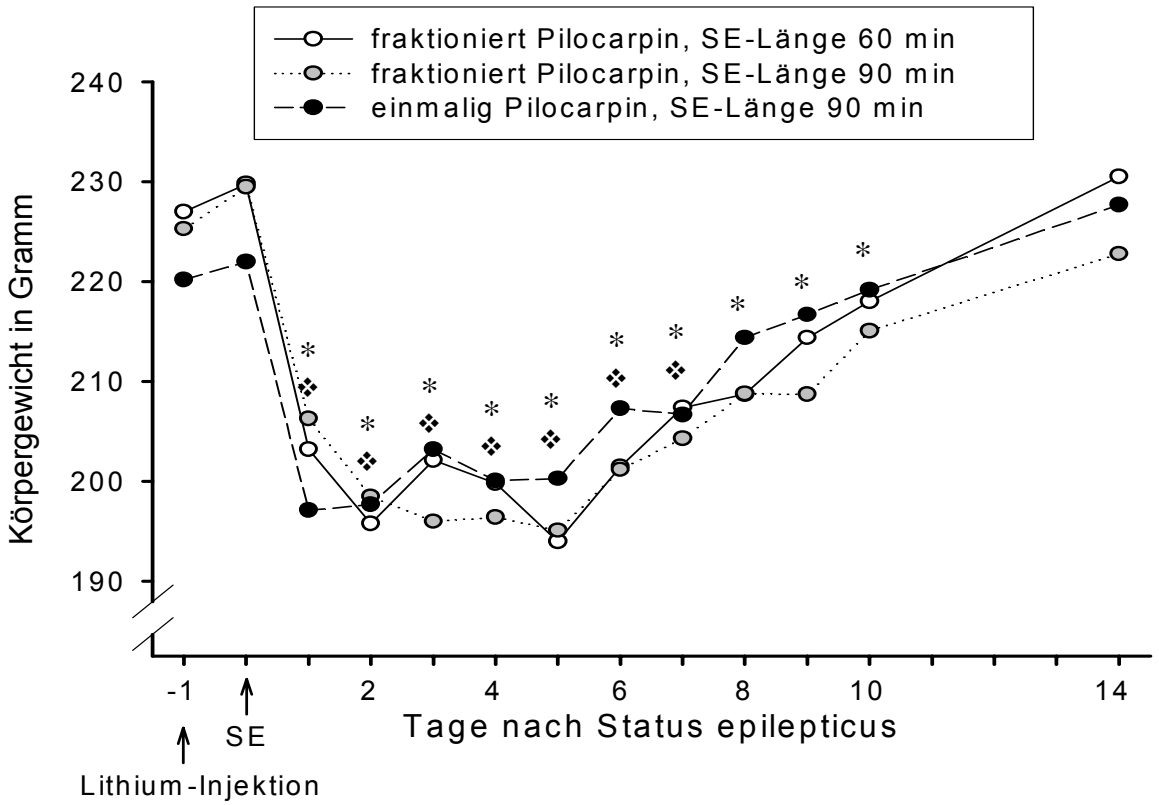


Abbildung 14:
Entwicklung des Körpergewichts von Ratten, die einen durch Lithium und Pilocarpin induzierten Status epilepticus (SE) überlebten. Dargestellt sind die Mittelwerte für jede Gruppe: einmalig Pilocarpin und Länge des SE von 90 min (n = 9), fraktioniert Pilocarpin und SE-Länge 90 (n = 13) bzw. 60 min (n = 12). Unabhängig von der Art der Pilocarpin-Applikation und der Länge des SE hatten alle Tiere nach ungefähr 2 Wochen wieder ihr ursprüngliches Körpergewicht erreicht. Zwischen den Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede an den auf den SE folgenden Tagen. Innerhalb der Versuchsgruppen traten statistisch signifikante Unterschiede auf (post hoc Dunnett's-Test, $p < 0{,}05$), wobei das Körpergewicht am Tag der SE-Induktion als Kontrollgewicht verwendet wurde und jeweils mit dem Körpergewicht an den folgenden Tagen verglichen wurde. Signifikante Unterschiede sind durch * oder ❖ gekennzeichnet.

* fraktionierte Pilocarpin-Applikation

❖ einmalige Pilocarpin-Applikation

Um die Übersichtlichkeit der Abbildung zu erhalten, wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.

Varianzanalyse für wiederholte Messungen, $p < 0,01$), wobei das Körpergewicht an den auf den Status epilepticus folgenden Tagen jeweils mit dem Körpergewicht vor der Induktion eines Status epilepticus verglichen wurde. Demnach war nach einmaliger Pilocarpin-Applikation das Körpergewicht bis zum 7. Tag, nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation bis zum 10. Tag nach dem Status epilepticus signifikant niedriger als vor der Status-Induktion (Abbildung 14, post hoc Dunnett's-Test, $p < 0,05$). Da in der Gruppe nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status-Länge von 120 min nur 3 Tiere verblieben, wurden die entsprechenden Daten dieser Tiere nicht weiter ausgewertet.

4.2.2 Spontane Anfälle

Bei einem hohen Prozentsatz von Ratten resultiert ein induzierter Status epilepticus in einer Epileptogenese, die sich nach Verstreichen einer Latenzphase in spontanen Anfällen klinisch manifestiert (CAVALHEIRO et al. 1991). Um diese epileptischen Ratten zu selektieren, begann eine systematische Überwachung drei Wochen nach dem Status epilepticus. Unabhängig von der Art der Pilocarpin-Applikation (einmalig oder fraktioniert) und der Länge des Status epilepticus (60, 90 oder 120 min) soll zunächst der zeitliche Überwachungsaufwand beschrieben werden, um den ersten epileptischen Anfall zu detektieren.

4.2.2.1 Überwachungsaufwand

Von den insgesamt 37 Ratten, die hinsichtlich des Auftretens von Anfällen beobachtet werden sollten, kamen 9 Tiere nicht in die Überwachung, da bei ihnen Anfälle schon vor Ablauf der drei Wochen zufällig während des Handlings gesehen wurden. Für die verbleibenden 28 Tiere ergab sich bei Summierung der individuellen Einzelwerte eine Überwachungszeit von insgesamt 4242 h. Davon entfielen 1111 h auf 10 Ratten, deren Anfälle nicht während der systematischen Überwachung registriert wurden, sondern zufällig während Manipulationen an den Tieren außerhalb der regulären Überwachung. Im Durchschnitt waren diese Ratten bis dahin über einen Zeitraum von 5 Wochen 111 h aufgezeichnet worden (min. 12 h / 1 Woche; max. 266 h / 13 Wochen). Weitere 899 h entfielen auf 12 Tiere, deren erster Anfall im Rahmen der systematischen Überwachung beobachtet werden konnte. Der

durchschnittliche Überwachungsaufwand betrug bei diesen Tieren 75 h in 4 Wochen (min. 12 h / 1 Woche; max. 245 h / 13 Wochen). Der Großteil der gesamten Überwachungszeit entfiel mit 2232 h auf die 6 Ratten, bei denen die Überwachung eingestellt wurde und die als anfallsfrei galten. Sie waren bis dahin im Durchschnitt über einen Zeitraum von 15 Wochen 372 h überwacht worden (310 – 412 h in 12 – 19 Wochen).

Von den insgesamt 37 Tieren wurde bei 19 Tieren (51 %) ein epileptischer Anfall zufällig beobachtet, bei weiteren 12 Tieren (33 %) war dies im Rahmen einer systematischen Überwachung möglich und bei weiteren 6 Tieren (16 %) war die Aussage „mit hoher Wahrscheinlichkeit anfallsfrei“ nach einer intensiven Überwachung gerechtfertigt.

4.2.2.2 Auftreten und Frequenz der spontanen Anfälle

Unabhängig vom Versuchsprotokoll entwickelten annähernd alle Ratten mit einer Länge des Status epilepticus von mindestens 60 min spontane Anfälle (Tabelle 8). In der Gruppe nach einmaliger Pilocarpin-Applikation sowie den Gruppen nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status epilepticus-Länge von 90 bzw. 60 min blieben jeweils 2 Tiere anfallsfrei. Die Ausbeute an epileptischen Ratten unterschied sich nicht statistisch signifikant zwischen den Gruppen (exakter Test nach Fisher, $p = 1,0$). Aufgrund der geringen Tierzahl ist die Gruppe nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status-Länge von 120 min nicht weiter dargestellt, alle 3 Ratten hatten allerdings spontane Anfälle.

Die Länge der Latenzphase (Tabelle 8) variierte stark zwischen den Tieren, war zwischen den einzelnen Gruppen jedoch ähnlich und ohne statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle Varianzanalyse, $p = 0,56$). Die durchschnittliche Latenzphase aller drei Gruppen betrug 38 Tage (St.D. 27, Median 34). Die 3 Ratten der Gruppe nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status epilepticus-Länge von 120 min zeigten im Mittel nach 42 Tagen (St.D. 13) den ersten Anfall.

Krampfschwere und –dauer der spontanen Anfälle unterschieden sich nicht in den verschiedenen Gruppen. Isoliert auftretende fokale Anfälle wurden während der gesamten Überwachungsphase bei keinem Tier beobachtet. In der Regel war der Beginn der Anfälle durch fokale Krampfaktivität (Immobilität und klonische Kaubewegungen) gekennzeichnet, die sich im weiteren Verlauf zu generalisierten

	einmalig Pilocarpin	**fraktioniert Pilocarpin**	
	SE-Länge 90 min	**SE-Länge 90 min**	**SE-Länge 60 min**
• überwachte Tierzahl	9	13	12
• **Tiere mit Anfällen**	7	11	10
	(78 %)	**(85 %)**	**(83 %)**
Latenzphase (Tage)			
• Mittelwert	38	44	31
• Bereich	12 – 72	9 – 109	10 – 75
• St.D.	21	35	21
• Median	37	41	25

Tabelle 8:
Übersicht über die Ausbeute an epileptischen Tieren nach verschiedenen Versuchsprotokollen (einmalig Pilocarpin 30 mg/kg, fraktioniert Pilocarpin 10 mg/kg alle 30 min) und verschiedenen Längen des Status epilepticus (SE). Die verschiedenen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant in der Anzahl epileptischer Ratten. Die Latenzphase gibt die Tage zwischen SE und erstem beobachteten Anfall an. Innerhalb der Gruppen traten starke Differenzen auf, während sich die Gruppen untereinander nicht statistisch signifikant unterschieden.
(St.D.: Standardabweichung)

Anfällen des Stadiums 4 und 5 entwickelte. Die durchschnittliche Krampfdauer betrug 43 sec (St.D. 17; min. 15, max. 85). Dieser Wert berechnete sich aus den 122 auf Video aufgezeichneten Anfällen von 25 Ratten, wobei der Durchschnitt der individuellen Mittelwerte berechnet wurde. Die Dauer zufällig beobachteter Krämpfe war in den meisten Fällen nicht exakt bestimmbar und wurde nur als Schätzwert notiert, so daß diese Daten nicht berücksichtigt wurden.

Bei den insgesamt 31 epileptischen Ratten nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus konnte im Verlauf der Monate keine Veränderung hinsichtlich der individuellen Anzahl, Schwere oder Dauer der Anfälle beobachtet werden. Allerdings verstarben 3 Tiere nach 3, 7 bzw. 10 Monaten nach einem schweren generalisierten Anfall mit starkem 'running and bouncing'.

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Versuchsprotokolle einen Einfluß auf die Zahl der spontanen Anfälle haben, wurde durchschnittlich 118 Tage (104 bis 147 Tage) nach dem Status epilepticus eine Frequenz-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h in der Hellphase überwacht und die Gesamtzahl der Anfälle in diesen 48 h bestimmt. Die durchschnittliche Zahl der Anfälle betrug in der Gruppe nach einmaliger Pilocarpin-Applikation 2,4 Anfälle (0 – 8), nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Status epilepticus-Länge von 90 min 3,4 Anfälle (0 – 20) bzw. einer Status epilepticus-Länge von 60 min 3,9 Anfälle (0 – 21). Der Mittelwert aller 23 Ratten lag bei 3,3 Anfällen, die Einzelwerte sind der Abbildung 15 zu entnehmen. Nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation und einer Länge des Status epilepticus von

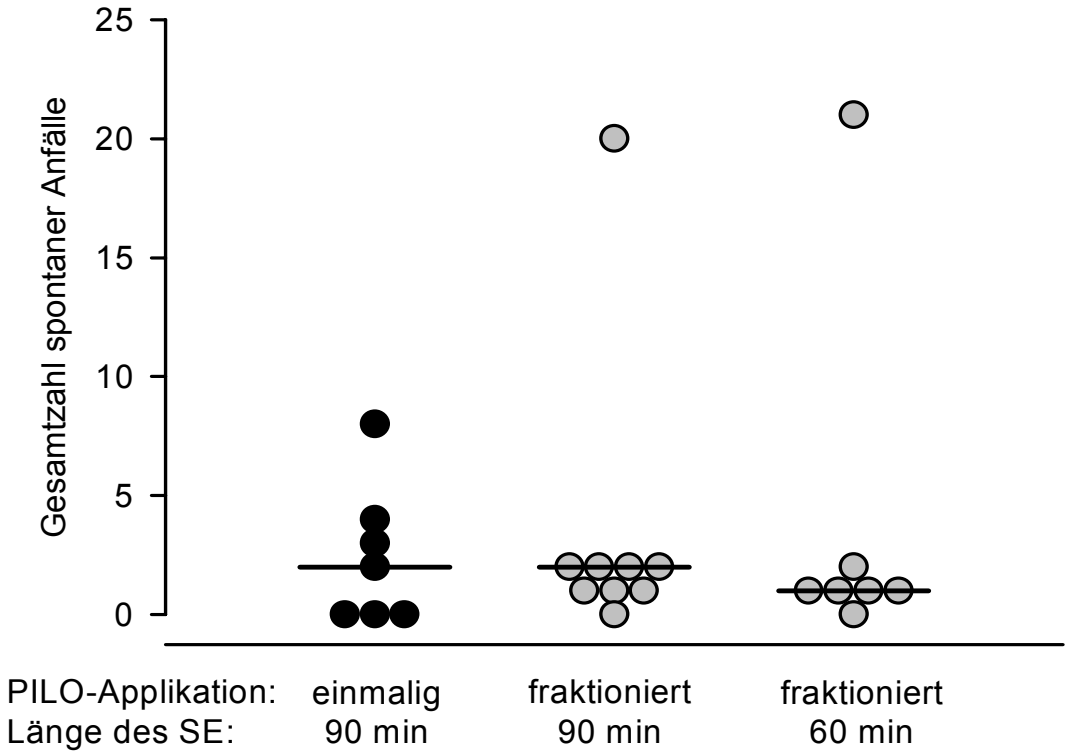


Abbildung 15:
Darstellung der Einzelwerte der Gesamtzahl spontaner Anfälle während der Frequenz-Analyse (an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h Überwachung) für jedes Tier etwa 4 Monate nach Induktion eines Status epilepticus (SE) durch Lithium und Pilocarpin (PILO). Die Gruppen einmalig PILO (1x 30 mg/kg) und fraktioniert PILO (max. 4x 10 mg/kg) mit einer Länge des SE von 90 bzw. 60 min wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der epileptischen Anfälle auf.

○ : Gesamtzahl der Anfälle für jede Ratte in der Überwachungszeit von 48 h
— : Median

120 min (n = 3) wurden durchschnittlich 5,7 Anfälle (0 – 14) beobachtet. Wurden diese 3 Ratten in die Berechnung des Durchschnittswerts aller Tiere einbezogen, ergaben sich 3,5 Anfälle pro Tier in der Überwachungsperiode. Die Anfallsfrequenz in den Gruppen nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation tendierte zu einem höheren Wert, der Unterschied erwies sich aber als statistisch nicht signifikant (nicht parametrische Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis, p = 0,9).
Nur ein Tier von den insgesamt 26 überwachten Ratten hatte an allen vier Tagen Anfälle. Einige Tiere zeigten mehrere Anfälle an einem Tag, auf den mehrere anfallsfreie Tage folgten.

Parallel zu der Entwicklung von spontanen Anfällen konnten bei den epileptischen Ratten Verhaltensänderungen beobachtet werden. Dazu gehörten eine gesteigerte Aggressivität mit ausgeprägter Bissigkeit gegenüber anderen Ratten und Menschen, eine übermäßige Erregbarkeit der Tiere und ein gestörtes Explorationsverhalten, das sich z.B. in „blinden“ Sprüngen aus großer Höhe äußerte.

4.3 Erstellung des Modells der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala

4.3.1 Status epilepticus

Im Rahmen der Modelletablierung wurden weibliche Wistar- sowie weibliche und männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Zwei Wistar-Ratten verstarben in dem Zeitraum zwischen Elektrodenimplantation und Stimulation, zwei weitere Tiere wurden nicht stimuliert, da sie unmittelbar nach Beginn der Stimulation vokalisierten. Aus dem gleichen Grund wurden auch zwei männliche Sprague-Dawley-Ratten nicht stimuliert.

In der pharmakologischen Studie über die Wirkung von Levetiracetam (Kapitel 4.6) wurden ausschließlich weibliche Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt. Hierzu wurden insgesamt 41 Tiere operiert, von denen eine Ratte unmittelbar nach der Operation verstarb. Die Daten dieser Tiere hinsichtlich der Induktion eines selbsterhaltenden Status epilepticus wurden in diesem Abschnitt berücksichtigt (siehe Tab. 9 und 10).

4.3.1.1 Induktion eines Status epilepticus

Es wurden insgesamt 80 Ratten über eine Elektrode im Bereich der BLA für einen Zeitraum von 25 min elektrisch stimuliert. Waren nach dieser Stimulationsdauer die EEG-Kriterien für einen Status epilepticus nicht erfüllt, wurden die entsprechenden Tiere für weitere 5 min stimuliert. Dies war bei 5 Wistar-Ratten der Fall, von denen ein Tier anschließend einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen, ein weiteres Tier einen fokalen und die verbleibenden drei Tiere keinen Status epilepticus zeigten. Auch bei 2 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde die Stimulation für 5 min fortgesetzt, was nur bei einem der Tiere in der Entwicklung eines Status epilepticus resultierte, der ausschließlich fokale Krampfaktivität umfaßte.

Entsprechend der sichtbaren motorischen Krampfaktivität nach Beendigung der elektrischen Stimulation war eine Einteilung des Status epilepticus in drei Arten möglich. Aus Tabelle 9 ist die Gesamtzahl der Tiere mit einem bestimmten Status-Typ und die Aufteilung nach Geschlecht und Stamm ersichtlich, wobei als vierte Gruppe Tiere, die keinen Status epilepticus entwickelten, hinzugefügt wurde. Bei knapp der Hälfte aller Ratten konnte ein generalisierter Status epilepticus induziert

Zahl der Tiere				
	gesamt	**Wistar weiblich**	**Sprague-Dawley weiblich**	**Sprague-Dawley männlich**
Elektrodenimplantation	87	22	51	14
elektrische Stimulation	**80**	**18**	**50**	**12**
kein SE	**6** (7,5 %)	**4** (22,2 % SDw)	**2** (4,0 %)	**0**
fokaler SE	**14** (17,5 %)	**6** (33,3 %)	**6** (12,0 %)	**2** (17,0 %)
fokaler SE mit generalisierten Anfällen	**24** (30,0 %)	**4** (22,2 %)	**13** (26,0 %)	**7** (58,0 % SDw)
generalisierter SE	**36** (45,0 %)	**4** (22,2 %)	**29** (58,0 % Ww)	**3** (25,0 %)
akute Mortalität nach SE	**2** (2,7 %)	**2** (14,3 % SDw)	**0**	**0**

Tabelle 9:
Effekt einer 25-minütigen elektrischen Stimulation der BLA in weiblichen Wistar- sowie weiblichen und männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Abhängig von der Induktion eines Status epilepticus (SE) und der Art des SE sind die absoluten und relativen Zahlen für die gesamte Gruppe und nach Geschlecht und Stamm getrennt dargestellt. Zur Berechnung der Mortalität wurden nur Ratten mit SE einbezogen. Die zwei innerhalb von 24 h nach der Stimulation verstorbenen weiblichen Wistar-Ratten hatten einen generalisierten SE. Die hochgestellten Abkürzungen geben an zu welcher Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied bestand (SDw: weibliche Sprague-Dawley-Ratten, Ww: weibliche Wistar-Ratten; Fisher-Exact, $p < 0,05$).

werden. Etwa ein Drittel der Tiere zeigte einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen und ein Fünftel einen rein fokalen Status. Tiere, die keinen Status epilepticus entwickelten, blieben mit weniger als 8 % die Ausnahme. Zwischen den drei Tiergruppen gab es statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Entwicklung eines Status (Tab. 9). So zeigten signifikant mehr weibliche Wistar-Ratten als weibliche Sprague-Dawley-Ratten keinen Status epilepticus (exakter Test nach Fisher, $p = 0,04$), gleichzeitig war die Zahl von Tieren mit einem generalisierten Status epilepticus signifikant geringer ($p = 0,01$). Männliche Sprague-Dawley-Ratten entwickelten häufiger einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen als weibliche Sprague-Dawley-Ratten ($p = 0,04$).

Das beobachtete Verhalten **während** der elektrischen Stimulation war bei allen Tieren vergleichbar, unabhängig von Geschlecht und Stamm der Ratten. Innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Stimulation war bei allen Tieren fokale Krampfaktivität (Anfälle des Stadiums 1 bis 3) zu erkennen, die in der Regel kontinuierlich bis zum Ende der Stimulation anhielt. Diese andauernde fokale Aktivität wurde durch generalisierte Anfälle unterschiedlicher Länge und Zahl unterbrochen (siehe Tabelle 10). Nur bei zwei Tieren war während der gesamten Stimulation kein generalisierter Anfall zu beobachten, wobei ein Tier dennoch einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen und das andere Tier einen fokalen Status epilepticus nach Beendigung der Stimulation entwickelte. Die Art des induzierten Status epilepticus wurde unmittelbar **nach** Abbruch der elektrischen Stimulation bestimmt. Einige Ratten zeigten keine anhaltende Krampfaktivität und ihr Verhalten normalisierte sich innerhalb weniger Minuten. Bei diesen Tiere wurde also kein selbsterhaltender Status epilepticus beobachtet. Andere Tiere entwickelten nach Abbruch der Stimulation kontinuierliche fokale Krampfaktivität, wobei hauptsächlich Anfälle des Stadiums 2 auftraten und gelegentlich von einzelnen Anfällen des Stadiums 3 unterbrochen wurden. Ein solcher Status epilepticus wurde als fokal definiert. Bei weiteren Ratten konnten anhaltend fokale Anfälle, vorwiegend des Stadiums 2, beobachtet werden, wobei die fokale Aktivität durch einzelne generalisierte Anfälle der Stadien 4 und 5 unterbrochen wurde. Auf einen generalisierten Anfall folgte unmittelbar wieder fokale Krampfaktivität. Solche Tiere hatten einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen. Tiere mit einem generalisierten Status epilepticus zeigten dagegen ununterbrochen generalisierte Krampfaktivität und unterschieden sich in der Verhaltensbeobachtung nicht von Ratten, bei denen ein Status epilepticus durch Lithium und Pilocarpin induziert wurde.

Während der elektrischen Stimulation wurden die Parameter „Latenz in Minuten bis zum ersten generalisierten Anfall nach Beginn der Stimulation“, „Anzahl generalisierter Anfälle während der gesamten Stimulationsdauer von 25 min“ sowie „kumulative generalisierte Krampfdauer während der gesamten Stimulationsdauer von 25 min“ in Abhängigkeit von der Art des induzierten Status epilepticus ausgewertet (Tabelle 10).

Parameter während der elektrischen Stimulation	**Nach Abbruch der elektrischen Stimulation: Art des induzierten Status epilepticus**			
	kein SE	**fokaler SE**	**fokaler SE mit gen. Anfällen**	**generalisierter SE**
Latenz (min) bis zum 1. generalisierten Anfall nach Beginn der Stimulation				
Mittelwert	3,5	4,4	2,9	2,1
Median	2,5	3,0	2,0	2,0
St.D.	2,7	5,8	3,1	0,9
min.-max.	2 – 9	1 – 23	1 – 16	1 – 5
Gruppengröße	6	13	22	34
Anzahl generalisierter Anfälle				
Mittelwert	3,2	2,9	4,4	6,2*
Median	3,5	2,5	4,0	7,0
St.D.	1,0	2,0	2,0	2,0
min.-max.	2 – 4	0 – 7	0 – 8	2 – 9
Gruppengröße	6	14	24	35
kumulative Krampfdauer der generalisierten Anfälle (sec)				
Mittelwert	165	121	250	563*
Median	145	100	285	550
St.D.	124	109	139	255
min.-max.	30 – 398	0 – 365	0 – 490	50 – 1100
Gruppengröße	6	12	21	21

Tabelle 10:
Verlauf der elektrischen Stimulation der BLA bezogen auf den dadurch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus (SE). Angegeben sind der Zeitpunkt des Auftretens des ersten generalisierten Anfalls nach Stimulationsbeginn in Minuten, die Anzahl der generalisierten Anfälle während der gesamten Stimulationsdauer (25 min) und die Summe der einzelnen Längen der generalisierten Anfälle als kumulative Krampfdauer in Sekunden. Signifikante Unterschiede zu allen drei anderen Gruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet (post hoc Dunn's-Test, $p < 0,05$). Da von einigen Tieren nicht alle Parameter während der Stimulation erfaßt wurden, variieren die angegebenen Gruppengrößen.
(gen. = generalisiert;
St.D. = Standardabweichung)

Der Zeitraum bis zum ersten generalisierten Anfall nach Stimulationsbeginn lag zwischen 2 und 4 min (Tabelle 10). Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten des induzierten Status epilepticus (nicht parametrische Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis, $p = 0,10$), obwohl die Tendenz

zu erkennen war, daß Tiere mit generalisiertem Status epilepticus auch schneller den ersten generalisierten Anfall während der Stimulation zeigten.

Die Anzahl generalisierter Anfälle, die während der Stimulation beobachtet werden konnten, lag in einem Bereich zwischen 0 und 9 Anfällen. Tiere, die einen generalisierten Status epilepticus entwickelten, zeigten signifikant mehr Anfälle als Tiere aller drei anderen Gruppen (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Entsprechend war auch die kumulative Krampfdauer als Summe der Längen der einzelnen Anfälle bei Tieren dieses Status-Typs signifikant höher als bei Tieren mit fokalem bzw. keinem Status epilepticus (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$).

Beachtenswert ist, daß Ratten, die keinen anhaltenden Status epilepticus nach Abbruch der elektrischen Stimulation entwickelten, sich nicht von Tieren mit fokalem Status epilepticus hinsichtlich der Zahl und der kumulativen Krampfdauer der Anfälle während der Stimulation unterschieden. Aus diesem Grund ist mittels einer Verhaltensbeobachtung während der elektrischen Stimulation eine Aussage darüber, ob und welche Art des Status epilepticus die Tiere anschließend entwickeln, nur hinsichtlich eines generalisierten Status epilepticus eingeschränkt möglich. Ratten, die keinen oder einen fokalen Status epilepticus mit oder ohne generalisierte Anfälle entwickelten, waren während der Stimulation nicht zu unterscheiden.

Die Auswertung der Daten (erster generalisierter Anfall, Zahl der generalisierten Anfälle, kumulative Krampfdauer während der Stimulation) nach Geschlecht und Stamm unabhängig vom Status epilepticus-Typ ergab eine statistisch signifikant kürzere kumulative Krampfdauer bei weiblichen Wistar-Ratten verglichen mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Dieser Unterschied erklärt sich dadurch, daß Tiere mit einem generalisierten Status epilepticus während der Stimulation eine signifikant längere generalisierte Krampfdauer aufwiesen als Tiere mit einem anderen Status-Typ und weibliche Wistar-Ratten in signifikant geringerer Zahl einen generalisierten Status epilepticus entwickelten als weibliche Sprague-Dawley-Ratten.

Annähernd alle Ratten mit generalisierter Krampfaktivität während des induzierten Status epilepticus entwickelten später spontane Anfälle, während nur etwa ein Drittel der Tiere mit einem rein fokalen Status epilepticus spontane Anfälle zeigten. Diese Ergebnisse werden ausführlich in Kapitel 4.3.2.2 beschrieben. An dieser Stelle soll allerdings untersucht werden, ob sich die Tiere mit und ohne spontane Anfälle nach einem **fokalen Status epilepticus** bereits während der elektrischen Stimulation

unterschieden. Dazu wurden die Parameter „Latenz bis zum ersten generalisierten Anfall nach Beginn der Stimulation“, „Anzahl generalisierter Anfälle während der gesamten Stimulation“, „kumulative generalisierte Krampfdauer während der gesamten Stimulation“ sowie die Längen der induzierten fokalen Status epilepticus

Parameter während der elektrischen Stimulation und Länge des induzierten Status epilepticus	**Nach fokalem Status epilepticus: Tiere mit spontanen Anfällen (n = 4)**		**Tiere ohne spontane Anfälle (n = 7)**
Latenz (min) bis zum 1. generalisierten Anfall nach Beginn der Stimulation			
Mittelwert	2,3		6,0
Median	2,0		4,0
St.D.	0,5		7,8
min.-max.	2 – 3		1 - 23
p-Wert		0,53	
Anzahl generalisierter Anfälle			
Mittelwert	3,0		3,0
Median	3,0		2,0
St.D.	1,8		2,2
min.-max.	1 – 5		1 - 7
p-Wert		0,93	
kumulative Krampfdauer der generalisierten Anfälle (sec)			
Mittelwert	176		107
Median	145		80
St.D.	135		89
min.-max.	50 – 365		20 - 275
p-Wert		0,41	
Länge des induzierten Status epilepticus (h)			
Mittelwert	4,5		3,0
Median	4,3		1,5
St.D.	3,3		2,6
min.-max.	1,3 – 8,0		0,7 – 7,0
p-Wert		0,32	

Tabelle 11:
Induktion eines **rein fokalen Status epilepticus** in Ratten durch elektrische Stimulation der BLA über 25 min. Die während der Stimulation ermittelten Parameter sowie die Länge des induzierten Status epilepticus sind in Abhängigkeit von der späteren Entwicklung von spontanen Anfällen dargestellt. Ratten mit spontanen Anfällen unterschieden sich während der Stimulation und in der Status-Länge nicht von Tieren, die keine Anfälle entwickelten (Mann-Whitney U-Test, p-Werte sind angegeben).
(St.D. = Standardabweichung)

(näheres hierzu siehe nächsten Abschnitt) getrennt für Tiere mit spontanen Anfällen und anfallsfreien Tieren ausgewertet (Tabelle 11). Demnach unterschieden sich Tiere, die nach einem fokalen Status epilepticus eine Epilepsie entwickelten, in keinem der vier Parameter statistisch signifikant von Tieren, bei denen keine spontanen Anfälle nach einem fokalen Status beobachtet wurden (Mann-Whitney U-Test).

Im Gegensatz zum Lithium-Pilocarpin-Modell wurde im Modell der elektrischen BLA-Stimulation der Status epilepticus nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt abgebrochen. Frühere Versuche von BRANDT (2002) hatten gezeigt, daß Ratten, bei denen der elektrisch induzierte Status epilepticus nach 90 min mit Diazepam abgebrochen wurde, keine spontanen Anfälle entwickelten. Aus diesem Grund wurde auf eine Limitierung der Status-Länge verzichtet. Das Erlöschen der motorischen Krampfaktivität konnte nicht für alle Ratten exakt bestimmt werden. Da nur zwei Stimulationseinheiten zur Verfügung standen, wurden einige Tiere zu einer späteren Tageszeit stimuliert. Da allerdings die Verhaltensbeobachtungen abends mit Beginn der Dunkelphase eingestellt wurden, konnte die Länge des induzierten Status epilepticus bei den entsprechenden Tieren nicht genau bestimmt werden (siehe Kap. 3.2.3.2). Aufgrund der unterschiedlichen Beobachtungsdauer wurden daher nicht für alle Tiere die Daten hinsichtlich der Länge des Status epilepticus statistisch ausgewertet.

Ein generalisierter Status epilepticus ging in der Regel nach einer gewissen Zeit in einen fokalen Status epilepticus mit oder ohne generalisierte Anfälle über. Diese generalisierte Phase dauerte mindestens 2 h und höchstens 5,5 h an. Bei vier Tieren (drei weibliche Wistar- und eine weibliche Sprague-Dawley-Ratte) traten innerhalb dieser Phase schwere tonisch-klonische Krämpfe auf, die zu einem Erlöschen der motorischen Krampfaktivität und der epileptischen Entladungen (Spikes) im EEG führten. Bei den übrigen 32 Tieren schloß sich eine fokale Phase an, die mindestens 30 min bis zu maximal 20 h (keine motorische Krampfaktivität mehr am Morgen des auf die Stimulation folgenden Tages) andauerte. Bei 15 Ratten konnte die Gesamtlänge des Status epilepticus genau bestimmt werden. Die Gesamtlänge des Status epilepticus variierte demnach zwischen 4 h und 10 h (Mittelwert 7,7; Median 8,0; St.D. 1,8).

Die Länge des Status epilepticus bei Tieren, die einen fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen zeigten, betrug mindestens 4 h. Die exakte Dauer des Status epilepticus konnte bei 14 von 24 Ratten bestimmt werden. Aus diesen Daten ergab sich ein Mittelwert von 6,5 h (Median 7,3; St.D. 1,6), wobei die Einzelwerte zwischen 4 h und 8 h lagen. Die Häufigkeit der isoliert auftretenden generalisierten Anfälle während des Status epilepticus variierte stark zwischen den Tieren. Das Minimum war ein Anfall, das Maximum 19 Anfälle in der ersten Stunde nach Stimulationsende. In der Regel nahm die Zahl generalisierter Anfälle mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Stimulation ab, so daß die generalisierte Krampfaktivität vor dem Erlöschen fokaler Aktivität endete.
Ratten mit einem rein fokalen Status epilepticus ließen eine deutliche Tendenz zu einer kürzeren Status-Länge erkennen. Bei allen 14 Tieren dieses Status-Typs konnte die Länge des Status epilepticus bestimmt werden. Im Mittel hielt dieser 3,5 h an, variierte aber in einem breiten Bereich von 40 min bis 8 h (Median 3,3; St.D. 2,6).
Die statistische Auswertung der Daten von Tieren, deren Status epilepticus-Länge im Beobachtungszeitraum bestimmbar war, ergab einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Status epilepticus-Typen (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Ein rein fokaler Status epilepticus hatte eine signifikant geringere Dauer als ein generalisierter Status epilepticus (post hoc Dunn's-Test, $p < 0,05$).

Bei 40 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde die rektale Körpertemperatur unmittelbar vor Beginn der Stimulation und 2 h später im Status epilepticus bestimmt. Die Tiere waren an den Tagen zuvor an die Temperaturmessung sowie das Labor adaptiert worden. Da nur drei dieser Tiere einen rein fokalen Status epilepticus zeigten, wurden die Daten dieser Tiere nicht weiter ausgewertet. Die durchschnittliche Temperatur vor Beginn der elektrischen Stimulation betrug 37,4 °C (Abbildung 16). Sie stieg bei Tieren mit einem generalisierten Status epilepticus signifikant an, während die Temperatur bei Tieren mit einem fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen auch nach 2 h motorischer Krampfaktivität in diesem Bereich blieb. Die durchschnittliche Temperatur war außerdem im generalisierten Status epilepticus signifikant höher als im fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen (zweifaktorielle Varianzanalyse, post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).

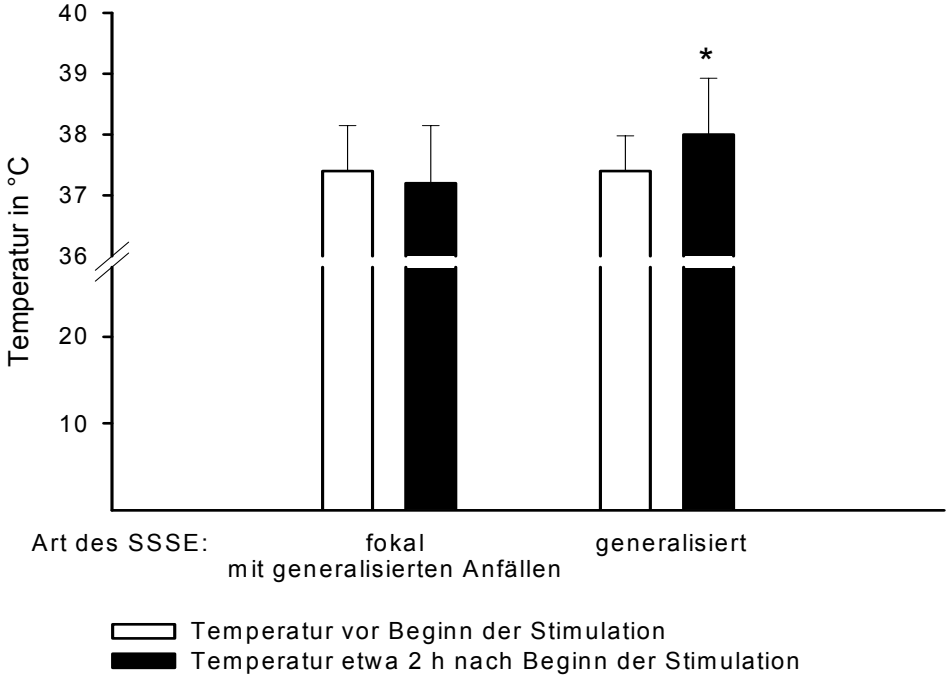


Abbildung 16:
Veränderung der Körpertemperatur im selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) in Abhängigkeit von der Art des SSSE bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten. Als weiße Säulen dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Körpertemperatur vor Beginn der Stimulation, die schwarzen Säulen geben Mittelwerte und Standardabweichungen der Körpertemperatur etwa 2 h nach Beginn der elektrischen Stimulation der BLA an. Im generalisierten SSSE (n = 27) stieg die Temperatur signifikant an, während sie im fokalen SSSE mit generalisierten Anfällen (n = 10) keine signifikante Veränderung zeigte. (* post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$)

4.3.1.2 Mortalität

Die Mortalität in diesem Modell war trotz der Tatsache, daß der induzierte Status epilepticus nicht abgebrochen wurde, gering und lag in der gesamten Gruppe unter 3 %. Von den insgesamt 74 Tieren, bei denen durch die elektrische Stimulation der BLA ein Status epilepticus induziert wurde, verstarben nur zwei Tiere innerhalb von 48 Stunden nach Beginn der Stimulation (Tabelle 9). Bei den verstorbenen Ratten handelte es sich um weibliche Wistar-Ratten, bei denen im Verlauf eines generalisierten Status epilepticus etwa 3 h nach Beginn der Stimulation schwere tonische Krämpfe auftraten. Die dritte Wistar-Ratte, bei der diese Streckkrämpfe beobachtet werden konnten, verstarb 7 Tage nach der Stimulation. Folglich überlebte nur eine weibliche Wistar-Ratte mit generalisiertem Status epilepticus. Die Sterblichkeitsrate betrug somit bei weiblichen Wistar-Ratten über 14 %, während bei Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts keine Todesfälle auftraten. Der

Unterschied zu weiblichen Sprague-Dawley-Ratten war dabei statistisch signifikant (Fisher-Exact, $p < 0,05$), allerdings nicht zu männlichen Sprague-Dawley-Ratten ($p = 0,48$).

4.3.1.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus

Das Allgemeinbefinden der Ratten mit Status epilepticus war in der Regel an den ersten Tagen nach der Stimulation nur geringgradig gestört. Sie verhielten sich ruhiger, reagierten aber auch auf Berührung empfindlicher als dies normalerweise der Fall war. Von den 31 Ratten, mit denen zur Modelletablierung weiter gearbeitet wurde (von den insgesamt 40 Tieren hatten 6 keinen Status epilepticus, weitere 3 verstarben), wurden 10 Tiere (32 %) über einen Zeitraum von durchschnittlich 4 Tagen (1 – 10 Tage) mit Babybrei gefüttert. Die Schwere des Status epilepticus stand dabei in keiner Korrelation zum Allgemeinbefinden und zur selbständigen Futteraufnahme.

4.3.2 Spontane Anfälle

Analog zum Lithium-Pilocarpin-Modell sollte auch bei diesen Ratten untersucht werden, wann und mit welcher Frequenz spontane epileptische Anfälle nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus auftreten. Außerdem sollte festgestellt werden, ob Geschlecht und Stamm der Tiere oder die Art des selbsterhaltenden Status einen Einfluß auf die Epileptogenese haben. Die systematische Überwachung der Ratten begann etwa vier Wochen nach Induktion des Status epilepticus. Bei Registrierung eines fokalen Anfalls wurde die Überwachung bis zur Beobachtung des ersten generalisierten Anfalls fortgesetzt.

4.3.2.1 Überwachungsaufwand

Bei keinem Tier wurde ein generalisierter Anfall vor Ablauf der vier Wochen beobachtet, so daß im folgenden 31 Tiere systematisch überwacht wurden. Bei Summierung der individuellen Überwachungszeiten ergab sich eine Gesamtdauer von 4229 h.

Diese gliederte sich wie folgt auf drei Gruppen auf. Zehn Ratten waren insgesamt 898 h überwacht worden, zeigten ihren ersten Anfall aber außerhalb der regulären Überwachung zufällig während des Handlings. Zu diesem Zeitpunkt betrug die

durchschnittliche Überwachungszeit 90 h in 4 Wochen (von 12 h / 1 Wo bis 322 h / 10 Wo). Bei 13 Tieren wurde der erste Anfall im Rahmen der systematischen Überwachung registriert. Auf diese Ratten entfielen 849 h, wobei der durchschnittliche Überwachungsaufwand bei 65 h in 4 Wochen lag (min. 12 h / 1 Wo; max. 222 h / 10 Wo). Wie beim Lithium-Pilocarpin-Modell war der Großteil der Überwachungszeit mit 2482 h für die 8 Tiere erforderlich, bei denen letztendlich das Monitoring eingestellt wurde und die als anfallsfrei galten. Die entsprechenden Tiere waren durchschnittlich über einen Zeitraum von 14 Wochen 310 h aufgezeichnet worden (301 – 318 h in 12 – 16 Wochen).

Demnach wurde bei 10 Tieren (32 %) der erste generalisierte epileptische Anfall trotz Überwachung zufällig beobachtet. Bei weiteren 13 Ratten (42 %) konnte dieses Ereignis im Rahmen der systematischen Überwachung festgehalten werden. Die verbleibenden 8 Tiere (26 %) wurden erst nach einem intensiven Monitoring als „mit hoher Wahrscheinlichkeit anfallsfrei“ bezeichnet.

Der Anteil epileptischer Tiere, die zufällig oder durch eine systematische Überwachung selektiert werden konnten, bzw. anfallsfreier Tiere unterschied sich nicht signifikant von den Ergebnissen im Lithium-Pilocarpin-Modell (siehe Kapitel 4.2.2.1, Chi-Quadrat Test).

4.3.2.2 Auftreten und Frequenz der spontanen Anfälle

Unabhängig von Geschlecht und Stamm der Ratten entwickelten annähernd alle Tiere, bei denen während des Status epilepticus generalisierte Krampfaktivität beobachtet werden konnte, spontane Anfälle (Abbildung 17). Der prozentuale Anteil von Tieren, die nach einem rein fokalen Status epilepticus epileptische Anfälle zeigten, war statistisch signifikant niedriger (exakter Test nach Fisher, $p < 0{,}01$ bzw. $p = 0{,}04$). Hinsichtlich der Länge des fokalen Status epilepticus bei diesen Tieren war nicht die Tendenz zu erkennen, daß eine bestimmte Mindestdauer zur Entwicklung spontaner Anfälle erforderlich ist. Die Status-Längen betrugen 75 min, 2 h, 7 h und 8 h, wobei andere Ratten mit vergleichbarer Dauer des fokalen Status epilepticus keine Anfälle entwickelten (siehe hierzu Kapitel 4.3.1.1, Tabelle 11).

Die Ausbeute an epileptischen Ratten in Abhängigkeit von Geschlecht und Stamm der Tiere (Abbildung 18) war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (exakter Test nach Fisher). Es bestand allerdings die Tendenz, daß Sprague-

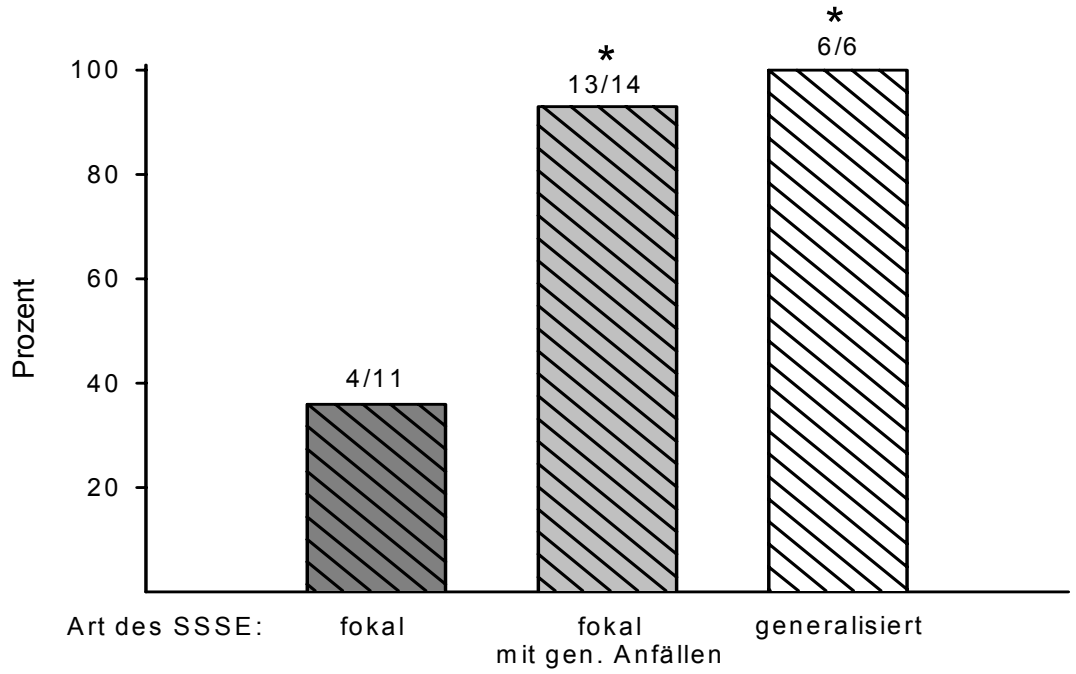


Abbildung 17:
Dargestellt sind die prozentualen Anteile von Ratten mit spontanen epileptischen Anfällen in Abhängigkeit von der Art des elektrisch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE). Tiere, die während des SSSE generalisierte Krampfaktivität zeigten, entwickelten in signifikant höherer Zahl spontane Anfälle (* exakter Test nach Fisher, $p < 0,05$).
Die absoluten Tierzahlen sind über den Balken angegeben.
(gen. = generalisiert)

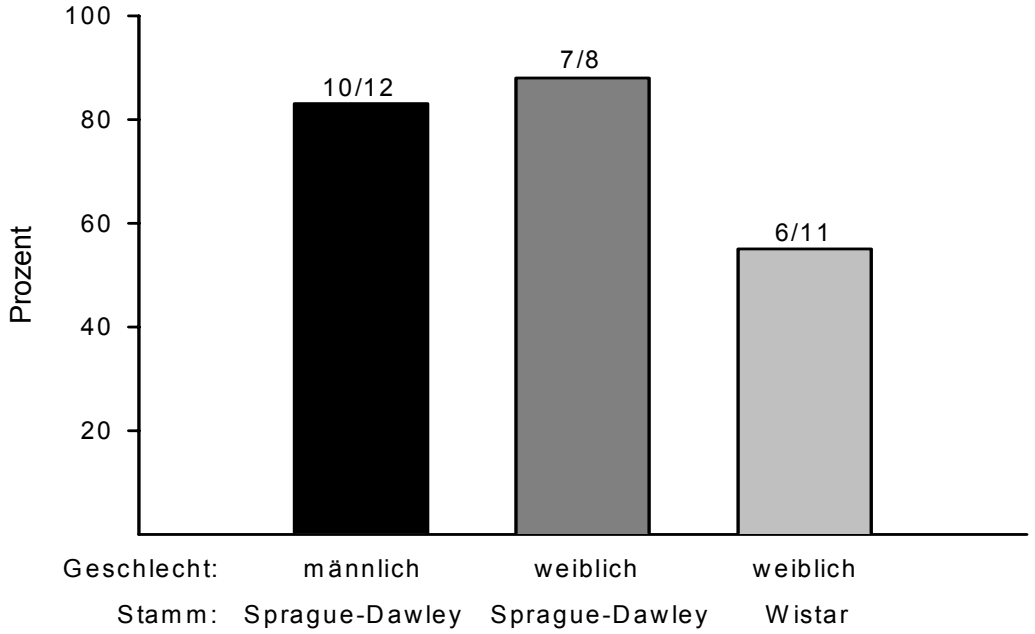


Abbildung 18:
Dargestellt sind die prozentualen Anteile von Ratten mit spontanen epileptischen Anfällen nach elektrischer Induktion eines Status epilepticus durch Stimulation der BLA in Abhängigkeit von Geschlecht und Stamm der Tiere. Die Tiergruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Die absoluten Tierzahlen sind über den Balken angegeben.

Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts zu einem höheren Prozentsatz spontane Anfälle nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus entwickelten als weibliche Wistar-Ratten. Diese Tendenz spiegelte das geringere Auftreten generalisierter Krampfaktivität während des Status epilepticus bzw. die vorhandene Mortalität nach generalisiertem Status epilepticus bei weiblichen Wistar-Ratten wider (siehe Tabelle 9).

Die Länge der Latenzphase bis zum Auftreten des ersten epileptischen Anfalls zeigte innerhalb der Gruppen, unabhängig von Status-Typ oder Geschlecht und Stamm, große Schwankungen. Bei 5 Tieren war der erste beobachtete Anfall fokal. Durchschnittlich 11 Tage später wurde bei diesen Tieren der erste generalisierte Anfall beobachtet.
Nach einem fokalen Status epilepticus vergingen durchschnittlich 69 Tage, bis der erste spontane Anfall registriert werden konnte. Traten während des fokalen Status epilepticus auch generalisierte Anfälle auf, reduzierte sich die durchschnittliche Latenzphase auf 46 Tage. Tiere mit einem generalisierten Status epilepticus zeigten

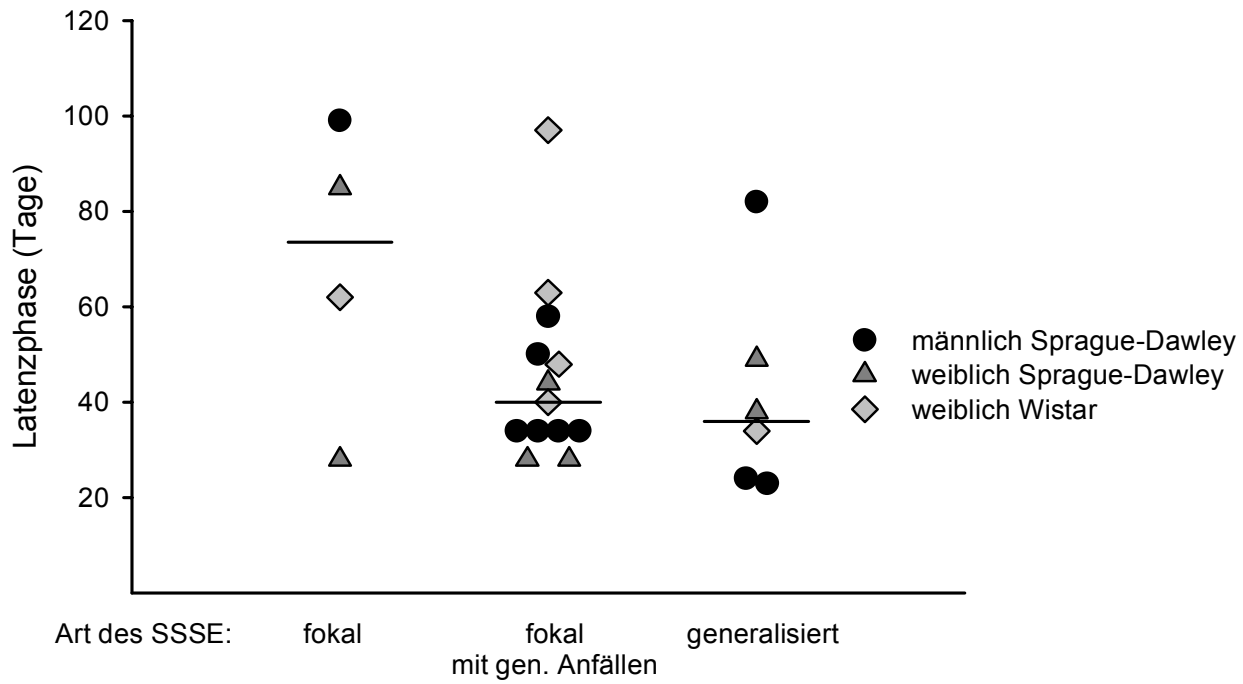


Abbildung 19:
Einzelwertdarstellung der Latenzphase (Tage nach elektrischer Stimulation) bis zum ersten spontanen Anfall in Abhängigkeit von der Art des selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) nach elektrischer Stimulation der BLA. Angegeben ist zusätzlich der Median innerhalb der Gruppen. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten des SSSE in der Länge der Latenzphase.
(gen. = generalisiert)

bereits im Mittel nach 42 Tagen ihren ersten Anfall (Abbildung 19). Die Latenzphase schien um so kürzer zu sein, je schwerer die Krampfaktivität während des Status epilepticus war, es gab allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (einfaktorielle Varianzanalyse, p = 0,15).

Bei weiblichen Wistar-Ratten betrug die durchschnittliche Latenzphase 57 Tage. Weibliche Sprague-Dawley-Ratten zeigten bereits nach 43 Tagen ihren ersten epileptischen Anfall und männliche Ratten des gleichen Stammes nach 47 Tagen (Abbildung 20). Demnach war bei weiblichen Wistar-Ratten, verglichen mit Sprague-Dawley-Ratten, die Tendenz zu einer späteren Entwicklung von spontanen Anfällen zu erkennen, die Unterschiede zwischen den Gruppen waren allerdings nicht signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, p = 0,53).

Die spontanen Anfälle unterschieden sich bezüglich der Charakteristika Schwere und Dauer nicht in den verschiedenen Gruppen. Einige Tage vor dem ersten spontanen Anfall zeigten manche Ratten Myoklonien während des Handlings. Bei 9 von den insgesamt 23 Tieren konnten neben spontanen generalisierten Anfällen auch fokale

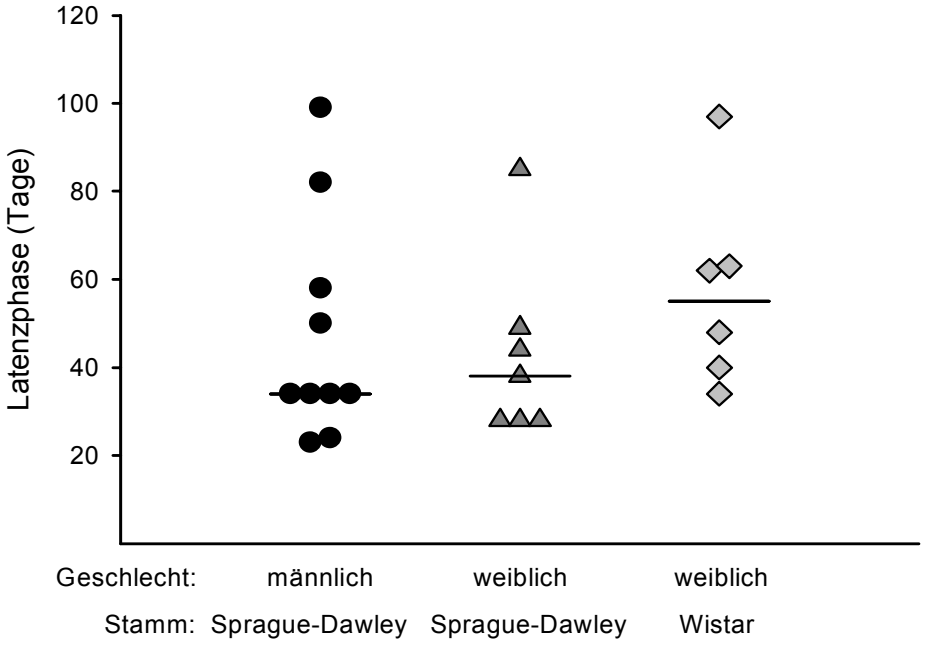


Abbildung 20:
Einzelwertdarstellung der Latenzphase (Tage nach Induktion eines Status epilepticus durch elektrische Stimulation der BLA) bis zum ersten spontanen Anfall in Abhängigkeit von Geschlecht und Stamm der Tiere. Angegeben ist zusätzlich der Median innerhalb der Gruppen. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Ratten der Stämme Wistar und Sprague-Dawley in der Länge der Latenzphase.

Anfälle der Stadien 2 – 3 beobachtet werden. Nur bei einer Ratte wurden ausschließlich fokale Anfälle aufgezeichnet. In der Regel wurden fokale Anfälle während des Handlings der Ratten registriert, nur wenige fokale Anfälle wurden mittels Video und EEG aufgezeichnet. Die generalisierten Anfälle begannen zunächst fokal, bevor eine Ausbreitung der motorischen Aktivität zu erkennen war. Die durchschnittliche Krampfdauer betrug 36 sec (St.D. 14; min. 7, max. 63). Dieser Wert ergab sich aus dem Durchschnitt der individuellen Mittelwerte von 17 Tieren, von denen insgesamt 76 Anfälle auf Video aufgezeichnet worden waren. Die Längen zufällig beobachteter Anfälle wurden nicht berücksichtigt, da sie in der Mehrzahl der Fälle nur als Schätzwerte notiert worden waren.

Analog zum Lithium-Pilocarpin-Modell wurde durchschnittlich 114 Tage (110 bis 119 Tage) nach der elektrischen Induktion des Status epilepticus eine Frequenz-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Tiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h in der Hellphase überwacht und die Gesamtzahl der Anfälle in diesem Zeitraum bestimmt. Männliche Sprague-Dawley-Ratten (n = 10) zeigten durchschnittlich 2,5 Anfälle, weibliche Sprague-Dawley-Ratten (n = 7) 1,0 Anfälle und weibliche Wistar-Ratten (n = 4) 1,3 Anfälle. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (nicht parametrische Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis, p = 0,88), männliche Tiere des Stamms Sprague-Dawley tendierten aber zu einer höheren Zahl von Anfällen. Der Mittelwert aller 21 Tiere lag bei 1,8 Anfällen, die Einzelwerte sind der Abbildung 21 zu entnehmen.
Die Auswertung der Zahl spontaner Anfälle hinsichtlich der Schwere des Status epilepticus ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Status epilepticus-Typen (Kruskal-Wallis, p = 0,40).

Bei den insgesamt 21 überwachten Ratten traten spontane Anfälle an maximal 3 Tagen während der Frequenz-Analyse auf. Zwei Tiere zeigten 6 bzw. 9 Anfälle an einem Tag, an den übrigen Tagen konnten keine Anfälle beobachtet werden.
Während der Monate, die dem Status epilepticus folgten, entstand der Eindruck, daß bei einigen Tieren die Zahl spontaner Anfälle zurückging. Besonders deutlich war dies bei zwei Ratten, die am ersten Tag ihrer systematischen Überwachung 6 bzw. 12 Anfälle hatten, während der Frequenz-Analyse nach einigen Monaten aber keine Anfälle mehr zeigten.

Verhaltensänderungen, wie sie bei epileptischen Tieren nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus beobachtet werden konnten, traten in diesem Epilepsiemodell nicht auf. Die Ratten waren in der Regel während der gesamten Zeit gut zu handeln.

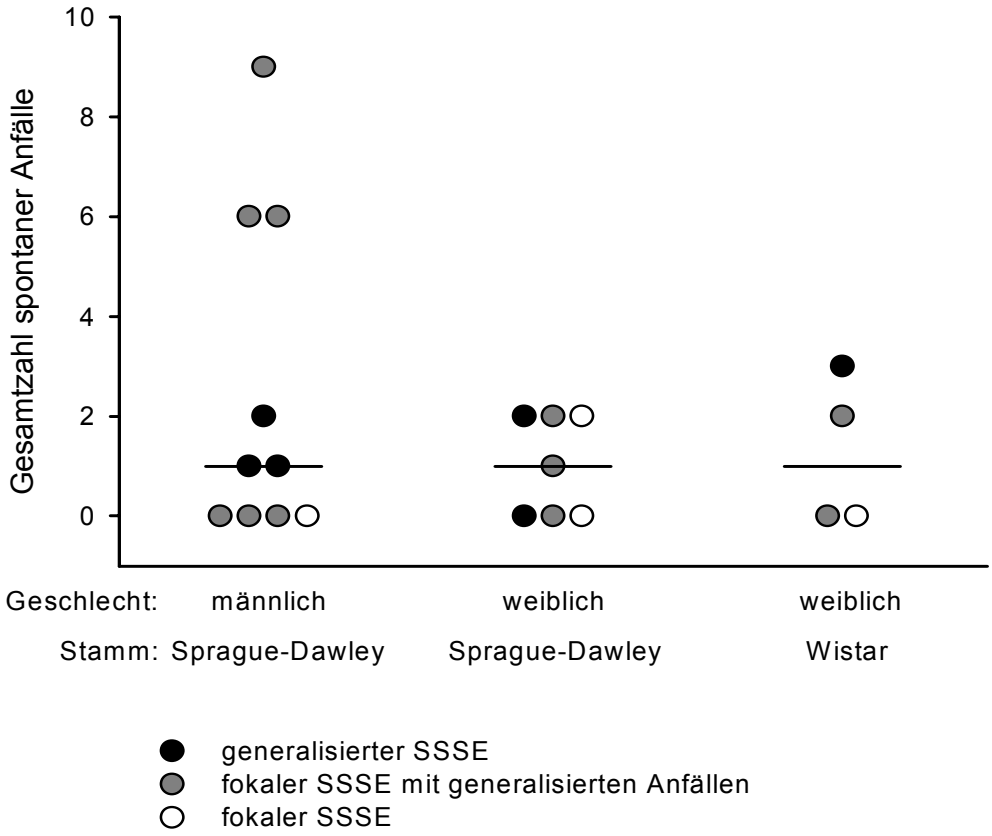


Abbildung 21:
Darstellung der Einzelwerte der Gesamtzahl spontaner Anfälle während der Frequenz-Analyse (an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 12 h Überwachung) etwa 4 Monate nach elektrischer Stimulation der BLA in Abhängigkeit von Geschlecht und Stamm der Ratten. Angegeben ist zusätzlich der Median innerhalb der Gruppen. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Geschlechtern und Stämmen noch zwischen den drei verschiedenen Arten des induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus (SSSE) hinsichtlich der Anzahl spontaner Anfälle.
○ : Gesamtzahl der Anfälle für jede Ratte in der Überwachungszeit von 48 h
— : Median

4.4 Vergleich beider Epilepsiemodelle

In diesem Kapitel sollen die generellen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen dem Lithium-Pilocarpin-Modell (Kapitel 4.2) und dem Modell der elektrischen BLA-Stimulation (Kapitel 4.3) abschließend dargestellt werden. Die Gegenüberstellung erfolgt unabhängig von den verschiedenen Versuchsprotokollen im Lithium-Pilocarpin-Modell bzw. den unterschiedlichen Stämmen und Geschlechtern, die im Modell der elektrischen BLA-Stimulation verwendet wurden.

Rund zwei Drittel aller Tiere entwickelten einen Status epilepticus nach der Applikation von Lithium und Pilocarpin. Mittels elektrischer Stimulation der BLA konnte bei über 90 % aller Ratten ein Status epilepticus ausgelöst werden.

Nach der einmaligen bzw. fraktionierten Applikation von Pilocarpin wurde zunächst fokale Krampfaktivität beobachtet, die nach gut 30 bzw. 60 min in den ersten generalisierten Anfall überging. Etwa 10 min später begann der Status epilepticus, der sich als anhaltend generalisierte Krampfaktivität bis zum Abbruch mittels Diazepam darstellte. Im Modell der elektrischen BLA-Stimulation wurde ebenfalls unmittelbar nach Beginn der Stimulation fokale Krampfaktivität festgestellt, die allerdings schon nach 2 bis 4 min durch den ersten generalisierten Anfall unterbrochen wurde. Die fokale Krampfaktivität hielt bis zum Stimulationsende an, wobei unterschiedlich lange Phasen generalisierter Anfälle beobachtet werden konnten. Nach Abbruch der Stimulation normalisierte sich das Verhalten einiger Ratten innerhalb weniger Minuten, obwohl diese Tiere während der Stimulation ebenfalls kontinuierlich motorische Krampfaktivität gezeigt hatten. Bei einem Großteil der stimulierten Tiere hielt die epileptische Aktivität allerdings an und konnte anhand der Schwere der Anfälle in drei Arten unterschieden werden: fokaler Status epilepticus, fokaler Status epilepticus mit einzelnen generalisierten Anfällen, generalisierter Status epilepticus. Ratten mit einem generalisierten Status epilepticus nach elektrischer Stimulation der BLA waren nicht von Ratten mit einem lithium-pilocarpin-induzierten Status epilepticus zu unterscheiden.

Die Mortalität im Lithium-Pilocarpin-Modell war, neben der Vorgehensweise bei der Pilocarpin-Applikation (einmalig versus fraktioniert), abhängig von der Länge des Status epilepticus. Ein Abbruch des Status zu einem früheren Zeitpunkt führte zu einer Senkung der Mortalitätsrate. Im Modell der BLA-Stimulation wurde der Status epilepticus nicht abgebrochen, trotzdem war die Mortalität verglichen mit dem

Lithium-Pilocarpin-Modell insgesamt gering. Die Mortalität in dem elektrischen Epilepsiemodell war jedoch deutlich abhängig von Geschlecht und Stamm der verwendeten Ratten.

Das Allgemeinbefinden der Ratten nach einem lithium-pilocarpin-induzierten Status epilepticus war als hochgradig gestört über mehrere Tage zu bezeichnen, während die Tiere nach einem elektrisch induzierten Status nur eine geringe Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens zeigten, obwohl die Dauer des Status deutlich länger war. Auch wurden im Modell der BLA-Stimulation keine dem Lithium-Pilocarpin-Modell vergleichbaren Verhaltensänderungen der Ratten in den Wochen nach Status epilepticus beobachtet.

Im Lithium-Pilocarpin-Modell entwickelten rund 80 % aller Ratten nach dem Status epilepticus spontane Anfälle, unabhängig vom Versuchsprotokoll. Im Modell der BLA-Stimulation konnten spontane Anfälle bei etwa 75 % aller Tiere beobachtet werden. Allerdings war in diesem Modell eine Status-Länge von 90 min nicht ausreichend, um später spontane Anfälle bei den Tieren auszulösen (BRANDT 2002). Dies ist ein Gegensatz zum Lithium-Pilocarpin-Modell, wo bereits eine Länge des Status epilepticus von 60 min genügte, um später spontane Anfälle bei den Ratten feststellen zu können. Rückblickend war in dem Modell der BLA-Stimulation die Schwere des induzierten Status epilepticus prädiktiv für die Entwicklung spontaner Anfälle. Mit zunehmender generalisierter Krampfaktivität während des Status stieg auch die Wahrscheinlichkeit für die Induktion der Epileptogenese.

Die Latenzphase bis zum ersten Anfall betrug im Lithium-Pilocarpin-Modell je nach Versuchsprotokoll zwischen 4 und 6 Wochen. Im Modell der BLA-Stimulation lag die Latenzphase zwischen 6 und 10 Wochen, wobei die Tendenz bestand, daß mit zunehmender Schwere des induzierten Status epilepticus die Latenzphase kürzer wurde. Die spontanen Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell waren generalisiert und hatten eine durchschnittliche Länge von 43 sec. Die durchschnittliche Anfallsfrequenz an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 12 h Überwachung in der Hellphase lag zwischen 2,4 und 3,9 Anfällen. Im Modell der BLA-Stimulation konnten sowohl fokale als auch generalisierte Anfälle beobachtet werden. Die Länge dieser Anfälle betrug durchschnittlich 36 sec. Die Anfälle traten in diesem Modell mit einer Häufigkeit zwischen 1,0 und 2,5 Anfällen im gleichen Zeitraum wie oben genannt auf.

4.5 Untersuchung der Wirkung von Levetiracetam im Lithium-Pilocarpin-Modell

In dieser Studie wurde die Wirkung des neuen Antikonvulsivums Levetiracetam auf spontane Anfälle nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus untersucht. Es wurden 9 Ratten ausgewählt, die während der Frequenz-Analyse (Kapitel 4.2.2.2) mindestens zwei Anfälle hatten. Der Status epilepticus lag zwischen 6 – 10 Monaten zurück, so daß die Tiere bereits über viele Monate epileptische Anfälle zeigten. Ein Tier blieb bei der Auswertung der Daten unberücksichtigt, da während der gesamten Dauer des Versuchs kein Anfall beobachtet werden konnte.
Die Untersuchung gliederte sich in drei aufeinanderfolgende jeweils zweiwöchige Phasen (Kapitel 3.2.2.3). In der *Predrug* Phase wurde die individuelle Grundfrequenz der Anfälle bestimmt. In der anschließenden *Drug* Phase erfolgte die Behandlung, wobei Levetiracetam mittels chronisch implantierter Minipumpen appliziert wurde. Darauf folgte eine zweite Kontrollperiode, die *Postdrug* Phase.
Es wurde neben der Untersuchung von Substanzeffekten in der gesamten Gruppe besonders auf interindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren geachtet. Aus einer Übersichtsarbeit von LÖSCHER (1997) geht hervor, daß starke interindividuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Antikonvulsiva auftreten, wenn mit einem Auszuchtstamm wie Wistar-Ratten gearbeitet wird.

4.5.1 Dosierungen und Blutplasmaspiegel von Levetiracetam

Die Berechnung der durchschnittlichen täglichen Levetiracetam-Dosis, die jedes Tier individuell erhielt, setzte sich aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen konnte anhand der Differenz zwischen Füll- und Restvolumen einer Minipumpe und der Stunden, die diese Pumpe gearbeitet hatte, die Pump-Rate in µl/h berechnet werden. Da bekannt war, wieviel Levetiracetam in der gesamten Lösung vorhanden war, konnte nun die Dosierung in mg/Tag angegeben werden. Zum anderen wurde für jede Ratte das mittlere Körpergewicht in Behandlungswoche 1 bzw. 2 bestimmt. Mit diesem Wert konnte nun die tägliche Dosierung in mg/kg für jedes Tier in den beiden Behandlungswochen berechnet werden.
Die durchschnittliche tägliche Levetiracetam-Dosis lag im Mittel über die gesamten 14 Tage bei 389 mg/kg, wobei sich die individuellen Dosierungen in

Behandlungswoche 1 und 2 nicht signifikant voneinander unterschieden (t-Test für gepaarte Daten, p = 0,61). Die exakte quantitative Bestimmung der Blutplasmaspiegel von Levetiracetam bewies, daß alle Pumpen während der zwei Behandlungswochen funktioniert hatten (Tabelle 12). Die Plasmaspiegel lagen zwischen 33,3 und 61,3 µg/ml, der Mittelwert betrug 43,6 µg/ml nach der ersten bzw. 39,9 µg/ml nach der zweiten Behandlungswoche. Die Mittelwerte unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander (t-Test für gepaarte Daten, p = 0,26).
Die durchschnittliche Tagesdosis von Levetiracetam war weder in Behandlungswoche 1 noch in Behandlungswoche 2 mit den Blutplasmaspiegeln korreliert (Pearson Korrelation, p > 0,05).

Tier-Nr.	Levetiracetam			
	durchschnittliche Tagesdosis (mg/kg)		**Plasmaspiegel (µg/ml)**	
	Behandlungswoche 1	Behandlungswoche 2	Behandlungswoche 1	Behandlungswoche 2
Gl 27	393	424	39,6	36,0
Gl 32	354	405	42,5	53,0
Gl 44	409	404	44,7	40,7
Gl 67	330	319	36,4	38,4
Gl 75	492	378	41,7	34,7
Gl 82	327	354	36,1	33,3
Gl 83	447	377	46,5	41,4
Gl 91	400	407	61,3	41,4
Mittelwert	394	384	43,6	39,9
St.D.	57	34	8,0	6,2
Median	397	391	42,1	39,6

Tabelle 12:
Einzel- sowie Mittelwerte der täglichen Dosierungen und Blutplasmaspiegel von 8 Ratten, die über zwei Wochen mit Levetiracetam behandelt wurden. Die durchschnittliche Tagesdosis wurde anhand der Pump-Raten der verwendeten Minipumpen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere in dem entsprechenden Zeitraum berechnet. Die Plasmaspiegel wurden mittels HPLC bestimmt.
(St.D.: Standardabweichung)

Unter der Behandlung waren keine unerwünschten Wirkungen von Levetiracetam zu beobachten. Die zuvor beschriebenen typischen Verhaltensänderungen nach pilocarpin-induziertem Status epilepticus (Kapitel 4.2.2.2) waren allerdings weniger stark ausgeprägt. So zeigten die mit Levetiracetam behandelten Ratten eine verminderte Aggressivität und Erregbarkeit.

4.5.2 Anfälle während der *Predrug*, *Drug* und *Postdrug* Phase

Die Zahl der Anfälle, die Krampfparameter Schwere und Länge der Anfälle sowie die kumulative Krampfdauer sind als individuelle Mittelwerte und für die gesamte Gruppe in der jeweiligen Phase in Tabelle 13 zusammengefaßt. Eine graphische Darstellung der Mittelwerte dieser vier Meßgrößen für jede einzelne Woche ist den Abbildungen 22 bis 25 zu entnehmen. Die Ergebnisse der *Predrug*, *Drug* und *Postdrug* Phase wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet, die keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Phasen auswies.

Die durchschnittliche Zahl der Anfälle betrug in den beiden Kontrollphasen (*Predrug* und *Postdrug*) 21 bzw. 25 Anfälle / 2 Wochen (Tab. 13). Unter der Behandlung mit Levetiracetam sank der Mittelwert auf 8 Anfälle / 2 Wochen, d.h. die Anfallsfrequenz reduzierte sich um über 60 %. Bei einer Betrachtung der Einzelwerte wird deutlich, daß die Tiere sehr unterschiedlich auf Levetiracetam ansprachen. Zwei Ratten (Gl 44 und 67) waren vollständig anfallsfrei unter der Behandlung. Weitere Tiere zeigten eine Reduktion der Anfallsfrequenz. Bei zwei Ratten (Gl 82 und 83) konnte kein antikonvulsiver Effekt bei vergleichbaren Blutplasmaspiegeln beobachtet werden.

Um festzustellen, ob die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam in der zweiten Behandlungswoche vermindert war und sich eine Toleranz eingestellt hatte, wurde die Zahl der Anfälle für jede Woche berechnet. In der ersten Kontrollphase lag die durchschnittliche Anfallsfrequenz bei 11 bzw. 10 Anfällen pro Woche. Während der ersten Behandlungswoche sank die Zahl der Anfälle auf 3, was eine Reduktion von 70 % bedeutete und statistisch signifikant war (Abbildung 22, Wilcoxon-Test). Die durchschnittliche Zahl der Anfälle in der zweiten Behandlungswoche betrug 5, was im Vergleich zur *Predrug* Phase eine Reduktion von 50 % darstellte, aber nicht mehr signifikant war. Die Anfallsfrequenz stieg in der zweiten Kontrollphase wieder auf 8 bzw. 17 Anfälle pro Woche an und unterschied sich nicht signifikant von der ersten Kontrollperiode. Demzufolge scheint es, daß die antikonvulsive Wirkung von

Tier-Nr.	Anzahl der Anfälle			Krampfschwere (Stadium)			Krampfdauer (sec)			Kumulative Krampfdauer (sec)		
	Predrug /	Drug /	Postdrug	Predrug /	Drug /	Postdrug	Predrug /	Drug /	Postdrug	Predrug /	Drug /	Postdrug
Gl 27	6	1	1	4,9	5,0	5,0	33,2	36,0	27,0	199	36	27
Gl 32	2	3	36	5,0	2,7	4,8	35,5	66,0	33,7	71	198	1213
Gl 44	1	0	16	4,0	0,0	4,7	41,0	0,0	23,7	41	0	380
Gl 67	87	0	81	4,7	0,0	4,8	21,0	0,0	31,7	1824	0	2568
Gl 75	67	53	42	4,7	4,0	4,6	21,3	15,6	22,3	1427	829	938
Gl 82	2	4	3	5,0	5,0	5,0	29,0	35,0	32,3	58	140	97
Gl 83	0	3	3	0,0	5,0	5,0	0,0	30,0	31,3	0	90	94
Gl 91	4	1	16	5,0	5,0	4,7	38,3	n.b.	25,4	153	n.b.	406
Mittelwert	21	8	25	4,8	4,5	4,8	31,3	36,6	28,4	472	166 *	715
St.D.	35	18	27	0,4	1,0	0,2	7,9	18,4	4,4	723	277	860
Median	3	2	16	4,9	5,0	4,8	33,2	35,0	29,2	112	63	393

Tabelle 13:
Wirkung von Levetiracetam auf spontane Anfälle nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus.
Einzel- sowie Mittelwerte von 8 Ratten während der jeweils zweiwöchigen *Predrug*, *Drug* und *Postdrug* Phase sind aufgeführt. Krampfschwere und –dauer sind als Durchschnitt der Schwere und Länge aller beobachteter Anfälle in der entsprechenden Phase angegeben, für die Berechnung der Mittelwerte für die gesamte Gruppe wurden nur Daten von Tieren verwendet, die in der entsprechenden Phase Anfälle zeigten. Die kumulative Krampfdauer ergab sich aus der Summe der Längen der einzelnen Anfälle in dem entsprechenden Beobachtungszeitraum. In die Berechnung der Mittelwerte für die gesamte Gruppe wurden bei der durchschnittlichen Anzahl der Anfälle und der kumulativen Krampfdauer alle Tiere einbezogen. Bei einer Ratte (Gl 91) konnte die Länge des einzigen Anfalls während der *Drug* Phase nicht bestimmt (n.b.) werden. Die kumulative Krampfdauer war unter der Behandlung signifikant niedriger als in der *Postdrug* Phase (* Wilcoxon-Test, einseitig, $p = 0,04$).
(St.D.: Standardabweichung)

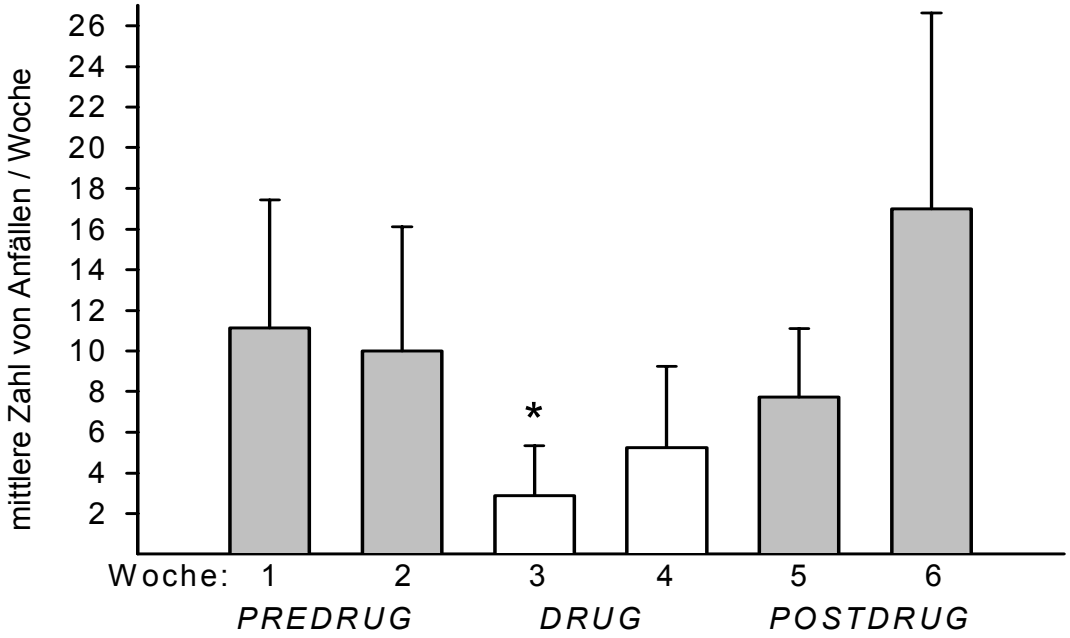


Abbildung 22:
Anzahl der spontanen Anfälle in der jeweiligen Woche während der Kontrollphasen (*Predrug* und *Postdrug*) und der dazwischenliegenden Behandlungsphase mit Levetiracetam (*Drug*). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der gesamten Gruppe (n = 8). Die Zahl der Anfälle war in der dritten Woche signifikant niedriger als in der ersten und der fünften Woche (Wilcoxon-Test, einseitig, $p < 0,05$).

Levetiracetam in der zweiten Woche der Behandlung reduziert war. So waren vier Ratten (Gl 27, 32, 83 und 91) während der ersten Woche der Levetiracetam-Applikation anfallsfrei, zeigten in der zweiten Woche allerdings wieder Anfälle. Andererseits konnte bei einigen Tieren ein „carry-over“ Effekt beobachtet werden, d.h. die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam schien noch bis zu eine Woche nach Abbruch der Behandlung anzuhalten. Besonders ausgeprägt war dies bei einer Ratte (Gl 67), die in der ersten Kontrollphase 44 bzw. 43 Anfälle pro Woche zeigte, in den Wochen 3, 4 und 5 anfallsfrei war und in der letzten Woche wieder 81 spontane Anfälle hatte.

Die während der gesamten Studie registrierten epileptischen Anfälle waren in der Regel durch einen fokalen Beginn der Krampfaktivität charakterisiert, die dann sekundär zu Anfällen des Stadiums 4 oder 5 generalisierte. Bei drei Ratten konnten allerdings auch rein fokale Anfälle beobachtet werden (Stadium 2 und 3 sowie „running and bouncing“). Ein Tier zeigte drei Anfälle des Stadiums 3 bereits in der *Predrug* Phase, die Mehrzahl der fokalen Anfälle wurde jedoch erst in der *Drug* und

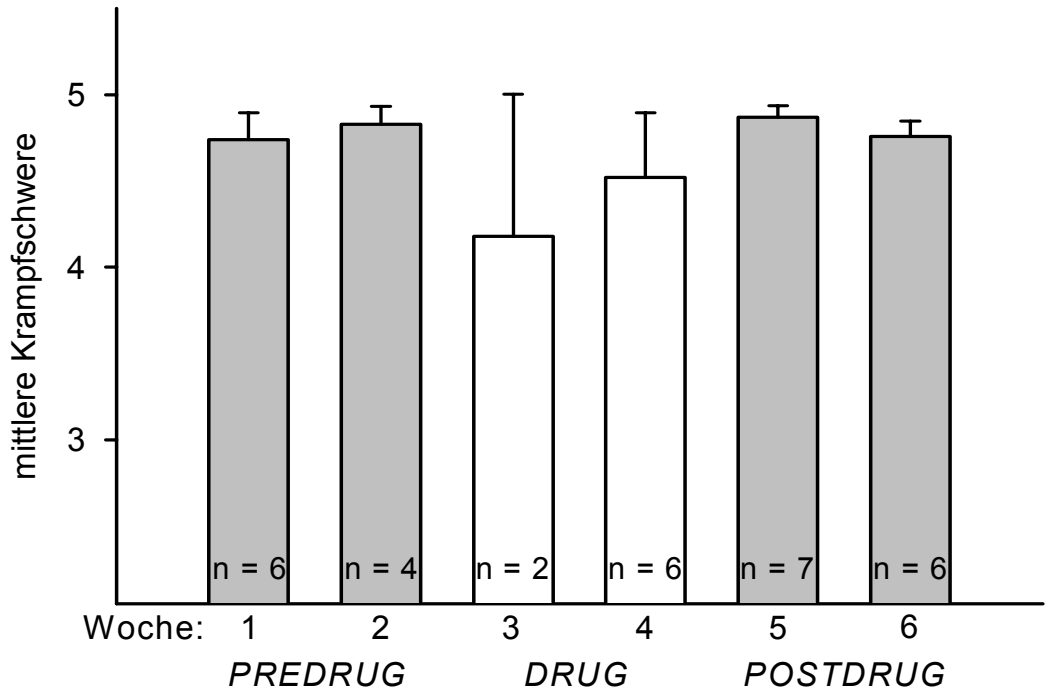


Abbildung 23:
Mittleres Stadium der Anfälle in der jeweiligen Woche während der Kontrollphasen (*Predrug* und *Postdrug*) und der dazwischenliegenden Behandlungsphase mit Levetiracetam (*Drug*). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von den Ratten, die in der entsprechenden Woche epileptische Anfälle zeigten (n = 2 - 7). Die Schwere der Anfälle war unter der Behandlung mit Levetiracetam nicht statistisch signifikant reduziert.

Postdrug Phase (22 bzw. 6 Anfälle) verzeichnet. Die durchschnittliche Krampfschwere war während der Behandlung mit Levetiracetam statistisch nicht signifikant reduziert (Abbildung 23). Nur bei einem Tier (Gl 32, Tabelle 13) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Anfallsschwere während der *Drug* Phase. Diese Ratte hatte in den Kontrollphasen generalisierte Anfälle, unter der Behandlung waren nur noch fokale Anfälle der Stadien 2 und 3 zu beobachten.

Wie die Krampfschwere wurde auch die durchschnittliche Länge der einzelnen Anfälle durch Levetiracetam nicht signifikant beeinflußt (Abbildung 24). Allerdings war die kumulative Krampfdauer, die sich aus der Summe der einzelnen Längen der Anfälle ergab, unter der Behandlung im Durchschnitt statistisch signifikant niedriger als in der anschließenden *Postdrug* Phase (Tabelle 13, Wilcoxon-Test). Bei der Auswertung der kumulativen Krampfdauer für jede Woche zeigte sich die Parallelität zur Zahl der Anfälle. Die kumulative Anfallsdauer in der ersten Behandlungswoche war statistisch signifikant geringer als in der letzten Kontrollwoche (Abbildung 25).

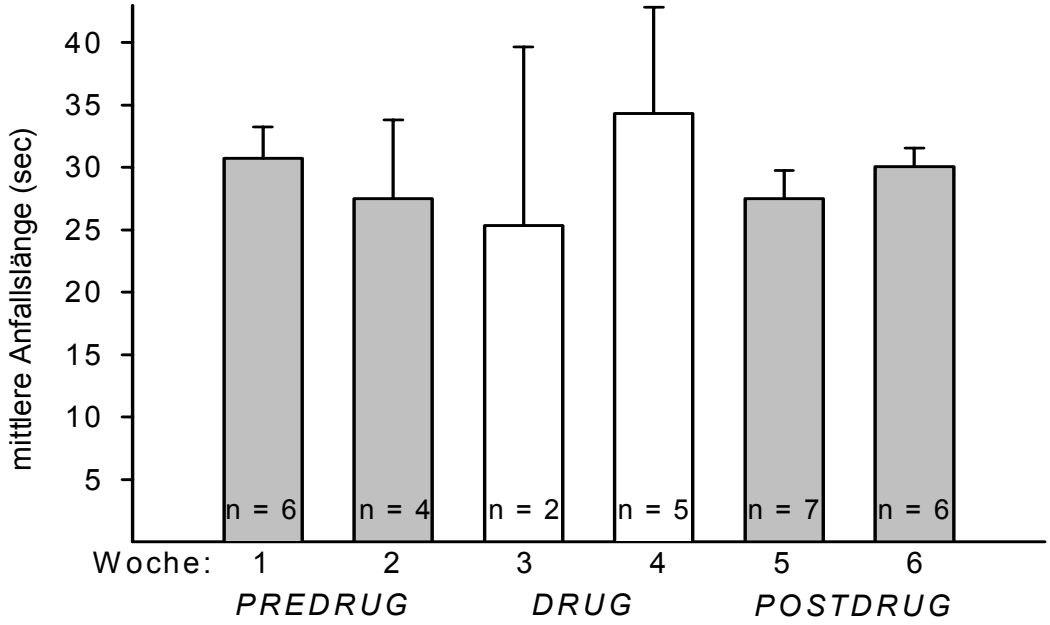


Abbildung 24:
Durchschnittliche Länge der einzelnen Anfälle in der jeweiligen Woche während der Kontrollphasen (*Predrug* und *Postdrug*) und der dazwischenliegenden Behandlungsphase mit Levetiracetam (*Drug*). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von den Ratten, die in der entsprechenden Woche epileptische Anfälle zeigten (n = 2 - 7). Die Länge der Anfälle war unter Behandlung mit Levetiracetam nicht signifikant verändert.

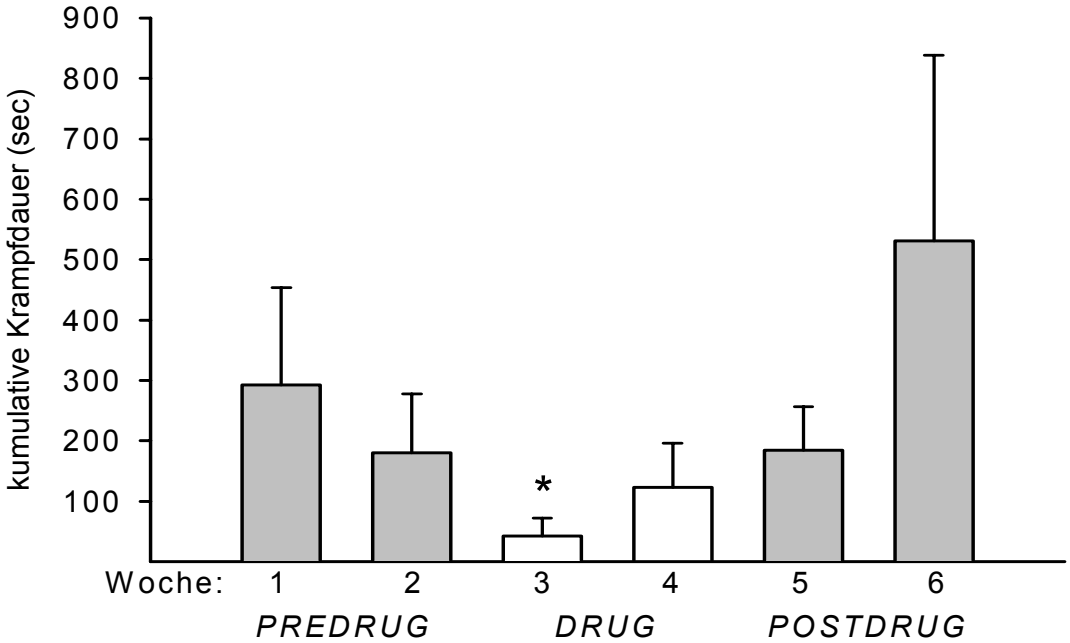


Abbildung 25:
Kumulative Krampfdauer in Sekunden in der jeweiligen Woche während der Kontrollphasen (*Predrug* und *Postdrug*) und der dazwischenliegenden Behandlungsphase mit Levetiracetam (*Drug*). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der gesamten Gruppe (n = 8). Zur Berechnung wurde für die Ratte (Gl 91), deren Anfallslänge in der *Drug* Phase nicht bestimmt wurde, der Mittelwert aus *Pre-* und *Postdrug* Phase (32 sec) verwendet. Die kumulative Krampfdauer war in der dritten Woche statistisch signifikant niedriger als in der sechsten Woche (Wilcoxon-Test, einseitig, $p < 0{,}05$).

4.6 Untersuchung der Wirkung von Levetiracetam im Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala

In dieser Studie sollte die Wirkung einer chronischen Behandlung mit dem neuen Antikonvulsivum Levetiracetam auf die Entwicklung von spontanen Anfällen nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus untersucht werden. Aus einer großen Gruppe von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, die über einen Zeitraum von 25 min in der BLA stimuliert worden waren, wurden 20 Tiere mit einem generalisierten Status epilepticus bzw. fokalen Status epilepticus mit vielen generalisierten Anfällen ausgewählt (siehe Kap. 3.2.3.4). Osmotische Minipumpen wurden 24 h nach Beginn der Stimulation implantiert und enthielten entsprechend der Gruppe entweder Vehikel oder Wirkstoff. Die Behandlung wurde über 8 Wochen fortgeführt, um die Latenzphase von etwa 6 Wochen bis zum Auftreten des ersten spontanen Anfalls (Kap. 4.3.2.2) zu überdauern.

Jedes Tier wurde ab der 5. Woche zwei Wochen unter Behandlung bzw. Vehikel und zwei Wochen in der anschließenden Kontrollphase überwacht. Der Vergleich zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe als auch der Vergleich innerhalb der Behandlungsgruppe unter Substanz und anschließender wirkstofffreier Phase (*Post* Phase) ermöglichte die Untersuchung antikonvulsiver und/oder antiepileptogener Effekte von Levetiracetam in diesem Epilepsiemodell.

4.6.1 Dosierungen und Blutplasmaspiegel von Levetiracetam

Die Dosierungen von Levetiracetam für die einzelnen behandelten Ratten wurden wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben berechnet. Anhand der für jede Minipumpe nach der Entnahme bestimmten Pump-Rate und dem durchschnittlichen Körpergewicht des entsprechenden Tieres in den jeweiligen zwei Wochen, konnte die tägliche Dosierung in mg/kg individuell für jedes Tier ermittelt werden. Mittels HPLC wurden außerdem die Blutplasmaspiegel von Levetiracetam quantitativ bestimmt. Die Plasmakonzentrationen belegten die korrekte Funktion der Minipumpen über den gesamten Behandlungszeitraum. Die individuellen Einzelwerte der behandelten Ratten sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tier-Nr.	Körpergewicht (g) / Dosierung LEV (mg/kg) / Plasmaspiegel LEV (µg/ml) in			
	1. – 2. Woche	3. – 4. Woche	5. – 6. Woche	7. – 8. Woche
	g mg/kg µg/ml	g mg/kg µg/ml	g mg/kg µg/ml	g mg/kg µg/ml
DS 41	197 / 362 / 37,0	210 / 333 / 24,5	231 / 303 / 35,6	262 / 261 / 17,4
DS 45	224 / 293 / 38,8	261 / 279 / 31,7	266 / 257 / 24,0	272 / 236 / 29,9
DS 52	235 / 272 / 34,5	268 / 248 / 26,7	272 / 259 / 28,7	285 / 229 / 21,0
DS 55	217 / 291 / 41,2	270 / 249 / 39,9	285 / 221 / 28,1	294 / 216 / 20,5
DS 58	232 / 284 / 37,3	277 / 269 / 22,8	279 / 262 / 30,3	283 / 237 / 27,4
DS 69	227 / 296 / 34,0	289 / 217 / 19,0	313 / 242 / 19,0	345 / 198 / 21,7
DS 72	242 / 279 / 25,9	278 / 217 / 21,2	279 / 275 / 31,4	281 / 224 / 27,5
DS 77	255 / 240 / 29,2	298 / 231 / 24,0	305 / 248 / 30,2	316 / 203 / 26,3
DS 80	214 / 312 / 56,7	266 / 248 / 25,1	281 / 274 / 27,3	286 / 215 / 24,3
DS 83	229 / 294 / 23,8	280 / 250 / 23,1	302 / 251 / 22,0	322 / 210 / 22,5
Mittelwert	227 / 292 / 35,9	270 / 254 / 25,8	281 / 259 / 27,7	295 / 223 / 23,9
St.D.	16 / 31 / 9,2	24 / 34 / 6,0	23 / 22 / 4,9	25 / 19 / 3,9
Median	228 / 292 / 35,8	274 / 249 / 24,3	280 / 258 / 28,4	286 / 220 / 23,4

Tabelle 14:
Einzel- sowie Mittelwerte des durchschnittlichen Körpergewichts, der täglichen Dosierungen sowie der Blutplasmaspiegel von 10 Ratten, die über acht Wochen mit Levetiracetam (LEV) behandelt wurden. Die durchschnittliche Tagesdosis wurde anhand der Pump-Raten der verwendeten Minipumpen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere in dem entsprechenden Zeitraum berechnet. Die Plasmaspiegel wurden mittels HPLC bestimmt. Im Verlauf der achtwöchigen Behandlung stieg das Körpergewicht signifikant an, parallel sanken die Dosierungen sowie Blutplasmaspiegel von LEV signifikant ab (post hoc Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).
(St.D.: Standardabweichung)

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere stieg während der Behandlungsphase mit Levetiracetam in jeder der zweiwöchigen Phasen im Vergleich zur vorherigen Phase signifikant an (einfaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen, $p < 0,01$). Eine vergleichbare Gewichtszunahme war auch bei den Tieren der Kontrollgruppe zu beobachten ($p < 0,01$). Diese unterschied sich nicht von den Zunahmen bei den behandelten Ratten (zweifaktorielle Varianzanalyse, $p = 0,80$). Da die in die Minipumpen eingebrachten Substanzmengen auf 1000 mg Levetiracetam limitiert waren, sanken entsprechend die täglichen Dosierungen von Levetiracetam über den Behandlungszeitraum signifikant ab (einfaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen, $p < 0,01$). Die Blutplasmaspiegel waren in den ersten

beiden Behandlungswochen signifikant höher ($p < 0,01$) als in den anschließenden 6 Wochen, in denen keine signifikanten Veränderungen mehr festgestellt werden konnten.

Die täglichen Dosierungen von Levetiracetam waren positiv mit den Blutplasmaspiegeln korreliert (Pearson Korrelation, $r = 0,57$, $p < 0,01$). Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere war negativ mit der Dosierung bzw. dem Plasmaspiegel korreliert ($r = - 0,87$, $p < 0,01$ bzw. $r = - 0,62$, $p < 0,01$).

Bei den mit Levetiracetam behandelten Tieren waren keine unerwünschten Substanzwirkungen zu beobachten. Die Ratten waren in ihrem Verhalten nicht von den Tieren der Kontrollgruppe zu unterscheiden.

4.6.2 Anfälle während der Behandlungs- und Kontrollphasen

Die Zahl der Anfälle, die Krampfparameter Schwere und Länge der Anfälle sowie die kumulative Krampfdauer sind als individuelle Mittelwerte und als Durchschnitt innerhalb der Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe in der Substanz-/Vehikelphase und der anschließenden *Post* Phase in Tabelle 15 zusammengefaßt. Eine graphische Darstellung dieser 4 Parameter in beiden Phasen zwischen behandelten Ratten und Kontrolltieren ist den Abbildungen 26 bis 29 zu entnehmen.

Tabelle 15:
a) Entwicklung von spontanen Anfällen nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus. Es sind die Einzel- sowie Mittelwerte von 8 Ratten während der Vehikelphase und der anschließenden Kontrollphase (*Post* Phase) aufgeführt.
b) Wirkung einer chronischen Behandlung mit Levetiracetam auf die Entwicklung von spontanen Anfällen nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus. Es sind die Einzel- sowie die Mittelwerte von 10 Ratten während der Behandlung (Substanzphase) und der anschließenden Kontrollphase (*Post* Phase) aufgeführt.
Die Zahl der Anfälle ergab sich aus der Summe der während der Überwachung (jeweils zwei Wochen) registrierten Anfälle. Krampfschwere und Krampfdauer sind als Durchschnitt der Schwere und Länge aller beobachteter Anfälle in der entsprechenden Phase angegeben, für die Berechnung der Mittelwerte für die gesamte Gruppe wurden nur Daten von Tieren verwendet, die in der entsprechenden Phase Anfälle zeigten. Die kumulative Krampfdauer ergab sich aus der Summe der Längen der einzelnen Anfälle in dem entsprechenden Beobachtungszeitraum. In die Berechnung der Mittelwerte für die gesamte Gruppe wurden bei der durchschnittlichen Anzahl der Anfälle und der kumulativen Krampfdauer alle Tiere einbezogen.
Unterschiede in der Zahl der Anfälle, der Krampfdauer und der kumulativen Krampfdauer wurden zwischen der Substanz- bzw. Vehikelphase und der *Post* Phase mit einem t-Test für gepaarte Daten, die Krampfschwere mittels Wilcoxon-Test ausgewertet. Die entsprechenden p-Werte sind in den Tabellen angegeben. Die in Klammern angegebenen p-Werte berechneten sich nur aus den Daten von Tieren, die in beiden Phasen Anfälle zeigten ($n = 9$).
(St.D.: Standardabweichung)

a) Kontrollgruppe

Tier-Nr.	Anzahl der Anfälle		Krampfschwere (Stadium)		Krampfdauer (sec)		Kumulative Krampfdauer (sec)	
	Phase Vehikel	Phase *Post*	Phase Vehikel	Phase *Post*	Phase Vehikel	Phase *Post*	Phase Vehikel	Phase *Post*
DS 43	2	4	4,0	4,3	34	40	68	160
DS 49	6	6	3,8	4,2	30	38	180	229
DS 54	4	3	4,3	5,0	111	29	443	87
DS 67	4	2	3,5	4,5	28	45	111	89
DS 70	3	2	4,7	4,5	38	55	114	109
DS 76	6	24	4,8	4,4	29	23	172	562
DS 79	1	5	4,0	4,4	15	50	15	252
DS 81	7	6	3,5	4,5	53	52	369	309
Mittelwert	4	7	4,1	4,5	42	42	184	225
St.D.	2	7	0,5	0,2	30	11	148	159
Median	4	5	4,0	4,5	32	43	143	195
p-Wert	0,34		0,05		0,95		0,62	

b) Behandlungsgruppe

Tier-Nr.	Anzahl der Anfälle		Krampfschwere (Stadium)		Krampfdauer (sec)		Kumulative Krampfdauer (sec)	
	Phase Substanz	Phase *Post*	Phase Substanz	Phase *Post*	Phase Substanz	Phase *Post*	Phase Substanz	Phase *Post*
DS 41	2	21	5,0	5,0	52	34	103	713
DS 45	8	5	4,0	4,8	27	46	215	232
DS 52	7	6	4,0	4,6	31	29	219	176
DS 55	3	7	4,0	4,7	32	33	95	228
DS 58	7	3	4,1	5,0	28	36	195	108
DS 69	5	5	3,0	4,8	21	33	106	164
DS 72	0	1	0,0	2,5	0	55	0	55
DS 77	1	7	5,0	5,0	27	41	27	285
DS 80	3	12	4,7	4,8	60	31	180	366
DS 83	6	3	4,4	5,0	47	35	284	104
Mittelwert	4	7	4,2	4,6	36	37	142	243
St.D.	3	6	0,6	0,8	13	8	91	189
Median	4	6	4,1	4,8	31	35	143	202
p-Wert	0,24		**(0,02)**		(0,89)		0,18	

Durch die chronische Behandlung mit Levetiracetam wurde die Latenzphase bis zum Auftreten des ersten spontanen Anfalls nicht beeinflußt. Es entwickelten annähernd alle Tiere in der Substanz- bzw. Vehikelphase spontane Anfälle. Nur ein mit Levetiracetam behandeltes Tier zeigte den ersten Anfall erst in der anschließenden *Post* Phase. In der Behandlungsgruppe betrug die durchschnittliche Latenzphase nach Status epilepticus 39,5 Tage (St.D. 11,5; min. 27, max. 64), in der Kontrollgruppe 38,8 Tage (St.D. 6,9; min. 33, max. 50). Bei vier mit Levetiracetam behandelten Tieren und drei Kontrolltieren war der erste spontane Anfall fokal, durchschnittlich 5 Tage später wurde bei diesen Ratten der erste generalisierte Anfall beobachtet.

Unter der Behandlung mit Levetiracetam zeigten die entsprechenden Tiere durchschnittlich 4 Anfälle / 2 Wochen. Die Häufigkeit der Anfälle war in der Kontrollgruppe identisch. Die maximale Anzahl lag in beiden Gruppen bei 7 Anfällen. In der anschließenden *Post* Phase stieg die Anfallsfrequenz im Durchschnitt in beiden Gruppen deutlich um etwa 60 % an, wobei ungefähr 40 % der Tiere in jeder Gruppe mindestens doppelt so viele Anfälle zeigten. Bei den verbleibenden Ratten war die Zahl der Anfälle mehr oder weniger konstant. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Ratten und Kontrolltieren in der Anfallszahl während der Substanz-/Vehikelphase und der anschließenden *Post* Phase (Abbildung 26, t-Test für unverbundene Stichproben, p = 0,95 bzw. 0,87).

Um festzustellen, ob die im Verlauf der Studie abnehmenden Dosierungen von Levetiracetam einen Einfluß auf die Anfallszahl und -schwere hatten, wurden die Daten aus der ersten Überwachungswoche (5. Behandlungswoche) den Daten aus der zweiten Überwachungswoche (7. Behandlungswoche) gegenübergestellt. Bei den mit Levetiracetam behandelten Tieren stieg die Zahl der Anfälle von 1,8 (St.D. 1,8) auf 2,4 (St.D. 1,4), der Unterschied war statistisch nicht signifikant (gepaarter t-Test, p = 0,26). Das durchschnittliche Stadium der in der ersten Woche beobachteten Anfälle lag bei 3,4 (St.D. 1,2) und stieg in der zweiten Woche nicht signifikant (Wilcoxon-Test, p = 0,06) auf 4,7 (St.D. 0,4) an. In der Kontrollgruppe nahm die mittlere Zahl der Anfälle von der ersten zur zweiten Woche ab. Sie sank von 2,4 Anfällen (St.D. 1,8) auf 1,8 (St.D. 1,3), gleichzeitig stieg die mittlere Krampfschwere der registrierten Anfälle von 3,8 (St.D. 0,9) auf 4,5 (St.D. 0,5) an. Die Veränderungen in der Kontrollgruppe waren ebenfalls statistisch nicht signifikant (p = 0,46 bzw. 0,19). Während der ersten Beobachtungswoche zeigten 3 mit

Levetiracetam behandelte Ratten und 2 Kontrolltiere keine spontanen Anfälle. In der zweiten Überwachungswoche hatten alle bis auf ein Tier der Levetiracetam-Gruppe Anfälle entwickelt. Es gab hinsichtlich der Zahl und der Schwere der Anfälle in der 5. und 7. Woche keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Ratten und Kontrolltieren (t-Test, p = 0,50 bzw. 0,33; Mann-Whitney U-Test, p = 0,84 bzw. 0,40).
Die Schwere der epileptischen Anfälle unterschied sich nicht während der Substanz- bzw. Vehikelphase zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe mit durchschnittlichen Stadien von 4,2 bzw. 4,0 (Abbildung 27, Mann-Whitney U-Test, p = 0,39). Die mit Levetiracetam behandelten Ratten zeigten allerdings in der anschließenden wirkstofffreien *Post* Phase einen statistisch signifikanten Anstieg der Krampfschwere auf einen Mittelwert von 4,6 (Wilcoxon-Test, p = 0,02). Die mittlere Krampfschwere war bei diesen Tieren auch in der *Post* Phase signifikant höher als bei den Kontrolltieren im gleichen Zeitraum (Mann-Whitney U-Test, p = 0,03). Die Anfälle waren in der Regel durch einen fokalen Beginn der motorischen Krampfaktivität charakterisiert, die sich im weiteren Verlauf zu Anfällen des Stadiums 4 bis 6 ausbreitete. Bei einer mit Levetiracetam behandelten Ratte wurde nur ein fokaler Anfall beobachtet, bei 6 weiteren Tieren dieser Gruppe wurden fokale und generalisierte Anfälle beobachtet, bei den verbleibenden 3 Tieren ausschließlich generalisierte Anfälle. In der Kontrollgruppe zeigten 50 % der Tiere neben generalisierter Krampfaktivität auch fokale Anfälle.
Die durchschnittliche Länge eines epileptischen Anfalls war bei den mit Levetiracetam behandelten Tieren unter Substanz als auch in der anschließenden *Post* Phase tendenziell geringer als bei den Kontrolltieren in den entsprechenden Phasen (Abbildung 28). Diese Unterschiede waren statistisch allerdings nicht signifikant (t-Test für unverbundene Stichproben, p = 0,58 bzw. 0,37). Innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppe blieb die Anfallslänge im Durchschnitt in beiden Phasen relativ konstant, obwohl in beiden Gruppen bei einzelnen Ratten starke individuelle Veränderungen auftraten (siehe Tabelle 15).
Die kumulative Krampfdauer war unter der Levetiracetam-Behandlung mit durchschnittlich 142 sec tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe, die im Mittel 184 sec während der Überwachungszeit krampften (Abb. 29, t-Test, p = 0,47). In der anschließenden *Post* Phase stieg die kumulative Krampfdauer in der Behandlungs- und Kontrollgruppe entsprechend der höheren Anzahl von Anfällen an, unterschied sich aber nicht statistisch signifikant zwischen den beiden Gruppen (p = 0,83).

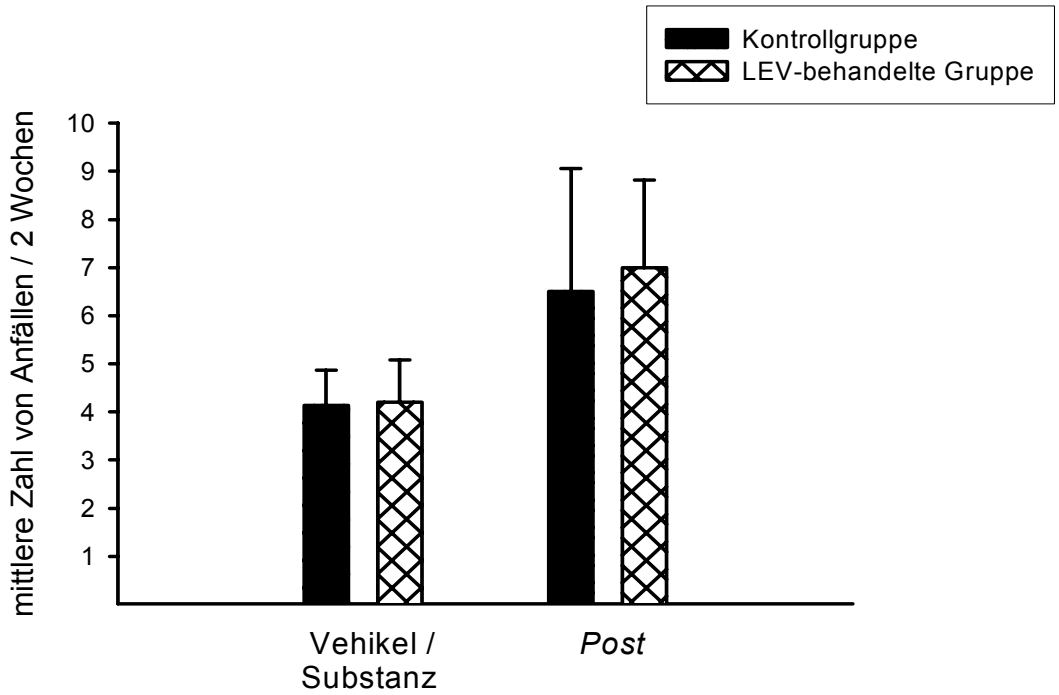


Abbildung 26:
Anzahl der spontanen Anfälle in jeweils 2 Wochen nach einem elektrisch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus in der Behandlungsphase mit Vehikel bzw. Substanz (Levetiracetam, LEV) und der anschließenden behandlungsfreien *Post* Phase. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von 10 mit LEV behandelten Tieren und 8 Kontrolltieren.

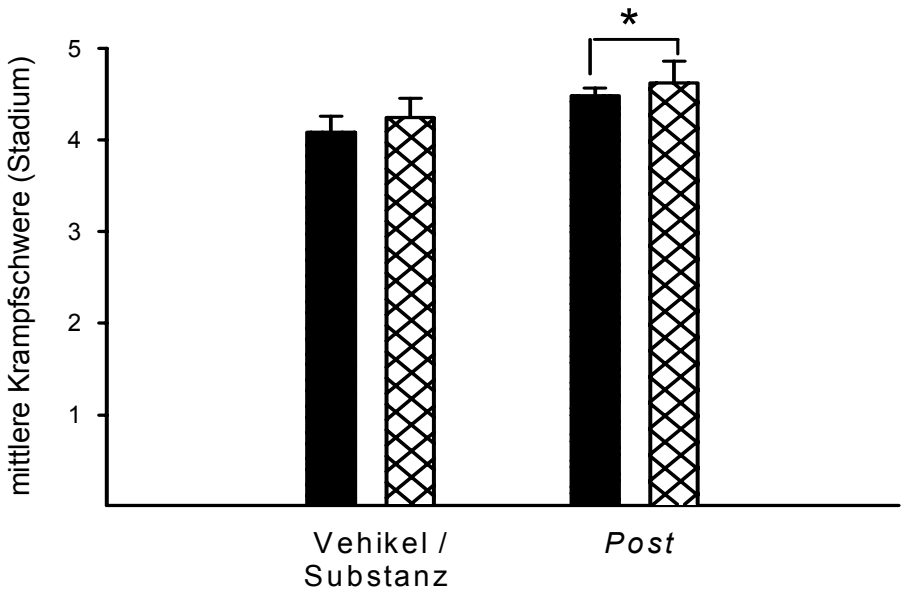


Abbildung 27:
Mittleres Stadium der in jeweils 2 Wochen beobachteten Anfälle nach einem elektrisch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus in der Behandlungsphase mit Vehikel bzw. Substanz (Levetiracetam, LEV) und der anschließenden behandlungsfreien *Post* Phase. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von 9 (Substanz) und 10 (*Post*) mit LEV behandelten Tieren und 8 Kontrolltieren.
Die Schwere der epileptischen Anfälle war in der *Post* Phase bei LEV-behandelten Ratten signifikant höher als bei den Kontrolltieren (* Mann-Whitney U-Test, p = 0,03).

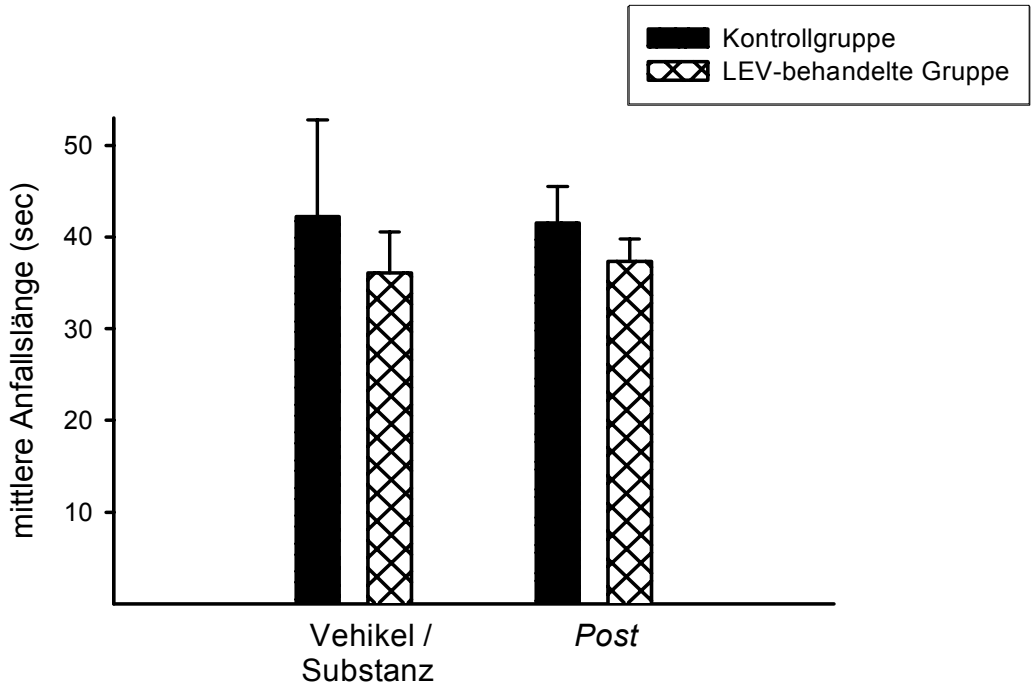


Abbildung 28:
Durchschnittliche Länge der in jeweils 2 Wochen beobachteten Anfälle nach einem elektrisch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus in der Behandlungsphase mit Vehikel bzw. Substanz (Levetiracetam, LEV) und der anschließenden behandlungsfreien *Post* Phase. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von 9 (Substanz) und 10 (*Post*) mit LEV behandelten Tieren und 8 Kontrolltieren.

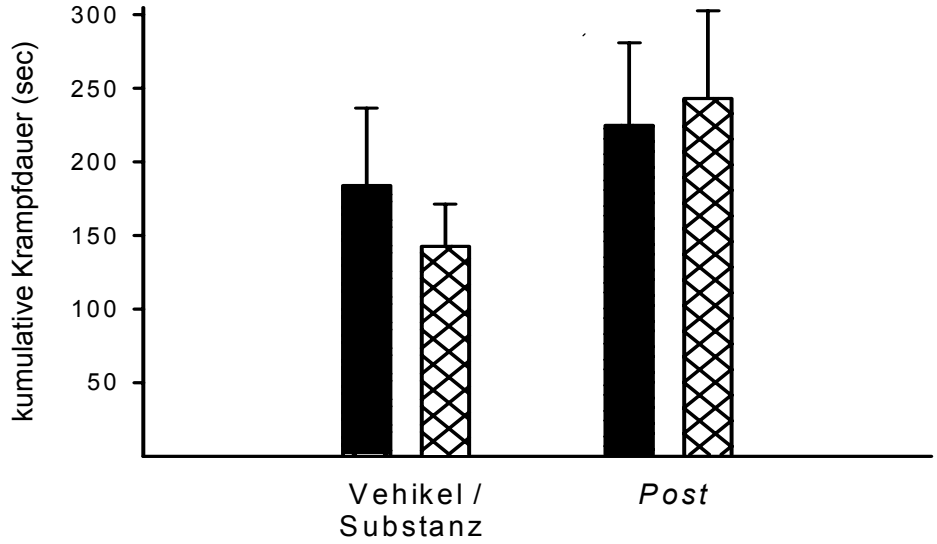


Abbildung 29:
Kumulative Krampfdauer in jeweils 2 Wochen nach einem elektrisch induzierten selbsterhaltenden Status epilepticus in der Behandlungsphase mit Vehikel bzw. Substanz (Levetiracetam, LEV) und der anschließenden behandlungsfreien *Post* Phase. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von 10 mit LEV behandelten Tieren und 8 Kontrolltieren.

5. DISKUSSION

5.1 Detektion spontan auftretender Anfälle

Der Einsatz von Epilepsiemodellen in der Forschung bedingt eine systematische Überwachung der Tiere, da die epileptischen Anfälle spontan auftreten und nicht gezielt durch den Experimentator ausgelöst werden. Als Methoden zur Anfallsdetektion sind bisher die direkte visuelle Überwachung, Video- und/oder EEG-Aufzeichnungen beschrieben.
Im Rahmen meiner Arbeit habe ich eine neue Methode zur Detektion spontan auftretender Anfälle eingesetzt, die auf der Registrierung der motorischen Aktivität eines Tieres beruht. Die Verwendung von sogenannten Beschleunigungssensoren („Bewegungsmeldern“) ist nach meinen Ergebnissen eine Methode, die hinsichtlich der Selektion von epileptischen Ratten in Tiermodellen mit vorwiegend generalisierten Anfällen eine gute Alternative zu EEG-Ableitungen darstellt. Für pharmakologische oder sonstigen Studien, die eine genaue Beobachtung der individuellen Anfallszahl und -schwere erfordern, sind Beschleunigungssensoren wenig geeignet, da mit ihnen fokale Anfälle, die nur mit einer geringen motorischen Aktivität einhergehen, nicht detektiert werden können.

Bewegungen von Tieren können durch Infrarotbewegungsmelder, Lichtschranken oder Beschleunigungssensoren erfaßt werden. Infrarotbewegungsmelder registrieren jede Form der Bewegung, liefern allerdings keine Informationen über die Intensität der motorischen Aktivität. Lichtschranken lösen ein Signal aus, wenn sie durch eine Bewegung unterbrochen werden. Auch diese geben keine Informationen hinsichtlich der Intensität einer Bewegung. Außerdem ist ihre Anwendbarkeit bei Ratten dadurch eingeschränkt, daß sich diese Tiere normalerweise häufig aufrichten, so daß eine selektive Einstellung der Lichtschranken auf epileptische Anfallsaktivität bei der sich die Tiere aufrichten unmöglich ist. Beschleunigungssensoren registrieren nicht nur Bewegungen, sondern lassen auch Aussagen über die Intensität einer Bewegung zu.
Die Verwendung von Beschleunigungssensoren erfordert eine ähnliche technische Ausstattung wie man sie für EEG-Ableitungen benötigt (Digitalwandler, Verstärker, Computer). Ihre Handhabung ist einfach und Reparaturen sind nur in Ausnahmefällen notwendig. Die Überwachung mittels EEG erfordert dagegen einen

vergleichsweise hohen wöchentlichen Reparaturaufwand der Kabel, der von BERTRAM et al. (1997) für eine Überwachungseinheit von 15 Tieren mit 3 – 6 h wöchentlich angegeben wird, was auch mit eigenen Erfahrungen übereinstimmt. Da der Bewegungsmelder unter dem Käfig eines Tieres befestigt wird, entfällt zum einen die Operation zur Implantation von Tiefenelektroden oder Cortexschrauben, die für herkömmliche EEG-Ableitungen notwendig sind. Zum anderen muß die Ratte nicht fixiert werden wie bei der Befestigung von Ableitungskabeln für EEG-Aufzeichnungen üblich, was bei der deutlich gesteigerten Aggressivität einiger Tiere mit spontanen Anfällen die tägliche Überwachung stark vereinfacht. Die Kombination von Telemetrie und EEG eröffnet allerdings neue Möglichkeiten und weist die gleichen Vorteile wie der Einsatz von Beschleunigungssensoren auf. Hierbei werden die Hirnströme über Tiefenelektroden (BRAGIN et al. 1999) oder Oberflächenelektroden (MUMFORD u. WETHERELL 2001) gemessen, wobei letztere Methode eine Operation der Tiere überflüssig macht. Über einen am Tier befestigten Sender werden die Ableitungen an einen mit einem Computer verbundenen Empfänger übertragen. Die Tiere können sich frei bewegen und sind an keine Kabel angeschlossen, wodurch Reparaturen von Ableitungskabeln entfallen. Telemetrische EEG-Aufzeichnungen sind zur Zeit noch mit einem sehr hohen Kostenaufwand verbunden. Außerdem sind die Ausmaße der Sender momentan noch nicht optimal auf die Größe von Ratten angepaßt, so daß das Tragen eines Senders über einen längeren Zeitraum mit einer vergleichsweise hohen Belastung des Tieres einhergeht.

Der Zeitaufwand zur Auswertung der Beschleunigungssensor- oder EEG-Daten ist vergleichbar und beträgt etwa 4 min für 1 h Überwachung. Der Aufwand liegt damit im oberen Bereich der Angabe von BERTRAM et al. (1997), die für die Auswertung einer 24-Stunden-EEG-Aufzeichnung einen Zeitaufwand von 30 – 90 min nennen. Allerdings setzt diese Arbeitsgruppe zwei Techniken zur Reduktion des Aufwands ein. Zum einen wird das EEG gleichzeitig mit dem Kamerabild auf einer Videokassette aufgezeichnet, wodurch die separate Nachkontrolle der entsprechenden Videosequenz bei epileptischer Aktivität im EEG entfällt. Zum anderen setzen sie ein Programm zur Anfallsdetektion im EEG anhand charakteristischer Spike-Muster ein, das automatisch mögliche Anfallsaktivität markiert. Nach ihren Angaben werden durch dieses Programm 95 % aller Anfälle detektiert.

Die Auswertung der Daten der Beschleunigungssensoren war zu Beginn der Etablierungsphase zeitaufwendiger, da mehr Ereignisse auf Video kontrolliert werden mußten, um verschiedene Verhaltensmuster anhand der motorischen Aktivität unterscheiden und individuelle Unterschiede in der Krampfausprägung erkennen zu lernen. Artspezifisches Verhalten der Ratten drückte sich in der Regel durch Signale mit kleinen Spannungsamplituden und vereinzelten Spitzen mit dazwischenliegenden bewegungslosen Pausen aus. Dagegen waren epileptische Anfälle meist durch ein plötzliches, zeitlich begrenztes Auftreten von Signalen mit hoher bis sehr hoher Spannungsamplitude, abhängig von der Schwere des Anfalls, charakterisiert. Vor dem Anfall war meist über einige Minuten keine motorische Aktivität der Tiere zu registrieren, was mit den Untersuchungen von BERTRAM u. CORNETT (1994) und HELLIER u. DUDEK (1999) korreliert, nach denen Anfälle bei Ratten vermehrt in Inaktivitätsphasen zu beobachten sind. Im Programm „Chart4“ ist die Auszählung der Frequenz in kurzen Abschnitten in einer nachträglichen Bearbeitung der Daten durchführbar. Anhand der Bestimmung der Signalfrequenz war allerdings keine Unterscheidung zwischen artspezifischen Verhaltensmustern und epileptischen Anfällen möglich.

Der Einsatz von Beschleunigungssensoren ist mit folgenden Einschränkungen behaftet. Da Ratten als nachtaktive Tiere in der Dunkelphase eine starke Aktivität zeigen, würden die registrierten Signale der Bewegungsmelder zu einer annähernd vollständigen Kontrolle der Videobänder führen. Der zeitliche Gewinn, der sich aus dem Einsatz von Bewegungsmeldern in der Hellphase im Vergleich zu einer reinen Videoüberwachung ergibt, wäre bei ihrer Verwendung in der Dunkelphase somit aufgehoben. Wenn das Ziel der Überwachung allerdings zunächst die Selektion epileptischer Tiere ist, ist aus praktischen Erwägungen ohnehin das Monitoring in der Hellphase vorzuziehen. Für das Pilocarpin-Modell und das Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation ist das vermehrte Auftreten von Anfällen in der Hellphase beschrieben (ARIDA et al. 1999a, NISSINEN et al. 2000).
Bewegungsmelder sollten zur Überwachung nur eingesetzt werden, wenn in dem verwendeten Epilepsiemodell vorwiegend generalisierte Anfälle, also Anfälle, die mit einer starken motorischen Aktivität einhergehen, zu erwarten sind. Das Pilocarpin-Modell erfüllt dieses Kriterium (TURSKI et al. 1989, CAVALHEIRO et al. 1991, MELLO et al. 1993), während im Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation auch

zahlreiche fokale Anfälle beobachtet werden können (NISSINEN et al. 2000). Für solche Epilepsiemodelle ist die Anfallsdetektion mittels EEG vorzuziehen. Neben fokalen Anfällen war auch die Detektion von kurzen generalisierten Anfällen oder Anfällen, bei denen das Tier eine ungünstige Position innerhalb des Käfigs hatte, mittels Beschleunigungssensoren kaum möglich. Auf die Entnahme der Einstreu zur Verbesserung der Signalübertragung wurde aufgrund der Länge der täglichen Aufzeichnungen verzichtet.

Trotz dieser Einschränkungen konnten etwa 80 % aller Anfälle anhand der Daten der Beschleunigungssensoren ermittelt werden, bevor die entsprechenden Videoaufzeichnungen analysiert wurden. Durch ihre einfache Anwendbarkeit sind sie somit zum Screenen von Tieren hinsichtlich des Auftretens von spontanen Anfällen geeignet. Für exakte Untersuchungen des Anfallsverhaltens einzelner Tiere ist einer EEG-Überwachung der Vorzug zu geben. Durch EEG-Ableitungen lassen sich außerdem zusätzliche Informationen gewinnen, wie z.B. elektrographische Veränderungen vor, während und nach einem Anfall sowie zwischen einzelnen Anfällen oder die pharmakologische Beeinflußbarkeit epileptischer Entladungen im Gehirn.

5.2 Induzierte Epilepsiemodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Tiermodelle etabliert und charakterisiert, bei denen die Entwicklung von Epilepsien in naiven Ratten durch einen konvulsiven Status epilepticus ausgelöst wurde. Der Status epilepticus und seine Folgen sind auch in der Humanmedizin von klinischer Relevanz. Nach Studien aus Hessen, Deutschland, und Minnesota, USA, tritt ein Status epilepticus bei Erwachsenen mit einer jährlichen Inzidenz von 17 – 18/100000 auf (HERSDORFFER et al. 1998, KNAKE et al. 2001). Bei etwa der Hälfte aller Patienten mit Status epilepticus ist dieser das **erste** beobachtete Anfallsgeschehen (HAUSER 1990, KNAKE et al. 2001) und stellt einen Risikofaktor bezüglich der Entwicklung einer chronischen Erkrankung dar. In verschiedenen pädiatrischen Untersuchungen wurde festgestellt, daß zwischen 30 und 82 % der Kinder mit einem konvulsiven Status epilepticus später spontane Anfälle entwickelten (AICARDI u. CHEVRIE 1970, MAYTAL et al. 1989, VERITY et al. 1993). HAUSER et al. (1990) bezifferten das Risiko nach einem

konvulsiven Status wiederholt Anfälle zu zeigen mit 37 % im ersten Jahr und 56 % innerhalb von 3 Jahren.
Entsprechend dem klinischen Bild wird der Status epilepticus in konvulsiv und nicht-konvulsiv sowie in primär oder sekundär generalisiert, fokal und komplex-fokal eingeteilt. Die Angaben für den Menschen bezüglich der Häufigkeit des Auftretens eines Status-Typs variieren in der Literatur, wobei zwischen 40 – 70 % aller Status epilepticus als konvulsiv generalisiert eingestuft werden (TOWNE et al. 1994, KNAKE et al. 2001).
Für die Prognose hinsichtlich der Mortalität und neurologischer Ausfallerscheinungen ist neben der Länge auch die Ätiologie des Status epilepticus ein wichtiges Kriterium. Status-Längen unter 2,5 h sind in der Regel mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden (LOWENSTEIN u. ALLDREDGE 1993, TOWNE et al. 1994). Symptomatische Status epilepticus gehen mit einer höheren Mortalität einher als idiopathische oder kryptogene Status epilepticus (CHEVRIE u. AICARDI 1978, CALLENBACH et al. 2001).

Einige dieser Aspekte können in den Epilepsiemodellen reproduziert werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurden. In gesunden Tieren wird ein symptomatischer konvulsiver Status epilepticus als erstes Anfallsgeschehen hervorgerufen. Der dabei induzierte Status ist im Lithium-Pilocarpin-Modell generalisiert, im Modell der elektrischen BLA-Stimulation fokal oder generalisiert. Die Induktion ist trotz gleicher Behandlung nicht bei allen Tieren möglich. Die Status-Länge hat im Lithium-Pilocarpin-Modell einen Einfluß auf die Mortalität. Ein Großteil der Tiere entwickelt nach einem Status epilepticus nach Verstreichen einer Latenzphase spontane Anfälle. Eine solche Latenzphase wird auch häufig in der Humanmedizin bei Patienten mit symptomatischer Temporallappenepilepsie beobachtet, wobei die Länge dieser Phase abhängig ist von der Art des initialen Insults und dem Alter des Patienten zu diesem Zeitpunkt. Im Gegensatz zu Epilepsiemodellen wird die Latenzphase beim Menschen meist mit einigen Jahren angegeben (FRENCH et al. 1993, MATHERN et al. 1995a/b). Diese Latenzphase zwischen auslösendem Insult und dem Auftreten des ersten spontanen Anfalls wird im englischen Sprachgebrauch auch häufig als 'silent period' bezeichnet. Sie ist aber keineswegs 'still' im Sinne von unverändert. In der Latenzphase treten neuronale Schäden (MAGLOCZKY und FREUND 1995) sowie axonale und dendritische

Veränderungen auf (MELLO et al. 1993, SPIGELMAN et al. 1998). Innerhalb weniger Stunden nach einem induzierten Anfallsgeschehen werden zahlreiche Gene aktiviert, die ihrerseits über verschiedene Mechanismen zu langfristigen plastischen Veränderungen im Gehirn führen. Die Anzahl von Genen, die möglicherweise eine Bedeutung für die neuronale Plastizität haben, wird auf 500 - 1000 geschätzt (NEDIVI et al. 1993).

5.2.1 Lithium-Pilocarpin-Modell

Im Rahmen meiner Arbeit war die Etablierung eines neuen chemischen Epilepsiemodells möglich, das sich durch eine geringe Mortalität und eine hohe Ausbeute an Ratten mit spontanen Anfällen auszeichnet. Die Mortalitätsrate konnte statistisch signifikant durch die fraktionierte Applikation von Pilocarpin bei mit Lithium vorbehandelten Ratten und eine Reduktion der Status epilepticus-Länge auf 90 min gesenkt werden verglichen mit der bisher gebräuchlichen Vorgehensweise einer einmaligen Applikation von Pilocarpin. Die Gruppen nach einmaliger (30 mg/kg) und nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation (max. 4x 10 mg/kg) zeigten dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Tiere, die einen Status epilepticus entwickelten. Auch der Verlauf der chronisch epileptischen Phase war zwischen den Gruppen ähnlich.

Die Verhaltensbeobachtungen während der Status-Induktion waren in beiden Gruppen ähnlich. Wenige Minuten nach der einmaligen oder ersten Pilocarpin-Applikation konnte fokale Krampfaktivität beobachtet werden und der erste generalisierte Anfall trat nach 31 bzw. 63 min auf. Der Status epilepticus setzte in beiden Versuchsgruppen etwa 10 min später ein, wobei 76 % der Tiere nach einmaliger und 62 % der Tiere nach fraktionierter Pilocarpin-Applikation einen Status entwickelten. Für das herkömmliche Lithium-Pilocarpin-Modell wird in der Literatur beschrieben, daß annähernd 100 % der Tiere einen Status epilepticus entwickeln. (JOPE et al. 1986, MORRISETT et al. 1987, WALTON u. TREIMAN 1988). Diese Arbeitsgruppen haben allerdings mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten gearbeitet, während in der vorliegenden Arbeit weibliche Wistar-Ratten eingesetzt wurden. Im Pilocarpin-Modell hat sich gezeigt, daß Sprague-Dawley-Ratten empfindlicher auf die konvulsiven Effekte des Pilocarpins reagieren als Wistar-Ratten und daher eine

geringere Pilocarpin-Dosis zur Status-Induktion benötigen (MELLO et al. 1993). Bei Sprague-Dawley-Ratten treten im Status epilepticus eher Rennanfälle mit tonisch-klonischen Krämpfen auf, die zum Atemstillstand führen (MELLO et al. 1993). Vermutlich sind genetische Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen die Ursache der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Pilocarpin. Die Frage, inwieweit das Geschlecht der Tiere die Induktion eines Status epilepticus beeinflußt, kann nicht hinreichend beantwortet werden. MELLO u. COVOLAN (1996) haben in einer Studie bei männlichen und weiblichen Wistar-Ratten einen Status epilepticus mit Pilocarpin induziert und in der chronisch epileptischen Phase die Neurodegeneration untersucht. Sie erwähnen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Auch bei der Applikation des Chemokonvulsivums Picrotoxin konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten in verschiedenen Zyklusphasen hinsichtlich der akuten Anfallsinduktion beobachtet werden (TAN u. TAN 2001).

Die durchschnittliche Pilocarpin-Dosis zur Induktion eines Status epilepticus betrug bei der fraktionierten Verabreichung 26 mg/kg, wobei die Hälfte der Tiere bereits nach 20 mg/kg einen Status entwickelte, und lag somit unter der Dosis, die bei der einmaligen Applikation von Pilocarpin allgemein verwendet wird. Es war nicht möglich bei Ratten, die nach der 4. Injektion keinen Status epilepticus zeigten, durch weitere Injektionen anhaltende Krampfaktivität zu induzieren. Einige Tiere scheinen somit resistent gegen die konvulsive Wirkung des Pilocarpins zu sein, was sich durch die genetische Varianz innerhalb eines Auszuchtstamms, wie es Wistar-Ratten sind, erklären ließe. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit der Tiere wird auch für Wurfgeschwister im Kainsäure-Modell beschrieben (SPERK et al. 1985). Dagegen konnten HELLIER et al. (1998) durch die fraktionierte Applikation von Kainsäure bei annähernd allen Tieren motorische Krampfaktivität auslösen. Insgesamt setzten sie dabei Dosierungen ein, die zwei- bis fünfmal höher waren als die übliche Dosierung bei einmaliger Kainsäure-Applikation. Und obwohl der dadurch induzierte Status epilepticus nicht abgebrochen wurde, betrug die Mortalität nur 15 %. Diese Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen, die nach fraktionierter Applikation von Pilocarpin gewonnen werden konnten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Pharmakokinetik von Kainsäure sein. Kainsäure, die agonistisch an bestimmten Glutamat-Rezeptor-Subtypen wirkt, passiert nur zu einem sehr geringen Prozentsatz nach systemischer Applikation die Blut-Hirn-Schranke

(BERGER et al. 1986). Ein Großteil der Ratten mit fokaler Krampfaktivität entwickelt einen Status epilepticus. Dies ist möglicherweise auf eine anfallsinduzierte Öffnung der Blut-Hirn-Schranke während der fokalen Anfälle zurückzuführen, so daß höhere Kainsäure-Konzentrationen das Gehirn erreichen und schließlich zu einem Status epilepticus führen (RUTH 1981). Die allmähliche Öffnung der Blut-Hirn-Schranke würde auch den vergleichsweise langen Zeitraum zwischen Kainsäure-Applikation und Status-Induktion von 60 bis 120 min erklären, der im Lithium-Pilocarpin-Modell nur etwa 40 min beträgt. Für die wiederholte Verabreichung geringer Kainsäure-Dosen könnte dies bedeuten, daß bei zunehmender Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und gleichzeitig kontinuierlicher Erhöhung der Plasmaspiegel schließlich alle Tiere eine individuelle Kainsäure-Konzentration im Gehirn zur Status-Induktion erreichen. Dagegen könnte die konvulsive Wirkung des Pilocarpins auf zwei Schritten beruhen. Die frühen Stadien, die innerhalb weniger Minuten nach der Pilocarpin-Applikation bei **allen** Tieren beobachtet werden, wären durch die direkte starke cholinerge Stimulation der entsprechenden Areale im limbischen System zu erklären. Zur Induktion eines Status epilepticus wären allerdings in einem zweiten Schritt andere Mechanismen erforderlich, die aufgrund genetischer Unterschiede nicht bei allen Tieren einsetzen. Die Entkopplung des Status epilepticus von cholinergen Mechanismen wird durch die Tatsache unterstützt, daß cholinerge Antagonisten keine antikonvulsive Wirkung mehr bei Tieren zeigen, die bereits einen Status epilepticus entwickelt haben (TURSKI et al. 1983, CLIFFORD et al. 1987).

Hinsichtlich des Verlaufs der Körpertemperatur im Status epilepticus ist anzumerken, daß erst nach einer Status-Länge von 90 min ein signifikanter Anstieg der Körpertemperatur festzustellen war, während nach 60 min Status epilepticus die Körpertemperatur konstant blieb. Somit war die Hyperthermie nicht Auslöser des Status epilepticus, wie sie es z.B. beim Fieberkrampf des Kindes ist (Übersicht von SMITH 1994), sondern eine Konsequenz der anhaltenden motorischen Krampfaktivität. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Prof. Löscher zeigten im Kainsäure-Modell ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Körpertemperatur nach einer Länge des Status epilepticus von 90 min. Dabei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede des Temperaturverlaufs zwischen dem Kainsäure-Modell und dem Lithium-Pilocarpin-Modell, unabhängig davon, ob Pilocarpin einmalig oder

fraktioniert verabreicht wurde, bei einer Status-Länge von 90 min festgestellt (einfaktorielle Varianzanalyse).

Betrachtet man die Mortalität nach einmaliger Pilocarpin-Applikation bei mit Lithium vorbehandelten Ratten und einer Länge des Status epilepticus von 90 min, so entspricht sie mit 42 % der Mortalitätsrate nach alleiniger Verabreichung einer hohen Pilocarpin-Dosis bei gleicher Dauer des Status epilepticus (LONGO u. MELLO 1999). Letztere setzten ein Thiobarbiturat zum Abbruch des Status epilepticus ein, während in der vorliegenden Arbeit Diazepam verwendet wurde. Die Wirkung von Diazepam zum Abbruch des Status epilepticus im Lithium-Pilocarpin-Modell wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben. CLIFFORD et al. (1987) und JOPE et al. (1986) beobachten bei einer Diazepam-Dosis von 5 – 10 mg/kg i.v. bzw. 10 mg/kg i.p. ein Erlöschen der motorischen Krampfaktivität sowie der epileptischen Entladungen im EEG. Sie benennen allerdings nicht den Zeitpunkt der Applikation im Status epilepticus. OLNEY et al. (1983) brechen den Status epilepticus mit 20 mg/kg Diazepam etwa 60 min nach der Pilocarpin-Applikation ab, was einer Status-Länge von etwa 30 min entspricht, und beobachten ebenfalls ein Erlöschen der motorischen Krampfaktivität. Sie kontrollieren allerdings nicht die Veränderungen im EEG. Eine identische Vorgehensweise wird von MORRISETT et al. (1987) beschrieben, die jedoch keine antikonvulsiven Effekte von Diazepam, weder im Verhalten noch im EEG, auf den Status epilepticus feststellen. Im Gegensatz zu JOPE et al. (1986) versterben alle Tiere bei MORRISETT et al. (1987). Eine Untersuchung der Wirkung von Diazepam nach verschiedenen Status-Längen im Lithium-Pilocarpin-Modell ist von WALTON u TREIMAN (1988) veröffentlicht worden. Anhand typischer EEG-Veränderungen, die sich während der Induktion eines Status epilepticus ergeben, wurden die Zeitpunkte der Diazepam-Applikation (20 mg/kg i.p.) bestimmt, und die Effekte auf Verhalten und EEG beobachtet. Nach einer durchschnittlichen Länge des Status epilepticus von 7 min stoppte Diazepam jegliche Anfallsaktivität. Nach 16 min Status epilepticus war dies nur noch bei 50 % der Tiere der Fall, nach 37 min und 127 min Status epilepticus bei 15 %. Die Verhaltensbeobachtung der Ratten korrelierte dabei nicht mit den EEG-Ableitungen, d.h. trotz des Erlöschens der motorischen Krampfaktivität bei einer wechselnden Anzahl von Tieren stieg mit zunehmender Status-Länge der Anteil der Tiere, bei denen ein elektrographischer Status epilepticus erhalten blieb. Auch Beobachtungen bei Patienten mit Status

epilepticus lassen vermuten, daß mit zunehmender Länge des Status epilepticus die Unterbrechung der anhaltenden Krampfaktivität schwieriger wird (YAFFE u. LOWENSTEIN 1993).

In der Untersuchung von WALTON u. TREIMAN (1988) wurden alle Ratten zusätzlich mit Phenytoin zu einem späteren Zeitpunkt behandelt, daher kann keine vergleichende Aussage über die Mortalität gemacht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine EEG-Ableitungen im Lithium-Pilocarpin-Modell angefertigt, so daß nur das Verhalten der Tiere nach Abbruch des Status epilepticus beurteilt werden konnte. Es konnte nicht festgestellt werden, daß ein längerer Status epilepticus mit einer schlechteren antikonvulsiven Wirkung von Diazepam auf die sichtbare motorische Krampfaktivität einherging. In der Regel war eine Verminderung oder ein Erlöschen der Anfallsaktivität zu beobachten, allerdings kann nicht beurteilt werden, inwieweit die sedativen Effekte des Diazepams die motorische Ausprägung eines anhaltenden elektrographischen Status epilepticus verhinderten. Bei einigen Tieren wurde nur ein sehr schwacher Effekt nach der Diazepam-Applikation beobachtet, wobei allerdings Fehlinjektionen in den Darm nicht auszuschließen sind, die zu einem reduzierten und verzögerten Wirkungseintritt führen.

Als ein Ergebnis dieser Arbeit kann festgehalten werden, daß die Länge des Status epilepticus nach Lithium- und fraktionierter Pilocarpin-Applikation, d.h. der wiederholten Gabe kleiner Dosen, einen signifikanten Einfluß auf die Mortalität hatte. Die Mortalitätsrate betrug nach einer Länge des Status epilepticus von 120 min 40 % und konnte durch eine Verkürzung des Status epilepticus auf 90 bzw. 60 min statistisch signifikant auf 7 % reduziert werden. Das zweite Ergebnis bezüglich der Mortalität war, daß nicht nur die Länge des Status epilepticus, sondern auch die Vorgehensweise bei der Pilocarpin-Applikation einen entscheidenden Einfluß hatte. Nach einmaliger Pilocarpin-Applikation verstarben mit über 40 % der Ratten statistisch signifikant mehr Tiere als nach fraktionierter Verabreichung bei gleicher Länge des Status epilepticus von 90 min.

Als Todesursachen der Ratten sind Atmungsstillstand und plötzliches Herzversagen zu nennen. Die zunehmende Arrhythmie des Herzens wird vermutlich durch eine Hyperkaliämie ausgelöst. Im Lithium-Pilocarpin-Modell konnte durch die einmalige systemische Verabreichung des Neuroleptikums Acepromazin (25 mg/kg) die Fehlfunktion des Herzens und die daraus resultierende Mortalität verhindert werden (HARRIGAN et al. 1994).

Das Allgemeinbefinden aller Tiere im Lithium-Pilocarpin-Modell, unabhängig von der Länge des Status epilepticus und der Art der Pilocarpin-Applikation, war in den auf den Status epilepticus folgenden Tagen hochgradig gestört. Dies wird auch von TURSKI et al. (1989) für das Pilocarpin-Modell beschrieben. Sie beobachteten eine Abnahme des Körpergewichts von 10 bis 20 %, wobei das ursprüngliche Gewicht nach durchschnittlich einer Woche wieder erreicht wurde. In der vorliegenden Arbeit betrug dieser Zeitraum durchschnittlich zwei Wochen. Dieser Unterschied beruht vermutlich eher auf der Verwendung von männlichen Ratten bei TURSKI et al. (1989), die allgemein größere Gewichtszunahmen als weibliche Ratten zeigen, und weniger auf Unterschieden zwischen den Versuchsprotokollen.
Die zunehmende Aggressivität der Tiere im Verlauf der Wochen nach Status epilepticus werden von BUREAU u. PERSINGER (1993) als Folge der Läsionen spezieller Strukturen im Gehirn erklärt (Substantia nigra pars reticulata, Amygdala und zahlreiche thalamische Kerne). Diese Läsionen würden zu einer Enthemmung bestimmter dopaminerger Bahnen führen, die orofasziale Mechanismen kontrollieren, und so einen erhöhten Beißtrieb bei den Tieren auslösen.
Für das Kainsäure-Modell wird in der Literatur auch ein schlechtes Allgemeinbefinden der Tiere nach dem Status epilepticus und eine gesteigerte Aggressivität beschrieben (CAVALHEIRO et al. 1982, BARAN et al. 1988, GOODMAN 1998). Allerdings war nach eigenen Erfahrungen das Ausmaß der körperlichen Beeinträchtigung nach einem durch die systemische Applikation von Kainsäure induzierten Status epilepticus deutlich geringer als nach einem durch Lithium und Pilocarpin hervorgerufenen Status epilepticus gleicher Länge (Beobachtungen von C. Brandt und M. Glien). Im Kainsäure-Modell war außerdem eine Gruppenhaltung der Tiere möglich, ohne daß eine gesteigerte Aggressivität zwischen den Tieren oder gegenüber den Experimentatoren beobachtet wurde.

Annähernd alle Ratten entwickelten nach einer durchschnittlichen Latenzphase von gut 5 Wochen spontane Anfälle, unabhängig von der Vorgehensweise bei der Pilocarpin-Applikation (einmalig versus fraktioniert) und der Status-Länge (90 versus 60 min). Während die Länge der Latenzphase zwischen den Gruppen ähnlich war, zeigten sich innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen starke individuelle Unterschiede zwischen den Tieren. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Angaben für andere chemische Epilepsiemodelle. Im Pilocarpin-Modell vergehen

durchschnittlich gut 2 Wochen zwischen Status epilepticus und erstem spontanen Anfall, wobei die Einzelwerte zwischen 4 und 50 Tagen liegen (CAVALHEIRO et al. 1991, MELLO u. COVOLAN 1996, ARIDA et al. 1999a). Für das Kainsäure-Modell wird nach fokaler Applikation ein Zeitraum zwischen 6 und 22 Tagen (CAVALHEIRO et al. 1982) genannt und nach einmaliger systemischer Applikation von durchschnittlich 2 – 3 Wochen bzw. 5 Wochen (CRONIN u. DUDEK 1988, STAFSTROM et al. 1992). Nach fraktionierter systemischer Kainsäure-Applikation beträgt die durchschnittliche Latenzphase etwa 11 Wochen (HELLIER et al. 1998). Die Bestimmung der Dauer der Latenzphase ist allerdings stark abhängig von der Intensität, mit der die Ratten täglich oder wöchentlich überwacht werden. Durch ein intensives Monitoring werden spontane Anfälle mit großer Wahrscheinlichkeit schneller detektiert als durch einen geringen Überwachungsaufwand.

LEMOS u. CAVALHEIRO (1995) beschreiben für das Pilocarpin-Modell eine Länge des Status epilepticus von 30 min als nicht ausreichend, um später bei den Ratten spontane Anfälle beobachten zu können. Nach ihren Untersuchungen entwickelten nach einer Status-Länge von 60 min 25 %, nach 120 min Status epilepticus 91 % und nach 6 h Status epilepticus 100 % der Tiere spontane Anfälle. Parallel reduzierte sich die Länge der Latenzphase von 52 Tagen über 38 auf 17 Tage. Diesen Zusammenhang zwischen Status-Länge und Entwicklung spontaner Anfälle konnte ich im Rahmen meiner Arbeit mit dem Lithium-Pilocarpin-Modell nicht feststellen. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Ausbeute epileptischer Ratten nach einer Länge des Status epilepticus von 90 min im Vergleich zu 60 min, wobei 80 % der Tiere bereits nach einem Status epilepticus von 60 min später spontane Anfälle zeigten. Gleiches galt für die Dauer der Latenzphase, die sogar bei den Tieren mit 60 min Status epilepticus zu einem geringeren Wert tendierte, obwohl alle Tiere nach dem gleichen Protokoll überwacht wurden. Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten möglicherweise genetische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Wistar-Ratten sein. Erstere wurden von LEMOS u. CAVALHEIRO verwendet (1995). Außerdem setzten sie zum Abbruch des Status epilepticus zwei Substanzen ein, Diazepam (10 mg/kg i.p.) plus Pentobarbital (30 mg/kg i.p.). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Diazepam verwendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Applikation von Pentobarbital zu einem bestimmten Zeitpunkt im Status epilepticus die Entwicklung spontaner Anfälle beeinflußt. Letztendlich wären auch generelle Unterschiede zwischen dem

Pilocarpin- und dem Lithium-Pilocarpin-Modell denkbar. Dagegen sprechen allerdings die Beobachtungen von VANNESTE-GOEMAERE et al. (1999) und KLITGAARD et al. (2001), die im Pilocarpin-Modell bereits nach einer Status–Länge von 30 min später spontane Anfälle bei den Tieren beobachten. Dagegen nennen LEMOS u. CAVALHEIRO (1995) eine Länge des Status epilepticus von unter 60 min als nicht ausreichend, um später spontane Anfälle bei den Tieren zu registrieren. In den Untersuchungen von VANNESTE-GOEMAERE et al. (1999) und KLITGAARD et al. (2001) wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt, deren Status epilepticus mit einer einmaligen Applikation von Diazepam (10 mg/kg i.v.) abgebrochen wurde. Nach einer weiteren Verkürzung der Status-Länge auf etwa 8 min konnten keine spontanen Anfälle mehr bei den Tieren detektiert werden (VANNESTE-GOEMAERE et al. 1999). Daraus kann gefolgert werden, daß es vermutlich eine kritische Länge des Status epilepticus in Epilepsiemodellen gibt, deren Überschreitung notwendig ist, um epileptogene Prozesse im Tier zu induzieren.

LEMOS und CAVALHEIRO (1995) beschreiben außerdem im Pilocarpin-Modell einen Zusammenhang zwischen der Länge des Status epilepticus und der Frequenz der später auftretenden spontanen Anfälle. Nach einer Status-Länge von 6 bzw. 2 h zeigten die Ratten durchschnittlich 2,3 bzw. 1,0 spontane Anfälle pro Woche, während nach 60 min Status epilepticus nur 0,1 Anfall pro Woche beobachtet wurde. Ein solcher Zusammenhang konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen im Lithium-Pilocarpin-Modell nicht festgestellt werden. Die Bestimmung der Anfallszahl erfolgte an vier aufeinanderfolgenden Tagen in der Hellphase und führte zu Durchschnittswerten zwischen 2,4 und 5,7 Anfällen, ohne daß statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden.

Die im Lithium-Pilocarpin-Modell registrierten spontanen Anfälle waren generell durch einen fokalen Beginn der Anfallsaktivität mit sekundärer Generalisation gekennzeichnet. Die von CAVALHEIRO et al. (1991) für das Pilocarpin-Modell beschriebene anfängliche Zunahme der Krampfschwere, von zunächst fokalen Anfallsstadien zu später generalisierten Anfallsstadien, wurde nicht beobachtet. Fokale Anfälle werden zwar leichter bei einer Videoüberwachung übersehen, doch auch während des direkten Umgangs mit den Ratten konnten rein fokale Anfälle sehr selten festgestellt werden. Die durchschnittliche Länge aller auf Video

aufgezeichneten spontanen Anfälle betrug 43 sec und ist somit vergleichbar mit der durchschnittlichen Anfallsdauer von 40 sec im Pilocarpin-Modell (ARIDA et al. 1999a). Diese Anfallslängen entsprechen der klinischen Situation beim Menschen. In einer Studie wurde die Anfallslänge sekundär generalisierter tonisch-klonischer Anfälle bei Epileptikern bestimmt (THEODORE et al. 1994). Demnach hatte die konvulsive Phase der Anfälle eine durchschnittliche Länge von etwa 1 min.
Eine Zunahme in der Zahl der Anfälle in den ersten Wochen nach Status epilepticus bis zum Erreichen einer relativ konstanten Anfallsfrequenz, wie es von ARIDA et al. (1999a) für das Pilocarpin-Modell beschrieben wird, konnte für das Lithium-Pilocarpin-Modell nicht festgestellt werden, da die technischen Möglichkeiten keine kontinuierliche Überwachung aller Tiere über mehrere Wochen gestatteten. Es entstand allerdings der Eindruck, daß die individuell unterschiedliche Anfallsfrequenz der Tiere von Beginn an relativ konstant ausgeprägt war.

Zusammengefaßt läßt sich abschließend sagen, daß durch die wiederholte Applikation von Pilocarpin in geringeren Dosierungen bei lithium-vorbehandelten Ratten zuverlässig ein Status epilepticus und die Entwicklung spontaner Anfälle induziert werden kann, verbunden mit einer deutlich geringeren Mortalität im Vergleich zu einer einmaligen Pilocarpin-Applikation. Als großer Nachteil dieses Modells ist das schlechte Allgemeinbefinden nach dem Status epilepticus und die gesteigerte Aggressivität der Ratten zu nennen.

5.2.2 Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neues elektrisches Epilepsiemodell etabliert und charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten dabei statistisch signifikante Unterschiede in der elektrischen Induktion eines selbsterhaltenden Status epilepticus zwischen weiblichen Wistar-Ratten sowie männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten. Es konnten drei verschiedene Arten eines induzierten Status epilepticus anhand der Krampfschwere unterschieden werden: fokaler Status epilepticus, fokaler Status epilepticus mit generalisierten Anfällen und generalisierter Status epilepticus. Je länger die generalisierte Krampfaktivität während des Status epilepticus ausgeprägt war, desto höher war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten

spontaner Anfälle. Obwohl der Status epilepticus nicht abgebrochen wurde, war die Mortalität gering.

Die elektrische Induktion eines selbsterhaltenden Status epilepticus erfolgte im basolateralen Nukleus der Amygdala, einer Region des limbischen Systems. Von der Amygdala ist bekannt, daß sie eine geringe Schwelle hinsichtlich der Auslösung von Anfällen aufweist (GODDARD et al. 1969). Außerdem handelt es sich bei der Amygdala um eine Struktur, in der bei etwa 10 % der Patienten mit Temporallappenepilepsie der epileptische Fokus lokalisiert ist oder die bei anderen Patienten mit dieser Form der Epilepsie häufig im Verlauf der Ausbreitung der epileptischen Aktivität in das Anfallsgeschehen einbezogen wird (QUESNEY 1986, SO et al. 1989). Die Stimulation erfolgte im basolateralen Nukleus der Amygdala, dem gleichen Kerngebiet, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Löscher auch im Kindling-Modell stimuliert wird (z.B. LÖSCHER et al. 1998a). Der Begriff 'selbsterhaltender Status epilepticus' wird in der Literatur häufig im Zusammenhang mit elektrischen Status epilepticus- bzw. Epilepsiemodellen verwendet. Er soll ausdrücken, das der Status epilepticus unabhängig von dem auslösenden Stimulus, sprich nach Beendigung der elektrischen Reizung einer Gehirnregion, weiterbesteht.

Insgesamt konnte durch das in dieser Arbeit verwendete Stimulationsprotokoll bei über 90 % aller Ratten ein Status epilepticus induziert werden. Bei der Auswertung des Stimulationserfolgs nach Geschlecht und Stamm ergab sich, daß statistisch signifikante Unterschiede zwischen weiblichen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten bestanden. Bei weiblichen Wistar-Ratten konnte häufiger kein Status epilepticus induziert werden und der Anteil von Tieren, die einen generalisierten Status epilepticus entwickelten, war geringer verglichen mit Sprague-Dawley-Ratten des gleichen Geschlechts. Da bereits für das Pilocarpin- und Kainsäure-Modell Stammesunterschiede hinsichtlich der Krampfempfindlichkeit beschrieben wurden, kann vermutet werden, daß sich auch diese Ergebnisse auf genetische Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen zurückführen lassen. Möglicherweise ist die Krampfschwelle bei Wistar-Ratten höher, so daß durch eine längere Stimulationsdauer (> 30 min) und/oder eine Erhöhung der Stromstärke (> 700 µA) eine verbesserte Status-Induktion bei diesen Tieren erreicht werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auch Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten in der akuten Phase der Induktion eines Status epilepticus, diese hatten allerdings keine Auswirkungen auf die chronisch epileptische Phase.

Bei dem Vergleich mit den Ergebnissen, die andere Arbeitsgruppen in elektrischen Status epilepticus- und Epilepsiemodellen gewonnen haben, ist generell zu beachten, daß andere Stimulationsprotokolle und in der Regel männliche Tiere verwendet wurden.
McINTYRE et al. (1982) verwendeten zur elektrischen Induktion eines Status epilepticus vollgekindelte, d.h. Tiere, die bereits eine erhöhte Empfindlichkeit hinsichtlich der elektrischen Auslösung von Anfällen aufweisen, männliche Wistar-Ratten, die sie über 60 min mit 50 µA in der Amygdala stimulierten. Bei 63 % der Tiere entwickelte sich ein Status epilepticus, wobei die anhaltende Krampfaktivität rein fokal ausgeprägt war. Durch eine 90-minütige Stimulation im Hippocampus mit 400 µA konnte bei 70 - 94 % der männlichen Sprague-Dawley-Ratten ein Status epilepticus induziert werden (LOTHMAN et al. 1989, BERTRAM u. CORNETT 1993, GORTER et al. 2001). Der Status epilepticus wird dabei als vorwiegend fokal beschrieben, unterbrochen von einzelnen oder anhaltend auftretenden generalisierten Anfällen. Verhaltensbeobachtungen der Tiere standen allerdings bei diesen Arbeiten nicht im Vordergrund, sondern die Beurteilung des Status epilepticus anhand des EEG. Eine Stimulationsdauer von 30 min war im Modell der Hippocampus-Stimulation nicht ausreichend, um einen Status epilepticus zu induzieren (LOTHMAN et al. 1989). NISSINEN et al. (2000) stimulierten bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten den lateralen Nukleus der Amygdala mit 400 µA für 20 bis 30 min. Einen Status epilepticus entwickelten 87 % der Tiere, wobei die Beurteilung ausschließlich anhand des EEG erfolgte. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsprotokoll konnte in Abhängigkeit von Geschlecht und Stamm bei 78 % (weiblich Wistar), 96 % (weiblich Sprague-Dawley) oder 100 % (männlich Sprague-Dawley) der Tiere ein Status epilepticus induziert werden. Dieses Protokoll ist demnach vergleichsweise gut geeignet, um bei einem Großteil der Tiere einen Status epilepticus zu induzieren, wobei die Verwendung von Sprague-Dawley-Ratten zu besseren Ergebnissen führt. Außerdem konnte aufgrund des Verhaltens der Tiere während des Status epilepticus eine Unterscheidung in drei Status-Arten

vorgenommen werden, d.h. drei Formen des Status epilepticus, die sich in der Schwere der anhaltenden Krampfaktivität unterscheiden und auch beim Menschen bekannt sind, können innerhalb eines Modells studiert werden.

Eine interessante Frage ist, ob bereits während der elektrischen Stimulation zu erkennen ist, welche Tiere einen Status epilepticus nach Abbruch der Stimulation entwickeln werden. McINTYRE et al. (1982) stellten dazu fest, daß Tiere, die einen Status epilepticus entwickelten, deutlich mehr Anfälle der Stadien 3 – 5 während der Stimulation gezeigt hatten (durchschnittlich 10 Anfälle versus 5 Anfälle). Wurden allerdings nur die Anfälle des Stadiums 5 ausgewertet, so konnten keine Unterschiede mehr zwischen Tieren mit und ohne Status epilepticus beobachtet werden, da alle Tiere etwa 5 Anfälle dieses Stadiums zeigten. Trotz der längeren Stimulationsdauer im Modell der Hippocampus-Stimulation wird eine ähnliche Anzahl von Anfällen des Stadiums 3 – 5 bei Tieren genannt, die einen Status epilepticus entwickelten, und einer deutlich geringeren Anzahl bei Tieren gegenübergestellt, die nach Abbruch der Stimulation keine anhaltende Krampfaktivität zeigen (8 Anfälle versus 1 Anfall). Außerdem waren deutliche iktale EEG-Veränderungen während der Stimulation bei Tieren zu beobachten, bei denen ein Status induziert werden konnte (LOTHMAN et al. 1989). Im gleichen Tiermodell haben GORTER et al. (2001) ausschließlich die Anfälle des Stadiums 4 und 5 während der Stimulation ausgewertet. Ratten mit anschließendem Status epilepticus zeigten demzufolge durchschnittlich 8 generalisierte Anfälle, während bei Tieren ohne Entwicklung eines Status epilepticus durchschnittlich nur 4 generalisierte Anfälle auftraten. Diese Angaben der Anzahl generalisierter Anfälle während der Stimulation liegen in einem ähnlichen Bereich wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Allerdings war hier die Anzahl generalisierter Anfälle nur bei Tieren, die einen generalisierten Status epilepticus entwickelten, mit durchschnittlich 6 Anfällen statistisch signifikant höher als bei den anderen Status-Typen. Tiere, die keinen oder einen vorwiegend fokalen Status epilepticus zeigten, unterschieden sich mit durchschnittlich 3 bis 4 Anfällen nicht voneinander. Gleiches gilt für die kumulative generalisierte Krampfdauer während der Stimulation. Diese betrug bei Tieren mit generalisiertem Status epilepticus im Durchschnitt etwa 9 min, während sie bei Tieren, die keinen oder einen vorwiegend fokalen Status epilepticus entwickelten, zwischen 2 und 4 min lag. Im Modell der elektrischen BLA-Stimulation ist damit während der Stimulation

aufgrund von Verhaltensbeobachtungen eine Aussage darüber, ob und welche Art des Status epilepticus die Ratten entwickeln werden, nur hinsichtlich der Induktion eines generalisierten Status epilepticus möglich. Beachtenswert ist allerdings, daß die Anzahl von Anfällen bestimmter Stadien zwischen den unterschiedlichen elektrischen Status epilepticus- bzw. Epilepsiemodellen vergleichsweise ähnlich ist. Da die Stimulationsprotokolle entweder die Reizung mit einer kleineren Stromstärke (50 bzw. 400 µA) über einen längeren Zeitraum (60 bzw. 90 min) oder mit einer größeren Stromstärke (700 µA) über einen kürzeren Zeitraum (25 min) vorsehen, kann vermutet werden, daß zur Auslösung generalisierter Anfallsaktivität während der Stimulation das Produkt aus Stromstärke und Dauer des Stimulus entscheidend ist.

Die Länge des Status epilepticus wurde in der vorliegenden Arbeit in der Regel anhand der sichtbaren motorischen Krampfaktivität bestimmt. Die Bestimmung war aufgrund der Versuchsbedingungen nicht bei allen Tieren möglich. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse von Tieren besprochen, von denen die Status-Länge ermittelt wurde. Ein generalisierter Status epilepticus ging nach einiger Zeit in einen fokalen Status epilepticus über. Diese Verminderung der Anfallsschwere wird auch für das Modell der Hippocampus-Stimulation beschrieben, wo fokale Krampfaktivität über das Erlöschen von generalisierter Anfallsaktivität hinaus erhalten bleibt (LOTHMAN et al. 1989). Die Gesamtlänge eines generalisierten Status epilepticus betrug durchschnittlich 7,7 h. Ein fokaler Status epilepticus mit generalisierten Anfällen hielt im Durchschnitt 6,5 h an. Dagegen war die Dauer eines rein fokalen Status epilepticus mit einer durchschnittlichen Länge von 3,5 h deutlich kürzer. Diese Ergebnisse liegen in einem ähnlichen Bereich wie er für andere elektrische Status epilepticus- bzw. Epilepsiemodelle angegeben wird. So werden Zeiträume von mindestens 6 h für sichtbare motorische Krampfaktivität genannt (McINTYRE et al. 1982) bzw. 6 - 21 h für epileptische Aktivität im EEG (LOTHMAN et al. 1989, NISSINEN et al. 2000).
Während das Stimulationsprotokoll nur einen geringen Einfluß auf die Länge des Status epilepticus hat, scheint es aber Auswirkungen auf die akute Mortalität zu haben. Allerdings sind auch hier wieder genetische Einflüsse durch Geschlecht und Stamm der verwendeten Ratten zu beachten. Nach einer 60-minütigen Stimulation der Amygdala bei vollgekindelten Ratten verstarben 14 % der Tiere (McINTYRE et

al. 1982), im Modell der 'Perforant Path'-Stimulation betrug die Mortalität 27 % (SHIRASAKA u. WASTERLAIN 1994) und für das Modell der Amygdala-Stimulation von NISSINEN et al. (2000) wird eine Mortalität von 20 % angegeben. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Stimulationsprotokoll ging mit einer deutlich geringeren Mortalität einher. Von allen Tieren, die einen Status epilepticus entwickelten, verstarben weniger als 3 %, wobei es sich bei den verstorbenen Tieren um weibliche Wistar-Ratten mit einem generalisierten Status epilepticus handelte. Die Stimulation von Sprague-Dawley-Ratten führte zu keinem Todesfall.

Im Gegensatz zum Lithium-Pilocarpin-Modell, wo das Allgemeinbefinden der Tiere nach einem Status epilepticus hochgradig gestört war, zeigten die Ratten nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus nur eine geringe Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Es wurde auch keine Verhaltensänderung der Tiere wie im Lithium-Pilocarpin-Modell beobachtet. Die Ratten reagierten nur empfindlicher auf taktile Reize, was auch für das Modell der elektrischen Hippocampus-Stimulation beschrieben ist (GORTER et al. 2001).

Die Latenzphase zwischen Status epilepticus und erstem spontanen Anfall schien um so kürzer zu sein, je schwerer die generalisierte Krampfaktivität während des Status ausgeprägt war, wobei allerdings auch starke Unterschiede innerhalb der Gruppen zu beobachten waren. Nach einem generalisierten Status epilepticus vergingen durchschnittlich 6 Wochen, nach einem fokalen Status epilepticus mit generalisierten Anfällen 6,5 Wochen und nach einem fokalen Status epilepticus 10 Wochen bis zum ersten Anfall. Dabei entwickelten annähernd alle Tiere, die während des induzierten Status epilepticus generalisierte Krampfaktivität zeigten, spontane Anfälle. Dies war bei einer statistisch signifikant geringeren Zahl von Tieren mit rein fokalem Status epilepticus der Fall. Interessant ist hierbei, daß sich Ratten mit und ohne spätere spontane Anfälle nach einem fokalen Status epilepticus während der Stimulation sowie in der Länge des induzierten Status nicht unterschieden. Die Entwicklung spontaner Anfälle ist demzufolge vermutlich nicht nur von der Intensität generalisierter Krampfaktivität während des Status epilepticus abhängig, sondern auch von einer individuellen Empfindlichkeit. Diese ließe sich wieder durch genetische Unterschiede innerhalb der Auszuchtstämme Sprague-Dawley und Wistar erklären. Beachtenswert ist außerdem, daß sich trotz der

unterschiedlichen Schwere des Status epilepticus, die späteren spontanen Anfälle in ihrem klinischen Erscheinungsbild nicht mehr zwischen den Tieren unterschieden.
Dieses Ergebnis eröffnet vielseitige Einsatzmöglichkeiten für dieses Epilepsiemodell. Zum einen können für pharmakologische Studien von vornherein Tiere selektiert werden, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit spontane Anfälle entwickeln werden (siehe Kap. 5.3.2). Zum anderen ist es möglich, die Auswirkungen verschiedener Formen eines Status epilepticus im Tiermodell zu untersuchen und dabei Erkenntnisse bezüglich der Situation beim Menschen zu gewinnen.
Im Modell der elektrischen Stimulation des lateralen Nukleus der Amygdala entwickeln 88 % der Ratten nach durchschnittlich 5 Wochen spontane Anfälle, wobei die individuelle Latenzphase zwischen 1 und 12 Wochen variiert (NISSINEN et al. 2000). Etwa ein Drittel der Tiere zeigen dabei frequent Anfälle und zwei Drittel selten, ohne daß eine Änderung der individuellen Anfallszahl und durchschnittlichen Anfallslänge (49 sec) in den Monaten nach Status epilepticus beobachtet wird. Allerdings wird für dieses Modell eine Verschiebung der Anfallsschwere beschrieben. Während in den ersten 10 Wochen 80 % aller Anfälle sekundär generalisiert sind, sind anschließend 80 % aller Anfälle fokal.
Im Modell der Hippocampus-Stimulation entwickeln nach 1 - 8 Wochen 50 bis 91 % der Tiere spontane Anfälle (LOTHMAN et al. 1990, BERTRAM u. CORNETT 1993). LOTHMAN et al. (1990) beobachten dabei überwiegend fokale Anfälle, während GORTER et al. (2001) ähnlich wie NISSINEN et al. (2000) eine Verschiebung der Anfallsschwere nach etwa 8 Wochen von zunächst sekundär generalisierten Anfällen zu fokalen Anfällen beschreiben. Die durchschnittliche Anfallslänge bleibt mit etwa 60 sec dabei konstant. BERTRAM u. CORNETT (1994) machen eine gegensätzliche Beobachtung und sehen eine Progression in der Anfallsschwere in den ersten 4 Monaten nach Status epilepticus. Parallel können sie eine Erhöhung der durchschnittlichen Anfallslänge von etwa 60 sec auf über 100 sec beobachten. Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Anfallsschwere, stellen sowohl GORTER et al. (2001) als auch BERTRAM u. CORNETT (1994) eine Zunahme in der Anfallszahl bei einem Großteil der Tiere fest und folgern daraus, daß die Epileptogenese im Modell der Hippocampus-Stimulation einen deutlich progressiven Verlauf aufweist. Allerdings werden wieder starke individuelle Unterschiede zwischen den Tieren beobachtet. So zeigt ein Teil der Tiere einige wenige Anfälle im Monat, während andere Tiere mehrere Anfälle täglich entwickeln.

Zu der Entwicklung der spontanen Anfälle hinsichtlich der Anzahl, Schwere und Länge kann zu dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Modell der elektrischen Stimulation der BLA keine Aussage gemacht werden, da keine kontinuierliche Überwachung der Tiere in den Monaten nach Status epilepticus erfolgte. Es soll allerdings ein allgemeiner Eindruck geschildert werden. In den ersten Wochen nach Status epilepticus konnten isolierte fokale Anfälle beobachtet werden, deren Anteil im weiteren Verlauf allerdings zugunsten von sekundär generalisierten Anfällen abnahm. Die Krampfdauer schien konstant und betrug durchschnittlich 36 sec. Die Tiere zeigten eine individuell unterschiedliche Anfallsfrequenz von wenigen Anfällen im Monat bis zu einigen Anfällen täglich. Es entstand nicht der Eindruck, daß die Anfallszahl tendenziell zunahm, sondern eher, daß die Zahl der Anfälle bei einigen Tieren tendenziell abnahm. Zur näheren Charakterisierung des Verlaufs der chronisch epileptischen Phase in diesem Modell müssen sich weitere Untersuchungen anschließen.

5.2.3 Vergleich beider Epilepsiemodelle

Abschließend sollen noch einmal die generellen Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit etablierten Epilepsiemodellen zusammengefaßt werden.

Sowohl das (chemische) Lithium-Pilocarpin-Modell als auch das (elektrische) Modell der BLA-Stimulation führen nach der akuten Induktion eines Status epilepticus zu chronischen Veränderungen, die sich nach Verstreichen einer Latenzphase in spontanen Anfällen manifestieren. Unabhängig von der Vorgehensweise zur Status-Induktion wird zunächst in beiden Modellen fokale Krampfaktivität nach Versuchsbeginn beobachtet, die sich schließlich zu einem ersten generalisierten Anfall ausweitet. Die Latenz bis zu diesem ersten generalisierten Anfall ist deutlich unterschiedlich zwischen den Modellen. Während im Lithium-Pilocarpin-Modell 30 bzw. 60 min nach der einmaligen bzw. fraktionierten Pilocarpin-Applikation bis zum Auftreten des ersten generalisierten Anfalls vergehen, sind generalisierte Anfälle im Modell der elektrischen BLA-Stimulation schon innerhalb von 4 min zu beobachten. Dies beruht auf der unterschiedlichen Verabreichung des Stimulus. Pilocarpin wird systemisch verabreicht und muß zunächst die Blut-Hirn-Schranke passieren, um die entsprechenden Strukturen im Gehirn zu erreichen. Der elektrische Reiz wird dagegen lokal in der Zielregion verabreicht und führt bei der

hohen Krampfempfindlichkeit der BLA schneller zur Ausbildung epileptischer Aktivität.

Der induzierte Status epilepticus ist im chemischen Modell bei allen Tieren generalisiert, während im elektrischen Modell drei verschiedene Arten eines Status epilepticus festgestellt werden können. Ein elektrisch induzierter generalisierter Status epilepticus ist dabei allerdings anhand der Verhaltensbeobachtung nicht von einem durch Lithium und Pilocarpin ausgelösten Status zu unterscheiden. Ebenso ist bezüglich der klinischen Ausprägung des Status keine Unterscheidung mehr zwischen weiblichen und männlichen Ratten sowie zwischen den verschiedenen Stämmen möglich. Im Modell der elektrischen BLA-Stimulation können jedoch auch Status epilepticus beobachtet werden, deren anhaltende Krampfaktivität weniger schwer ausgebildet ist. Die konvulsive Wirkung des Pilocarpins zeigt sich demnach in einer „alles-oder-nichts"-Antwort, während die elektrische Reizung der BLA zu einem heterogenen Erscheinungsbild führt, in dem verschiedene Abstufungen der Anfallsschwere im Status epilepticus auftreten. In letzterem Modell sind vermutlich individuelle Unterschiede in der Krampfempfindlichkeit die Ursache hierfür, wobei möglicherweise durch eine längere Stimulationsdauer und/oder eine Erhöhung des Reizstroms eine größere Vereinheitlichung des Bildes erreicht werden könnte. Allerdings werden auch beim Menschen unterschiedliche Formen des Status epilepticus unterschieden, so daß die Heterogenität innerhalb des Modells der elektrischen BLA-Stimulation eine größere Annäherung an die Situation in der Humanmedizin darstellt. Ein weiterer Vorteil des elektrischen Epilepsiemodells ist, daß bereits kurz nach Abbruch der elektrischen Stimulation anhand des induzierten Status-Typs mit großer Wahrscheinlichkeit die Tiere bestimmt werden können, die spontane Anfälle entwickeln werden.

Beachtenswert ist, daß sich trotz der Unterschiedlichkeit des auslösenden Insults die später auftretenden spontanen Anfälle klinisch nicht voneinander unterscheiden. Diese Beobachtung könnte auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen ist es möglich, daß verschiedene initiale Insulte zu gleichen pathologischen Veränderungen im Gehirn führen. Zum anderen könnten unterschiedliche Insulte eine unterschiedliche Pathogenese hervorrufen, die jedoch in letzter Konsequenz, unabhängig von der Art des auslösenden Insults, zur Manifestation spontaner Anfälle mit derselben klinischen Ausprägung führen.

Neuropathologischen Untersuchungen wurden in beiden Tiermodellen von BRANDT (2002) durchgeführt. Nach ihren Ergebnissen weist die Neurodegeneration in beiden Modellen Ähnlichkeiten auf, so z.B. bezüglich des Hippocampus . Allerdings sind die Läsionen nach lithium-pilocarpin-induziertem Status epilepticus deutlich größer und umfassen auch einige Strukturen, die im Modell der elektrischen BLA-Stimulation nicht betroffen sind (z.B. Substantia nigra pars reticulata). McINTYRE et al. (1982) beschreiben die Neurodegeneration bei vollgekindelten Ratten, die über 60 min in der Amygdala elektrisch stimuliert wurden. Demnach zeigten Tiere, bei denen der induzierte Status epilepticus nicht abgebrochen wurde, massive Läsionen im piriformen Cortex, der Amygdala, einigen thalamischen Kerngebieten und dem Hippocampus. Vergleichbare Läsionen wurden auch bei 50 % der Tiere festgestellt, bei denen der induzierte Status epilepticus bereits nach 4 h abgebrochen wurde. Von CLIFFORD et al. (1987) wurden die neuropathologischen Auswirkungen eines pilocarpin-induzierten und lithium-pilocarpin-induzierten Status epilepticus untersucht. Die Läsionen waren im Pilocarpin- und Lithium-Pilocarpin-Modell identisch und umfaßten neben den zuvor von McINTYRE et al. (1982) genannten Strukturen zusätzlich Teile des Neocortex, der Substantia nigra sowie weitere thalamische Kerne.
Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß verschiedene initiale Insulte trotz unterschiedlicher Pathologie ähnliche epileptische Netzwerke hervorrufen, die schließlich zum Auftreten spontaner Anfälle führen. Vermutlich existieren entscheidende Zielregionen, in denen morphologisch ähnliche Schädigungen (z.B. Hippocampus) die Ursache für die Entwicklung einer Epilepsie sind.

Die Effekte einer systemischen Pilocarpin-Applikation sind weitaus gravierender als die Effekte einer lokalen elektrischen Reizung der BLA. Zum einen ist dies an der weitaus höheren Mortalität im Lithium-Pilocarpin-Modell zu erkennen, die einen Abbruch des Status epilepticus zur Senkung der Mortalitätsrate erfordert. Allerdings wird die Wirksamkeit von Antikonvulsiva ab einer bestimmten Länge des Status epilepticus kontrovers in der Literatur diskutiert (CLIFFORD et al. 1987, MORRISETT et al. 1987, WALTON u. TREIMAN 1988). Dies impliziert jedoch gleichzeitig, daß solche Modelle durchaus geeignet sind, um die Wirksamkeit neuer antikonvulsiver Substanzgruppen auf die Unterbrechung eines Status epilepticus zu untersuchen. Zum anderen sind die schwerwiegenderen Wirkungen des Pilocarpins an der

hochgradigen Störung des Allgemeinbefindens der Tiere über mehrere Tage nach dem Status epilepticus und den auftretenden Verhaltensänderungen bei den Tieren zu erkennen. Im Modell der elektrischen BLA-Stimulation ist die Mortalität sehr gering, das Allgemeinbefinden nach einem Status nur geringgradig gestört und es wird keine zunehmende Aggressivität der Tiere festgestellt, ohne daß der Status epilepticus auf eine bestimmte Länge limitiert wird. Diese Befunde könnten dadurch erklärt werden, daß die Ratten mit einem lithium-pilocarpin-induzierten Status epilepticus schwerere Hirnschäden aufweisen als Ratten mit einem elektrisch induzierten Status epilepticus. Besonders Läsionen in Gehirnregionen des limbischen Systems, die zum Teil wesentlich an der Modulation des Verhaltens beteiligt sind, könnten für die Aggressivität der Ratten im Lithium-Pilocarpin-Modell verantwortlich gemacht werden.
Interessanterweise ist eine Länge des Status epilepticus von 90 min im Modell der elektrischen BLA-Stimulation nicht ausreichend, um später spontane Anfälle bei den entsprechenden Tieren beobachten zu können (BRANDT 2002). Im Lithium-Pilocarpin-Modell genügte dagegen eine Status-Länge von 60 min, um die Entwicklung einer Epilepsie zu induzieren. Die eine Epilepsie auslösenden pathophysiologischen Mechanismen scheinen somit in einem pilocarpin-induzierten Status epilepticus komprimierter in kürzerer Zeit abzulaufen.

Bezüglich des Arbeitsaufwands zur Erstellung der beiden Modelle ist folgendes anzumerken. Das chemische Modell ist zunächst mit einem geringeren Aufwand zur Induktion eines Status epilepticus verbunden, das elektrische Modell setzt hierzu die stereotaktische Implantation einer Tiefenelektrode voraus. Allerdings erhöht sich der Aufwand im chemischen Modell durch die intensive Betreuung der Tiere nach dem Status epilepticus, die aufgrund des schlechten Allgemeinbefindens erforderlich ist.
Einschränkend muß abschließend erwähnt werden, daß die Gehirnveränderungen nach einem durch Pilcocarpin induzierten Status epilepticus vermutlich zum Teil auf neurotoxischen Wirkungen des Pilocarpins beruhen. Allerdings können diese Effekte generell nicht von anfallsinduzierten Veränderungen unterschieden werden.

5.3 Pharmakologische Untersuchungen in Epilepsiemodellen

Das antikonvulsive Potential einer neu entwickelten Substanz wird häufig in Anfallsmodellen getestet, d.h. in gesunden Tiere, bei denen durch einen akuten Stimulus ein epileptischer Anfall ausgelöst wird, ohne daß die Tiere chronisch an Epilepsie erkranken. Zeigt eine Substanz in diesen Modellen eine gute antikonvulsive Wirkung, ergibt sich jedoch häufig in der Klinik das Problem, daß ein Teil der Patienten mit spontanen epileptischen Anfällen nicht auf das Medikament anspricht („Therapieresistenz"). Möglicherweise könnten durch den Einsatz von Epilepsiemodellen, d.h. chronisch kranken Tieren mit spontanen Anfällen, bereits in der präklinischen Phase der Entwicklung Ergebnisse hinsichtlich des antikonvulsiven Potentials einer Substanz gewonnen werden, die eher der Situation beim Patienten entsprechen. In chronischen Studien können zusätzlich Effekte einer Langzeittherapie mit einer Substanz untersucht werden. Mögliche Effekte sind dabei eine Wirkungsverstärkung, die Entwicklung einer Toleranz, entweder gegen die antikonvulsive Wirkung selbst oder die unerwünschten Nebenwirkungen, oder das Auftreten von Entzugserscheinungen bei Absetzen des Wirkstoffs (LÖSCHER u. SCHMIDT 1988).

Pharmakologische Studien in Epilepsiemodellen können generell in zwei Vorgehensweisen unterteilt werden.
Bei der ersten Vorgehensweise werden Substanzen in der chronisch epileptischen Phase der Tiere auf ihre antikonvulsive Wirkung getestet. Die Wirkung von Phenobarbital, Carbamazepin, Phenytoin, Valproat und Ethosuximid auf spontane Anfälle nach pilocarpin-induziertem Status epilepticus wurde von LEITE u. CAVALHEIRO (1995) beschrieben. NISSINEN u. PITKÄNEN (2000) untersuchten den Effekt von Carbamazepin, Valproat, Ethosuximid, Lamotrigin und Vigabatrin auf spontane Anfälle im Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation.
Bei der zweiten Vorgehensweise wird eine chronische Behandlung unmittelbar nach der Induktion eines Status epilepticus begonnen, also bevor sich die chronische Erkrankung klinisch manifestiert. Hierbei werden Substanzen sowohl auf antiepileptogene Effekte, d.h. behandelte Tiere entwickeln keine spontanen Anfälle, als auch antikonvulsive Effekte, d.h. behandelte Tiere zeigen weniger Anfälle oder

entwickeln Anfälle erst nach Abbruch der Behandlung, getestet. Die Zahl solcher Studien ist ebenfalls überschaubar. Es wurden die Effekte einer Behandlung mit Phenobarbital (MIKATI et al. 1994, BOLANOS et al. 1998) und Valproat (BOLANOS et al. 1998) bei Jungtieren untersucht, wobei die Behandlung einen Tag nach kainat-induziertem Status epilepticus begann. In einer weiteren Studie wurde im Lithium-Pilocarpin-Modell 10 min nach der Pilocarpin-Applikation eine Behandlung mit Vigabatrin über 45 Tage eingeleitet (ANDRE et al. 2001). KLITGAARD et al. (2001) brachen einen pilocarpin-induzierten Status epilepticus nach 30 min ab und begannen unmittelbar anschließend mit einer Valproat- oder Levetiracetam-Behandlung über 21 Tage. Im Modell der elektrischen Amygdala-Stimulation wurde der Effekt einer Behandlung mit Vigabatrin über 10 Wochen untersucht, die Behandlung begann zwei Tage nach der Induktion eines Status epilepticus (HALONEN et al. 2001).

Die geringe Zahl von pharmakologischen Studien mit Epilepsiemodellen erklärt sich durch den höheren Zeit- und Arbeitsaufwand verglichen mit Untersuchungen in Anfallsmodellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer chronischen Behandlung mit Levetiracetam untersucht, im Lithium-Pilocarpin-Modell nach der ersten, im Modell der elektrischen BLA-Stimulation nach der zweiten oben beschriebenen Vorgehensweise.

Die Verwendung von osmotischen Minipumpen in pharmakologischen Studien weist zahlreiche Vorteile auf. Die Wirkstoffspiegel werden durch die kontinuierliche Substanzabgabe konstant im Tier aufrechterhalten. Es entfällt der Streß für das Tier und den Experimentator, der mit den unter Umständen sogar mehrmals täglichen Injektionen verbunden ist. Die Narkose, die zum Wechsel der subkutan implantierten Minipumpen notwendig ist, kann gleichzeitig zur Blutentnahme genutzt werden.
Da die Halbwertszeit von Levetiracetam bei Ratten mit 2 – 3 h deutlich kürzer ist als die Halbwertszeit beim Menschen mit 4 – 8 h, ist bei einer chronischen Behandlung von Ratten die Applikation via Minipumpe angeraten, um schwankende Wirkstoffspiegel zu vermeiden (LÖSCHER et al. 1998a, DOOLEY u. PLOSKER 2000).

5.3.1 Wirkung von Levetiracetam im Lithium-Pilocarpin-Modell

In dieser Studie wurde die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam auf spontane Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell untersucht. Die durchschnittliche Zahl der Anfälle betrug in der jeweils zweiwöchigen Kontrollperiode vor und nach der Behandlung mit Levetiracetam 21 bzw. 25 Anfälle. Die Anfallsfrequenz sank auf durchschnittlich 8 Anfälle unter der chronischen Behandlung mit Levetiracetam über zwei Wochen. Allerdings wurden starke individuelle Unterschiede in der Ansprache auf Levetiracetam zwischen den Ratten festgestellt. So reichte der nachweisbare Effekt von einer vollständigen Anfallskontrolle bis zu keiner Veränderung der Anfallszahl.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmaspiegel von Levetiracetam nach der ersten und zweiten Behandlungswoche bestimmt. Bei allen Tieren lagen die Plasmaspiegel in einem ähnlichen Bereich, so daß ausgeschlossen werden kann, daß die unterschiedliche Ansprache der Tiere auf pharmakokinetischen Ursachen beruhte. Von den insgesamt 8 mit Levetiracetam behandelten Ratten wurde bei 2 Tieren (25 %) eine vollständige Anfallsfreiheit beobachtet, bei 4 Tieren (50 %) eine Reduktion der Anfallszahl verglichen mit den Kontrollperioden und bei den verbleibenden 2 Tieren (25 %) keine Veränderung in der Zahl der registrierten Anfälle. In einer klinischen Studie von BEN-MENACHEM u. FALTER (2000) wurde die Wirkung einer Monotherapie mit Levetiracetam bei Patienten mit therapieresistenten fokalen Anfällen untersucht. Es wurden nur Patienten einbezogen, die in einer ersten Phase eine reduzierte Anfallszahl unter einer Komedikation mit Levetiracetam gezeigt hatten. Die Rate der 'Responder', d.h. der Patienten, die unter einer Monotherapie mit Levetiracetam (3000 mg/Tag) eine Reduktion der Anfallsfrequenz um mindestens 50 % zeigten, wird mit 59 % angegeben. Eine vollständige Anfallskontrolle wurde bei 18 % der Patienten beobachtet.

Diese Ergebnisse sind den Ergebnissen ähnlich, die im Lithium-Pilocarpin-Modell erhoben werden konnten. Dies läßt den Rückschluß zu, daß sich die Variabilität der medikamentösen Beeinflußbarkeit spontaner Anfälle beim Menschen auch in einem Epilepsiemodell widerspiegelt und untersucht werden kann. Dies wurde bereits für das Kindling-Modell bei Wistar-Ratten beschrieben, wo Tiere aufgrund ihrer individuellen Empfindlichkeit gegenüber Phenytoin als 'Responder‘, ‘Nonresponder‘

oder ‘variable Responder‘ selektiert werden können (LÖSCHER u. RUNDFELDT 1991). Eine Zusammenfassung der Selektionsergebnisse ergab einen Anteil von 19 % 'Respondern‘, 15 % ‘Nonrespondern‘ und 66 % ‘variablen Respondern‘ (LÖSCHER 1997). In zahlreichen Studien sind die möglichen Ursachen dieser unterschiedlichen Empfindlichkeit auf Antikonvulsiva im Kindling-Modell untersucht worden. Es konnten weder pharmakokinetische noch morphologische Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, auch jahreszeitliche Einflüsse konnten ausgeschlossen werden (LÖSCHER u. RUNDFELDT 1991, LÖSCHER et al. 1993, EBERT et al. 1999). Da allerdings Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Wistar-Ratten, zwischen den Nachkommen gezielter ‘Responder-Verpaarungen‘ und Kontrolltieren sowie zwischen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten auftraten, kann vermutet werden, daß genetische Einflüsse eine Rolle für die unterschiedliche Sensitivität spielen (EBERT et al. 1994, LÖSCHER et al. 1998b, EBERT u. LÖSCHER 1999). Neben genetischen sind vermutlich auch kindling-assoziierte Faktoren von Bedeutung, da einige Ratten vor Beginn des Kindling-Prozesses ein anderes Selektionsergebnis als nach Abschluß des Prozesses zeigten (LÖSCHER et al. 2000). Es müssen sich weitere Untersuchungen im Lithium-Pilocarpin-Modell mit anderen Antikonvulsiva anschließen, um verifizieren zu können, ob auch in diesem Modell die Selektion von ‘Respondern‘ und ‘Nonrespondern‘ möglich ist. Sollte dies der Fall sein, wäre neben dem Kindling-Modell für akute Anfälle auch ein chronisches Epilepsiemodell für therapieresistente Patienten mit komplex-fokalen Anfällen verfügbar.

LEITE u. CAVALHEIRO (1995) untersuchten die Wirkung verschiedener Antikonvulsiva auf spontane Anfälle im Pilocarpin-Modell. Eine Behandlung über zwei Wochen mit Phenobarbital (40 mg/kg/Tag), Carbamazepin (120 mg/kg/Tag), Phenytoin (100 mg/kg/Tag) oder Valproat (600 mg/kg/Tag) führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Anfallszahlen. Annähernd alle Ratten zeigten keine Anfälle unter der Behandlung mit den genannten Antikonvulsiva, was allerdings nicht der klinischen Situation beim Patienten mit Temporallappenepilepsie entspricht (LEPPIK 1992). In dieser Studie wurden vergleichsweise hohe Dosierungen verwendet, allerdings erfolgte keine Kontrolle der Plasmaspiegel. Ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Mensch und Ratte ist aufgrund der unterschiedlichen Pharmakokinetik von Antikonvulsiva bei Mensch und Ratte ohne Angabe der

Plasmaspiegel nicht möglich (LÖSCHER u. SCHMIDT 1988). In der Studie von LEITE u. CAVALHEIRO (1995) waren die Dosierungen so hoch, daß deutliche unerwünschte Wirkungen (Erschlaffung der Muskulatur, Sedation) bei den Tieren beobachtet werden konnten. Das antikonvulsive Potential einer Substanz, die in Dosierungen verabreicht werden muß, die mit deutlichen Nebenwirkungen einhergehen, ist für den klinischen Einsatz beim Menschen ohne Bedeutung. Aus diesem Grund sollte auch in Tiermodellen mit Dosierungen gearbeitet werden, die zu keinen stärkeren unerwünschten Wirkungen als die beim epileptischen Patienten tolerierten Nebenwirkungen führen.

Levetiracetam ist seit September 2000 in Deutschland zur Komedikation bei Patienten mit therapieresistenten fokalen Epilepsien zugelassen. Bereits in den klinischen Studien zeigte Levetiracetam gute antikonvulsive Effekte, wobei höhere Dosierungen in der Regel mit einer höheren Wirksamkeit einhergingen (Übersicht von BEYENBURG u. BAUER 2001). Die Verträglichkeit wird als gut beschrieben und Nebenwirkungen treten mit einer ähnlichen Inzidenz wie bei Placebo-behandelten Patienten auf. Die Schwere der Anfälle ändert sich bei den meisten Patienten nicht unter der Behandlung (DOOLEY u. PLOSKER 2000). Bezüglich einer medikamentösen Langzeittherapie mit Levetiracetam geht aus einer Studie an 35 Patienten über 5 Jahre hervor, daß kein Wirkungsverlust festgestellt werden konnte (KRAKOW et al. 2000). In einer tierexperimentellen Untersuchung im Kindling-Modell wurde allerdings bei einer chronischen Levetiracetam-Behandlung von vollgekindelten Ratten über 3 Wochen eine Toleranzentwicklung, sprich ein Wirkungsverlust, beobachtet (LÖSCHER u. HÖNACK 2000).
Während der chronischen Levetiracetam-Behandlung von Ratten mit spontanen Anfällen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, konnten keine unerwünschten Substanzwirkungen festgestellt werden. Die Tiere waren unter der Behandlung insgesamt ruhiger, was vermutlich der als Somnolenz beschriebenen Nebenwirkung beim Patienten entspricht. Die durchschnittliche Anfallsschwere und Anfallslänge wurde nicht durch die Behandlung beeinflußt. Bei einigen Tieren war ein „carry-over“-Effekt der antikonvulsiven Wirkung von Levetiracetam in die Woche nach Abbruch der Behandlung festzustellen. Dagegen war bei anderen Tieren die antikonvulsive Wirksamkeit von Levetiracetam bereits in der zweiten Behandlungswoche geringer als in der ersten Behandlungswoche. Da die

Blutplasmaspiegel von Levetiracetam bei den entsprechenden Tieren innerhalb des therapeutischen Bereichs lagen (KLITGAARD et al. 2001), war der Wirkungsverlust vermutlich auf die Entwicklung einer funktionellen Toleranz zurückzuführen. Auch LEITE u. CAVALHEIRO (1995) beobachteten im Pilocarpin-Modell eine verminderte antikonvulsive Wirkung von Phenobarbital und Carbamazepin in der zweiten Woche der Behandlung.

Obwohl pharmakologische Studien an Tieren mit spontanen Anfällen zeit- und arbeitsaufwendiger sind, stimmen die in ihnen gewonnenen Ergebnisse besser mit der klinischen Situation von Patienten überein als Daten, die in Anfallsmodellen erhoben werden. Es wäre daher sinnvoll, Untersuchungen an Epilepsiemodellen in die präklinische Entwicklung und Charakterisierung neuer Antikonvulsiva zu integrieren.

5.3.2 Wirkung von Levetiracetam im Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß durch die chronische Behandlung mit Levetiracetam, beginnend 24 h nach der Induktion eines Status epilepticus durch elektrische Stimulation der BLA, die Entwicklung spontaner Anfälle im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nicht beeinflußt wurde.

In einer Untersuchung von LÖSCHER et al. (1998a) konnte eine Verlangsamung des Kindling-Prozesses bei Ratten beobachtet werden, die während der täglichen elektrischen Stimulationen mit Levetiracetam behandelt wurden. Levetiracetam unterdrückte dabei dosisabhängig eine Zunahme der Anfallsschwere und -länge. Dieser Effekt hielt über den Behandlungszeitraum hinaus bei weiteren Stimulationen in der wirkstofffreien Phase an. Auf diesem Ergebnis basierend wurde die Vermutung aufgestellt, daß Levetiracetam möglicherweise eine antiepileptogene Wirkung aufweist, d.h. den Prozeß der Entwicklung einer Epilepsie hemmt.
Dies sollte im Modell der elektrischen BLA-Stimulation näher untersucht werden. In der Studie wurden nur Tiere eingesetzt, die nach den bisherigen Ergebnissen in diesem Modell mit sehr großer Wahrscheinlichkeit spontane Anfälle entwickeln würden. Von den insgesamt 20 Ratten zeigten 18 einen generalisierten und 2 einen

fokalen Status epilepticus mit zahlreichen generalisierten Anfällen. Die Hälfte dieser Tiere wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen mit Levetiracetam behandelt, wobei die Länge der Behandlung so gewählt wurde, daß die durchschnittliche Latenzphase bis zum ersten spontanen Anfall überbrückt wurde. Das Zeitfenster zwischen auslösendem Insult und Behandlungsbeginn betrug 24 h und lag somit in einem Bereich, der auch in ähnlich aufgebauten Studien genannt wird (MIKATI et al. 1994, BOLANOS et al. 1998, HALONEN et al. 2001). Als kritisch ist zu betrachten, daß die täglichen Dosierungen von Levetiracetam über die 8 Wochen der Behandlung durch die Gewichtszunahme der Tiere von zunächst durchschnittlich 292 mg/kg in der 1./2. Behandlungswoche kontinuierlich auf schließlich 223 mg/kg in der 7./8. Behandlungswoche absanken. Dementsprechend sanken auch die Blutplasmaspiegel von Levetiracetam im gleichen Zeitraum von durchschnittlich 36 auf 24 µg/ml ab. Der Grund hierfür war das steigende Körpergewicht der Tiere, nicht die Entwicklung einer metabolischen Toleranz. Da das Füllvolumen der Minipumpen sowie die Löslichkeit von Levetiracetam begrenzt waren, konnte keine Anpassung der Dosierung erfolgen. Dies steht in einem Gegensatz zur Klinik, wo die medikamentöse Therapie beim Patienten mit kleinen Dosierungen eingeleitet wird und bis zum Eintreten eines Behandlungserfolgs allmählich gesteigert wird. Betrachtet man allerdings die Dosierungen von Levetiracetam, die bei adulten Patienten eingesetzt und als gut verträglich beschrieben werden, so liegen diese bei maximal 4000 mg/Tag (GRANT u. SHORVON 2000), was etwa einer Dosierung von 57 mg/kg entspricht. Rechnet man die Dosierungen, welche die Ratten während der chronischen Behandlung mindestens erhielten auf die maximale Dosierung beim Menschen um, so erhielten die Ratten immer noch die vierfache Dosis, die ein Patient mit einem Körpergewicht von 70 kg maximal erhält.

Sowohl unter der Behandlung mit Levetiracetam als auch in der anschließenden wirkstofffreien Kontrollphase konnten individuelle Unterschiede in der Anzahl der spontanen Anfälle zwischen den Tieren beobachtet werden. Ein vergleichbares Bild ergab sich für die unbehandelte Kontrollgruppe. In beiden Gruppen nahmen die durchschnittliche Anzahl und Schwere der Anfälle in den ersten Wochen nach dem Status epilepticus zu. Diese Progression scheint ein Merkmal des Modells zu sein und wurde bereits für andere elektrische Epilepsiemodelle beschrieben (BERTRAM u. CORNETT 1994, NISSINEN et al. 2000, GORTER et al. 2001). Die Auswertung

der Anfallsparameter in der ersten und zweiten Überwachungswoche unter der Levetiracetam-Behandlung gab keinen eindeutigen Hinweis, daß die Entwicklung einer Toleranz zu einem Wirkungsverlust führte, obwohl die Entwicklung einer funktionellen Toleranz nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Wie bereits beschrieben zeigte Levetiracetam im Lithium-Pilocarpin-Modell eine antikonvulsive Wirkung auf spontane Anfälle, wobei bezüglich der individuellen Ansprache ein ähnliches Bild wie beim Patienten festgestellt wurde. Dagegen wurden im Modell der elektrischen BLA-Stimulation weder antiepileptogene noch antikonvulsive Effekte von Levetiracetam beobachtet. Eine mögliche Erklärung wären die vergleichsweise geringeren Dosierungen von Levetiracetam, die im letzteren Modell eingesetzt wurden. Möglicherweise beruhen diese Unterschiede auch auf einer unterschiedlichen pharmakologischen Beeinflußbarkeit der spontanen Anfälle, wobei sie im elektrischen Modell schwieriger zu unterdrücken wären. Die Wirkung von Lamotrigin, Valproat, Carbamazepin, Vigabatrin und Ethosuximid auf spontane Anfälle nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus wurde von NISSINEN u. PITKÄNEN (2000) untersucht, wobei alle Substanzen mehr oder weniger deutlich antikonvulsiv wirkten. Ein direkter Vergleich zwischen diesen beiden Studien ist allerdings aus mehreren Gründen nicht möglich. NISSINEN u. PITKÄNEN (2000) verwendeten ein anderes Stimulationsprotokoll, stimulierten eine andere Region innerhalb der Amygdala und behandelten die Ratten erst in der chronisch epileptischen Phase, also zu einer Zeit, wo bereits spontane Anfälle aufgetreten waren. Möglicherweise sind spontane Anfälle in einer späteren Phase der Entwicklung leichter zu unterdrücken als in der frühen Phase. Dies könnte auch eine Erklärung für die antikonvulsive Wirkung von Levetiracetam auf spontane Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell sein, wo die Behandlung der Tiere erst Wochen nach dem ersten spontanen Anfall stattfand. In dieser Hinsicht sind auch die Ergebnisse anderer Studien interessant, in denen die Auswirkungen einer Behandlung mit verschiedenen Antikonvulsiva auf die Entwicklung spontaner Anfälle nach einem Status epilepticus untersucht wurden. KLITGAARD et al. (2001) beeinflußten weder durch die Applikation von Valproat noch durch Levetiracetam die Anzahl von Tieren, die spontane Anfälle nach einem pilocarpin-induzierten Status epilepticus zeigten. Dabei wurde Levetiracetam in Dosierungen von 50 bis 300 mg/kg/Tag verwendet, womit die Dosierungen, die ich in beiden pharmakologischen Studien einsetzte im

oberen Bereich liegen, und führte zu Plasmaspiegeln, die auch beim Menschen klinisch relevant sind. Von Valproat ist bekannt, daß es eine gute antikonvulsive Wirkung auf spontane Anfälle im Pilocarpin-Modell hat, wobei die gleiche Dosierung wie in oben genannter Studie verwendet wurde (LEITE u. CAVALHEIRO 1995). Vigabatrin hat eine antikonvulsive Wirkung auf spontane Anfälle nach einem elektrisch induzierten Status epilepticus (NISSINEN u. PITKÄNEN 2000). Beginnt die Behandlung allerdings schon zwei Tage nach dem Status epilepticus kann kein Unterschied in der Anzahl von Tieren mit spontanen Anfällen und der Anfallsfrequenz zu unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden (HALONEN et al. 2001). Eine ähnliche Studie mit Vigabatrin wurde mit vergleichbaren Ergebnissen im Lithium-Pilocarpin-Modell durchgeführt, wobei die Behandlung wenige Minuten nach der Pilocarpin-Applikation begonnen wurde (ANDRE et al. 2001). Einzig die Untersuchungen von MIKATI et al. (1994) und BOLANOS et al. (1998) an Jungtieren nach kainat-induziertem Status epilepticus zeigten einen positiven Effekt durch eine chronische Behandlung mit Phenobarbital oder Valproat, beginnend einen Tag nach Status epilepticus. Phenobarbital wirkte demnach antikonvulsiv und reduzierte die Anzahl spontaner Anfälle während der Behandlung, die allerdings nach Abbruch der Behandlung mit gleicher Frequenz wie bei unbehandelten Kontrolltieren auftraten. Der absolute Anteil von Tieren, die spontane Anfälle entwickelten, war dabei zwischen behandelten und unbehandelten Tieren vergleichbar. Dagegen schien Valproat eine antiepileptogene Wirkung aufzuweisen, da bei keinem dieser Tiere spontane Anfälle unter und nach dem Abbruch der Behandlung zu beobachten waren. Dieser Effekt trat nicht bei der klinischen Anwendung von Valproat bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma auf. Valproat unterdrückte zwar die frühen Anfälle nach dem Insult, beeinflußte aber nicht die langfristige Entwicklung einer Epilepsie bei einem Großteil der Patienten (TEMKIN et al. 1999). Dies beschreibt auch die jetzige Situation in der Humanmedizin, wo keine Substanz zur Verfügung steht, die bei prophylaktischer Verabreichung nach einem Insult die langfristige Entwicklung einer Epilepsie verhindert (Übersicht von HERNANDEZ 1997).

Es müssen sich weitere Untersuchungen in Epilepsiemodellen anschließen, um festzustellen, ob pharmakologische Unterschiede in der Beeinflußbarkeit früher und später Phasen der Erkrankung bestehen. Der Einfluß der Krankheitsgeschichte auf einen Therapieerfolg wird auch in der Humanmedizin kontrovers diskutiert (REGESTA u. TANGANELLI 1999).

Ein wichtiger Aspekt bei der prophylaktischen Behandlung von Tieren nach einem Status epilepticus ist das Zeitfenster, d.h. welcher Zeitraum liegt zwischen auslösendem Insult und Behandlungsbeginn. In der vorliegenden Arbeit begann die Behandlung 24 h nach der Induktion eines Status epilepticus. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß zu diesem Zeitpunkt das „therapeutische Fenster“ bereits geschlossen war und eine frühere Behandlung zu positiven Ergebnissen geführt hätte. Dagegen sprechen allerdings die Untersuchungen mit Levetiracetam, Valproat und Vigabatrin, in denen die Behandlung innerhalb von weniger als 1 h nach der Induktion eines Status epilepticus begonnen wurde und trotzdem nicht die Epileptogenese verhinderte (ANDRE et al. 2001, KLITGAARD et al. 2001). Doch generell entspricht dieses Versuchsdesign eher der klinischen Situation. Bei Patienten mit einem Status epilepticus wird dieser so schnell wie möglich unterbrochen und auch die Behandlung von Trauma- oder Schlaganfall-Patienten erfolgt unverzüglich, so daß eine prophylaktische antiepileptogene Behandlung vermutlich zu einem früheren Zeitpunkt als 24 h nach der initialen Schädigung möglich wäre. Für zukünftige Untersuchungen würde sich ein möglichst geringes Zeitfenster zwischen Status epilepticus und Behandlungsbeginn empfehlen, um festzustellen, ob ein „therapeutisches Fenster“ bei Verwendung bereits bekannter oder neu entwickelter Substanzen existiert und wenn ja, wie lange es geöffnet bleibt.

Abschließend läßt sich sagen, daß in dem Modell der elektrischen BLA-Stimulation keine Hinweise für eine antiepileptogene Wirkung von Levetiracetam festgestellt worden sind.
Die generelle Problematik dabei ist, daß in der Humanmedizin zum jetzigen Zeitpunkt keine Substanz mit klinisch abgesicherter antiepileptogener Wirkung verfügbar ist. Aus diesem Grund kann einerseits keine Validierung von Tiermodellen zur Untersuchung potentiell antiepileptogen wirkender Substanzen erfolgen. Da klinische Studien an Menschen andererseits sehr aufwendig sind, ist der Einsatz von Epilepsiemodellen für weitere pharmakologische Untersuchungen wichtig. Sinnvoll wäre hierbei die Verwendung möglichst verschiedener Modelle, um wirksame Substanzen zu selektieren und anschließend einer klinischen Prüfung zu unterziehen. Im Rückschluß wäre dann die Validierung von etablierten Epilepsiemodellen durchführbar.

In den tierexperimentellen Untersuchungen sollten der zeitliche Abstand zwischen Insult und Behandlungsbeginn, die verwendete Dosierung und die Dauer der Behandlung von besonderem Interesse sein. Durch die Variation von nur einem dieser Parameter könnten möglicherweise schon andere Ergebnisse gewonnen werden.

5.4 Ausblick

Der zunehmende Einsatz von Epilepsiemodellen in der experimentellen Forschung vergrößert den Bedarf an Modellen, die sich durch eine einfache und zuverlässige Erzeugung, eine geringe Mortalität und eine hohe Ausbeute an Ratten mit spontanen Anfällen auszeichnen. Dabei soll das im Tier erzeugte Krankheitsbild der Erkrankung beim Menschen möglichst ähnlich sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch Modifikationen in den Versuchsprotokollen bereits etablierte Tiermodelle verbessert werden können. Dieser Optimierungsprozeß ist aber keineswegs abgeschlossen. Im Lithium-Pilocarpin-Modell sollten die Auswirkungen einer weiteren Verkürzung der Status epilepticus-Länge auf 30 min hinsichtlich der Mortalitätsrate, der chronisch epileptischen Phase und neuropathologischer Veränderungen untersucht werden. Möglicherweise könnten durch eine weitere Verkürzung der Status-Länge die massiven Effekte von Pilocarpin bezüglich der Mortalität, des beeinträchtigten Allgemeinbefindens der Tiere und der Neuroläsionen, verglichen mit dem Modell der elektrischen BLA-Stimulation, abgeschwächt werden. Im Modell der elektrischen BLA-Stimulation wäre es sinnvoll festzustellen, ab welcher Länge des induzierten Status epilepticus die Tiere anschließend spontane Anfälle entwickeln. Dies wäre für pharmakologische Studien zur Untersuchung potentiell antiepileptogener Substanzen in diesem Epilepsiemodell von Bedeutung, da hier zunächst wie oben ausgeführt ein möglichst kurzer Zeitraum zwischen auslösendem Insult und Behandlungsbeginn gewählt werden sollte.

Sowohl in dem chemischen als auch in dem elektrischen Modell wäre eine kontinuierliche Überwachung der Tiere sinnvoll, um in diesen Tiermodellen für Temporallappenepilepsie den Verlauf einer unbehandelten Epilepsie beurteilen zu können. Dies ist auch für die Humanmedizin relevant. Hier wird die Temporallappenepilepsie zumindest von einigen Epileptologen als progressiv verlaufende neurologische Erkrankung betrachtet (Übersicht von ENGEL 1996). Die

dabei ablaufenden Mechanismen sind nicht bekannt. Die kontroverse Frage, ob ein Anfall das Auftreten des nächsten Anfalls begünstigt, oder ob es sich um einen Prozeß der Reorganisation synaptischer Verbindungen nach einem auslösenden Insult handelt, kann bisher nicht beantwortet werden. Die Antwort ist allerdings von großer Relevanz bezüglich der Therapie von Epilepsien. Ersteres würde bedeuten, daß eine frühzeitige Behandlung sinnvoll ist, letzteres dagegen, daß ein Reifungsprozeß abläuft, der vermutlich schwieriger pharmakologisch zu beeinflussen ist.

Die Studie zur Untersuchung der Wirkung von Levetiracetam im Lithium-Pilocarpin-Modell hat gezeigt, daß eine der Therapie beim Menschen ähnliche Situation im Tiermodell abgebildet werden kann. Inwieweit die Tiere als ‘Responder‘ und ‘Nonresponder‘ selektiert werden können, muß in weiteren Untersuchungen ermittelt werden. Ratten, deren Anfälle nicht mit den bisher bekannten Antikonvulsiva kontrolliert werden können, wären ein wichtiges Modell für die Therapieresistenz bei Epileptikern.

Beide in dieser Arbeit neu etablierten Modelle müssen weiter pharmakologisch charakterisiert werden. Außerdem wären weitere Studien wünschenswert, in denen das mögliche antiepileptogene Potential von Substanzen getestet wird, da die Prävention von Epilepsien von großer Bedeutung für die Human- und Tiermedizin wäre.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien gehören zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des Menschen. Tiermodelle haben eine große Bedeutung in der experimentellen Epilepsieforschung, da zum jetzigen Zeitpunkt weder die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen dieses Erkrankungskomplexes noch die Ursachen der bei einem Teil der Patienten auftretenden Therapieresistenz gegenüber bekannten Antikonvulsiva aufgeklärt sind. Ein ideales Tiermodell sollte dabei folgende Anforderungen erfüllen. Zum einen sollte es die Charakteristika der entsprechenden Epilepsieform beim Menschen widerspiegeln. Zum anderen sollte die Erstellung des Modells möglichst einfach und zuverlässig sein. Ein ideales Tiermodell, das diese beiden Anforderungen erfüllt, ist bisher nicht verfügbar. Anfallsmodelle zeigen keine spontanen epileptischen Anfälle, die das gemeinsame Merkmal aller Epilepsien beim Menschen sind. Ihr Einsatz geht allerdings mit einem geringen Zeit- und Arbeitsaufwand einher. Umgekehrtes gilt für Epilepsiemodelle, bei denen spontane Anfälle auftreten, die jedoch in der Erstellung bzw. Verwendung mit einem höheren Aufwand verbunden sind. Für einige der bisher etablierten Epilepsiemodelle ist eine hohe Mortalität oder eine geringe Ausbeute an epileptischen Tieren beschrieben. Ziel dieser Arbeit war daher zunächst, durch Modifikationen bekannter Protokolle zwei verbesserte Epilepsiemodelle zu etablieren, wobei die Induktion der Epileptogenese in dem einen Modell chemisch, in dem anderen Modell elektrisch erfolgte. Im Lithium-Pilocarpin-Modell sollten die Effekte einer fraktionierten Applikation des Cholinomimetikums Pilocarpin auf die Induktion eines Status epilepticus und die chronisch epileptische Phase untersucht werden. Gleichzeitig sollte eine Limitierung der Status-Länge erfolgen. Im Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala sollte der Einfluß von Geschlecht und Stamm der Ratten auf die Induktion eines Status epilepticus sowie dessen Einfluß auf die Entwicklung spontaner Anfälle festgestellt werden.

Durch die wiederholte Applikation von Pilocarpin in geringen Dosierungen (max. 4x 10 mg/kg) bei mit Lithium vorbehandelten Ratten konnte zuverlässig ein Status epilepticus ausgelöst werden, der bei einem Großteil der Tiere später zur Entwicklung von spontanen Anfällen führte. In Verbindung mit einem Abbruch des Status nach 90 min konnte dadurch die Mortalität signifikant gesenkt werden, verglichen mit einer einmaligen Applikation von Pilocarpin (30 mg/kg) bei gleicher Status-Länge oder fraktionierter Applikation und einer Status-Länge von 120 min.

Im Modell der elektrischen Stimulation der basolateralen Amygdala konnten hinsichtlich der Induktion eines Status epilepticus deutliche Unterschiede zwischen weiblichen Wistar-Ratten und Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts festgestellt werden. Aufgrund der Krampfschwere war eine Unterteilung des induzierten Status in drei Arten möglich: fokaler Status epilepticus, fokaler Status epilepticus mit generalisierten Anfällen und generalisierter Status epilepticus. Generalisierte Krampfaktivität führte dabei bei annähernd allen Tieren später zum Auftreten spontaner Anfälle. Weibliche Wistar-Ratten entwickelten häufig keinen oder einen fokalen Status epilepticus, während die Status-Induktion mit zumindest anteiliger generalisierter Krampfaktivität bei fast allen Sprague-Dawley-Ratten gelang.

Da die Anfälle in Epilepsiemodellen spontan auftreten, ist eine intensive Überwachung der Tiere erforderlich. Parallel zur Modelletablierung sollte eine neue Methode zur Anfallsdetektion auf ihre Anwendbarkeit geprüft werden. Diese Methode beruht auf der Messung von Bewegungsintensitäten mittels Beschleunigungssensoren. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind diese Sensoren eine gute Alternative zu herkömmlichen Methoden, um Ratten mit generalisierten Anfällen zu selektieren. Allerdings sind sie zur Detektion von fokalen Anfällen, die mit einer geringen motorischen Aktivität einhergehen, nicht geeignet.

Abschließend wurden die Effekte einer chronischen Behandlung mit dem neuen Antikonvulsivum Levetiracetam in beiden Modellen untersucht. Levetiracetam zeigte eine antikonvulsive Wirkung auf spontane Anfälle im Lithium-Pilocarpin-Modell, wobei die individuelle Ansprache der Tiere ähnlich der klinischen Situation beim Menschen war. Im Modell der elektrischen Stimulation sollten antikonvulsive und antiepileptogene Effekte von Levetiracetam getestet werden, aus diesem Grund begann die Behandlung unmittelbar nach der Status-Induktion. Es konnten weder Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von Tieren mit spontanen Anfällen noch der Anfallsparameter zwischen behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren in diesem Modell festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß eine sinnvolle Optimierung von Epilepsiemodellen möglich ist, und daß pharmakologische Untersuchungen in solchen Modellen wertvolle Ergebnisse zur Wirksamkeit von Antikonvulsiva liefern können. Beide Ansätze sollten durch zukünftige Untersuchungen in der Epilepsieforschung weiter verfolgt werden.

7. SUMMARY

Characterization of two animal models of epilepsy and different methods for the detection of spontaneous recurrent seizures.

Maike Glien

Epilepsies belong to the most common chronic neurological diseases in humans. Animal models are of great importance in experimental epilepsy research, since neither the underlying pathophysiological mechanisms of this disease nor the causes of pharmacoresistance against known anticonvulsants occurring in some patients are explained up to now. An ideal animal model should fulfill the following requirements. First of all, the model should reflect the characteristics of the corresponding type of epilepsy in humans. Secondly, the generation of the model should be as easy as possible and be most reliable. An ideal animal model, which fulfills these two requirements, is not available so far. In models of elicited seizures, no spontaneous epileptic seizures can be observed, which are the common feature of all epilepsies in humans. However, the use of seizure models is less time-consuming and laborious. The opposite applies to epilepsy models in which spontaneous recurrent seizures occur, but their generation and use require a higher expenditure of time and work. For some of the epilepsy models characterized so far, a high mortality rate or a small proportion of animals developing epilepsy is described. First of all the aim of this study was the characterization of two improved models of epilepsy by modifications of well-known protocols in which epileptogenesis was induced chemically in one model and electrically in the other model. In the lithium pilocarpine model the effects of a repeated low-dose treatment with the cholinomimetic pilocarpine on the induction of status epilepticus and the chronic epileptic period was examined. The duration of status epilepticus was limited to a certain time. In the model of electrical stimulation of the basolateral amygdala, the influence of gender and strain of the rats on the induction of status epilepticus as well as the influence of the type of status epilepticus on the development of spontaneous seizures was investigated.

The repeated administration of pilocarpine in low doses (up to 4x 10 mg/kg) to lithium-pretreated rats efficiently induced status epilepticus which later led in the majority of animals to the development of spontaneous seizures. The mortality rate could be lowered significantly by termination of status epilepticus after 90 min as compared with a single application of pilocarpine (30 mg/kg) and the same duration

of status epilepticus or the repeated low-dose treatment and a duration of status epilepticus of 120 min.

In the model of electrical stimulation of the basolateral amygdala, marked differences between female Wistar rats and female and male Sprague-Dawley rats could be determined regarding the induction of status epilepticus. With respect to seizure severity, three types of status epilepticus could be distinguished: focal status epilepticus, focal status epilepticus with some generalized seizures, and generalized status epilepticus. Generalized seizure activity during status epilepticus resulted in almost all animals in the development of spontaneous seizures following a latency period. Female Wistar rats in most cases developed no or only a focal status epilepticus, whereas Sprague-Dawley rats exhibited a status epilepticus with generalized seizure activity in almost all cases.

Since seizures in epilepsy models occur spontaneously, an intense monitoring of the animals is necessary. Simultaneously to the generation of the models, a new method for seizure detection was checked for its applicability. This method is based on the measurement of intensities of motions by means of acceleration sensors. The results of this work demonstrated that these sensors are a good alternative to conventional methods such as video or EEG recordings in order to select rats with generalized seizures. However, they are not suitable for the detection of focal seizures, which are associated with a low motor activity.

Finally the effects of chronic treatment with the new anticonvulsant levetiracetam were examined in both models. Levetiracetam showed an anticonvulsant effect on spontaneous seizures in the lithium pilocarpine model, whereby the individual response of the animals differed in a manner comparable to the clinical situation in humans. In the model of electrical stimulation, anticonvulsant and antiepileptogenic effects of levetiracetam were tested. For this reason, treatment was started immediately after the induction of status epilepticus. No differences could be determined regarding the number of animals with spontaneous seizures as well as the seizure parameters when comparing data from treated animals and untreated control animals in this model.

The results of this work show that a meaningful optimization of epilepsy models is possible and that pharmacological studies in these models can supply valuable results to the effectiveness of anticonvulsants. These approaches should be further pursued by future investigations in epilepsy research.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AICARDI, J. u. J. J. CHEVRIE (1970):
Convulsive status epilepticus in infants and children. A study of 239 cases.
Epilepsia **11**, 187 - 197

ALLEN, K. M. u. C. WALSH (1996):
Shaking down new epilepsy genes.
Nature Med. **2**, 516 - 518

ALVING, J. (1995):
What is intractable epilepsy?
in: S. I. JOHANNESSEN, L. GRAM, M. SILLANPÄÄ, T. TOMSON (Hrsg.):
Intractable epilepsy; Wrightson Biomedical Publishing, Petersfield, S. 1 - 12

ANDRE, V., A. FERRANDON, C. MARESCAUX u. A. NEHLIG (2000):
Electroshocks delay seizures and subsequent epileptogenesis but do not prevent neuronal damage in the lithium-pilocarpine model of epilepsy.
Epilepsy Res. **42**, 7 - 22

ANDRE, V., A. FERRANDON, C. MARESCAUX u. A. NEHLIG (2001):
Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res. **47**, 99 - 117

ANNEGERS, J. F., W. A. HAUSER u. L. R. ELVEBACK (1979):
Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy.
Epilepsia **20**, 729 - 737

ANNEGERS, J. F., W. A. HAUSER u. S. B. SHIRTS (1984):
Heart disease mortality and morbidity in patients with epilepsy.
Epilepsia **25**, 699 – 704

ARIDA, R. M., F. A. SCORZA, C. A. PERES u. E. A. CAVALHEIRO (1999a):
The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy.
Epilepsy Res. **34**, 99 – 107

ARIDA, R.M., F.A. SCORZA, N.F. DOS SANTOS, C.A. PERES u.
E.A. CAVALHEIRO (1999b):
Effect of physical exercise on seizure occurance in a model of temporal lobe epilepsy in rats.
Epilepsy Res. **37**, 45 - 52

ARNOLD, P. S., R. J. RACINE u. R. A. WISE (1973):
Effects of atropine, reserpine, 6-hydroxydopamine, and handling on seizure development in the rat.
Expl. Neurol. **40**, 457 - 470

BARAN, H., H. LASSMANN u. O. HORNYKIEWICZ (1988):
Behavior and neurochemical changes 6 months after kainic acid.
Soc. Neurosci. Abstr. **14**, 472

BEN-ARI, Y., E. TREMBLEY u. O. P. OTTERSEN (1980):
Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an elctrographic, clinical and histological study in the relation to the pathology of epilepsy.
Neuroscience **5**, 515 - 528

BEN-MENACHEM, E. u. U. FALTER; *European Levetiracetam Study Group* (2000):
Efficacy and tolerability of levetiracetam 3000 mg/d in patients with refractory partial seizures: a multicenter, double-blind, responder-selected study evaluating monotherapy.
Epilepsia **41**, 1276 - 1283

BERGER, M. L., J. M. LEFAUCONNIER, E. TREMBLEY u. Y. BEN-ARI (1986):
Limbic seizures induced by systemically applied kainic acid: how much kainic acid reaches the brain?
in: E. SCHWARCZ, Y. BEN-ARI (Hrsg.): *Excitatory Amino Acids and Epilepsy*; Plenum, New York, S. 199 - 209

BERTRAM, E. H. u. E. W. LOTHMAN (1990):
NMDA antagonists and limbic status epilepticus: a comparison with standard anticonvulsants.
Epilepsy Res. **5**, 177 - 184

BERTRAM, E. H., E. W. LOTHMAN u. N. J. LENN (1990):
The hippcampus in experimental chronic epilepsy: a morphometric analysis.
Ann. Neurol. **27**, 43 - 48

BERTRAM, E. H. u. J. F. CORNETT (1993):
The ontogeny of seizures in a rat model of limbic epilepsy: evidence for a kindling process in the development of chronic spontaneous seizures.
Brain Res. **625**, 295 - 300

BERTRAM, E. H. u. J. F. CORNETT (1994):
The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures.
Brain Res. **661**, 157 - 162

BERTRAM, E. H., J. M. WILLIAMSON, J. F. CORNETT, S. SPRADLIN u. Z. F. CHEN (1997):
Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals.
Brain Res. Protoc. **2**, 85 - 97

BEYENBURG, S. u. J. BAUER (2001):
Levetiracetam (Keppra®): Ein neues Antiepileptikum.
Zeitschr. Epileptol. **14**, 18 - 22

BOLANOS, A. R., M. SARKISIAN, Y. YANG, A. HORI, S. L. HELMERS, M. MIKATI, P. TANDON, C. E. STAFSTROM u. G. L. HOLMES (1998):
Comparison of valproate and phenobarbital treatment after status epilepticus in rats.
Neurology **51**, 41 – 48

BRAGIN, A., J. J. ENGEL, C. L. WILSON, E. VIZENTIN u. G. W. MATHERN (1999):
Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection.
Epilepsia **40**, 1210 - 1221

BRANDT, C. (2002):
Die Rolle der Apoptose bei der Pathogenese der Temporallappenepilepsie im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antiepileptika.
Ph.D. These, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover (eingereicht)

BRINES, M. L., A. O. DARE u. N. C. LANEROLLE (1995):
The cardiac glycoside ouabain potentiates excitotoxic injury of adult neurons in rat hippocampus.
Neurosci. Lett. **191**, 145 - 148

BUREAU, Y. R. u. M. A. PERSINGER (1993):
Transient blocking of persistent gnawing by haloperidol in rats with seizure-induced multifocal brain damage.
Life Sci. **52**, 869 - 876

CALLENBACH, P. M., R. G. WESTENDORP, A. T. GEERTS, W. F. ARTS, E. A. PETERS, C. A. VAN DONSELAAR, A. C. PETERS, H. STROINK u. O. F. BROUWER (2001):
Mortality risk in children with epilepsy: the Dutch study of epilepsy in childhood.
Pediatrics **107**, 1259 - 1263

CAVALHEIRO, E.A. (1995):
The pilocarpine model of epilepsy.
Ital. J. Neurol. Sci. **16**, 33 - 37

CAVALHEIRO, E. A., D. RICHE u. G. LE GAL LA SALLE (1982):
Longterm effects of intrahippocampal kainic acid in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures.
Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **53**, 581 - 589

CAVALHEIRO, E. A., J. P. LEITE, Z. A. BORTOLOTTO, W. A. TURSKI, C. IKONOMIDOU u. L. TURSKI (1991):
Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures.
Epilepsia **32**, 778 - 782

CAVALHEIRO, E. A., M. J. FERNANDES, L. TURSKI u.
M. G. NAFFAH-MAZZACORATTI (1994):
Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus.
Epilepsia **35**, 1 – 11

CAVALHEIRO, E. A., N. F. SANTOS u. M. R. PRIEL (1996):
The pilocarpine model of epilepsy in mice.
Epilepsia **37**, 1015 - 1019

CEREGHINO, J. J., V. BITON, B. ABOU-KHALIL, F. DREIFUSS, L. GAUER u.
I. LEPPIK, *and the United States Levetiracetam Study Group* (2000):
Levetiracetam for partial seizures. Results of a double-blind, randomized clinical trial.
Neurology **55**, 236 - 242

CHAUDHARY, G., J. MALHOTRA, J. D. CHAUDHARI, G. GOPINATH u.
Y. K. GUPTA (1999):
Effects of different lithium priming schedule on pilocarpine-induced status epilepticus in rats.
Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. **21**, 21 - 24

CHEVRIE, J. J. u. J. AICARDI (1978):
Convulsive disorders in the first year of life: neurological and mental outcome and mortality.
Epilepsia **19**, 67 - 74

CLIFFORD, D. B., J. W. OLNEY, A. MANIOTIS, R. C. COLLINS u. C. F. ZORUMSKI (1987):
The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures.
Neuroscience **23**, 953 – 968

COLE, A. (2000):
Is epilepsy a progressive disease? The neurobiological consequences of epilepsy.
Epilepsia **41**, Suppl. 2, 13 - 22

COLLABORATIVE GROUP FOR THE STUDY OF EPILEPSY (1992):
Prognosis of epilepsy in newly referred patients. A multicenter porospective study of the effects of monotherapy on the long-term course of epilepsy.
Epilepsia **33**, 45 - 51

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (1989):
Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes.
Epilepsia **30**, 389 – 399

COVOLAN, L. u. L. E. MELLO (2000):
Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus.
Epilepsy Res. **39**, 133 – 152

CRONIN, J. u. F. E. DUDEK (1988):
Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats.
Brain Res. **474**, 181 – 184

DAM, M. (1992):
Localization related epileptic syndromes.
in: M. R. TRIMBLE, T. G. BOLWIG (Hrsg.): *The temporal lobes and the limbic system*; Wrightson Biomedical Publishing, Petersfield, S. 115 - 128

DELORENZO, R. J., J. M. PELLOCK, A. R. TOWNE u. J. G. BOGGS (1995):
Epidemiology of status epilepticus.
J. Clin. Neurophysiol. **12**, 316 - 325

DOOLEY, M. u. G. L. PLOSKER (2000):
Levetiracetam. A review of ist adjunctive use in the management of partial onset seizures.
Drugs **60**, 871 - 893

EBERT, U., C. RUNDFELDT u. W. LÖSCHER (1994):
Sex differences in the anticonvulsant efficacy of phenytoin in amygdala-kindled rats.
Brain Res. **638**, 45 - 52

EBERT, U. u. W. LÖSCHER (1999):
Characterization of phenytoin-resistant kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy: influence of genetic factors.
Epilepsy Res. **33**, 217 - 226

EBERT, U., C. RUNDFELDT, H. LEHMANN u. W. LÖSCHER (1999):
Characterization of phenytoin-resistant kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy: influence of experimental and environmental factors.
Epilepsy Res. **33**, 199 - 215

ENGEL, J. Jr (1996):
Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy.
Epilepsy Res. **12**, Suppl., 9 - 20

FRENCH, J. A., P. D. WILLIAMSON, V. M. THADANI, T. M. DARCEY,
R. H. MATTSON, S. S. SPENCER u. D. D. SPENCER (1993):
Characteristics of medial lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination.
Ann. Neurol. **34**, 774 - 780

GIBBS, J. W., M. D. SHUMATE u. D. A. COULTER (1997):
Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic $GABA_A$ receptor function in dentate granule and CA1 neurons.
J. Neurophysiol. **77**, 1924 – 1938

GILLARDON, F., H. WICKERT u. M. ZIMMERMANN (1995):
Up-regulation of bax and down-regulation of bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain.
Neurosci. Lett. **192**, 85 - 88

GLÖTZNER, F. L., I. HAUBITZ, F. MILTNER, G. KAPP u. K. W. PFLUGHAUPT (1983):
Seizure prevention using carbamazepine following severe brain injuries.
Neurochirurgia **26**, 66 - 79

GODDARD, G. V., D. McINTYRE u. C. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Exp. Neurol. **25**, 295 – 330

GOLDEN, G. T., G. G. SMITH, T. N. FERRARO, P. F. REYES, J. K. KULP u. R. FARIELLO (1991):
Strain differences in convulsive response to excitotoxin kainic acid.
Neuroreport **2**, 141 - 144

GOODMAN, J.H. (1998):
Experimental models of status epilepticus.
in: S. L. PETERSON, T. E. ALBERTSON (Hrsg): *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research*; CRC Press, Boca Raton, S. 95 – 124

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. H. LOPES DA SILVA (2001):
Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fiber sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.
Eur. J. Neurosci. **13**, 657 - 669

GRANT, R. u. S. SHORVON (2000):
Efficacy and tolerability of 1000 – 4000 mg per day of levetiracetam as add-on therapy in patients with refractory epilepsy.
Epilepsy Res. **42**, 89 - 95

HALONEN, T., J. NISSINEN u. A. PITKÄNEN (2001):
Chronic elevation of brain GABA levels beginning two days after status epilepticus does not prevent epileptogenesis in rats.
Neuropharmacology **40**, 536 - 550

HARRIGAN, T., Y. R. BUREAU, M. A. PERSINGER u. G. H. PARKER (1994):
Prevention of sudden cardiac death by the atypical neuroleptic acepromazine following status epilepticus in rats.
Life Sci. **54**, 457 - 462

HART, Y. u. S. D. SHORVON (1995):
The nature of epilepsy in a general population: 1. Characteristics of patients receiving medication.
Epilepsy Res. **21**, 43 - 49

HAUSER, W. A. (1990):
Status epilepticus: epidemiologic considerations.
Neurology **40**, Suppl. 2, 9 - 13

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. R. ELVEBECK (1980):
Mortality in patients with epilepsy.
Epilepsia **21**, 399 - 412

HAUSER, W. A., S. S. RICH, J. F. ANNEGERS u. V. E. ANDERSON (1990):
Seizure recurrence after 1st unprovoked seizure: an extended follow-up.
Neurology **40**, 1163 - 1170

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1991):
Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940 – 1980.
Epilepsia **32**, 429 – 445

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1993):
The incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935 – 1984.
Epilepsia **34**, 453 - 468

HELLIER, J. L., P. R. PATRYLO, P. S. BUCKMASTER u. F. E. DUDEK (1998):
Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res. **31**, 73 – 84

HELLIER, J. L. u. F. E. DUDEK (1999):
Spontaneous motor seizures of rats with kainate-induced epilepsy: effect of time of day and activity state.
Epilepsy Res. **35**, 47 – 57

HERNANDEZ, T. D. (1997):
Preventing post-traumatic epilepsy after brain injury: weighing the costs and benefits of anticonvulsant prophylaxis.
Trends Pharmacol. Sci. **18**, 59 – 62

HERSDORFFER, D. C., G. LOGROSCINO u. G. CASCINO (1998):
Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota. 1965 – 1984.
Neurology **50**, 735 - 741

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.
Science **220**, 323 - 325

HRUSKA, R. E., L. M. LUDMER, A. PERT u. W. E. BUNNEY (1984):
Effects of lithium on ^{3}H-quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors.
J. Neurosci. Res. **11**, 171 - 177

JOPE, R. S. (1979):
Effects of lithium treatment in vivo and in vitro on acetylcholine metabolism in rat brain.
J. Neurochem. **33**, 487 - 495

JOPE, R. S., R. A. MORRISETT u. O. C. SNEAD (1986):
Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats.
Exp. Neurol. **91**, 471 - 480

JUUL-JENSEN, P. (1986):
Epidemiology of intractable epilepsy.
in: D. SCHMIDT, P. L. MORSELLI (Hrsg.): *Intractable Epilepsy: Experimental and Clinical Aspects*; Raven Press, New York, S. 5 - 11

KLEINROK, Z., S. CZUCZWAR, L. TURSKI u. A. ZARKOWSKI (1980):
Effects of intracerebroventricular injection of kainic acid on electrically and chemically induced convulsions in mice.
Pol. J. Pharmac. **32**, 265 - 269

KLITGAARD, H. (2001):
Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs?
Epilepsia **42**, Suppl. 4, 13 - 18

KLITGAARD, H., A. MATAGNE, J. VANNESTE-GOEMAERE u. D.-G. MARGINEANU (2001):
Effects of chronic administration of levetiracetam on pilocarpine-induced epileptogenesis in rats.
Epilepsia **42**, Suppl. 7, 114 - 115

KNAKE, S., F. ROSENOW, M. VESKOVI, W. H. OERTEL, H. H. MUELLER, A. WIRBATZ, N. KATSAROU u. H. M. HAMER; *Status Epilepticus Study Group Hessen (SESGH)* (2001):
Incidence of status epilepticus in adults in Germany: a prospective, population-based study.
Epilepsia **42**, 714 - 718

KOCH, M., P. K. D. PILZ u. H. U. SCHNITZLER (1998):
Mechanismen sensomotorischer Integration bei Säugetieren: Die Schreckreaktion der Ratte als Modell.
Neuroforum **4**, 260 - 266

KRAKOW, K., C. OTOUL u. J. W. A. S. SANDER (2000):
Long-term efficacy and tolerability of levetiracetam (LEV) in refractory epilepsy.
Neurology **54**, Suppl. 3, A83

LEITE, J. P. u. E. A. CAVALHEIRO (1995):
Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats.
Epilepsy Res. **20**, 93 - 104

LEMOS, T. u. E. A. CAVALHEIRO (1995):
Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats.
Exp. Brain Res. **102**, 423 - 428

LEPPIK, I. E. (1985):
Status epilepticus.
Clin. Ther. **7**, 272 - 278

LEPPIK, I. E. (1992):
Intractable epilepsy in adults.
Epilepsy Res. Suppl. **5**, 7 - 11

LEPPIK, I. E. (2001):
Issues in the treatment of epilepsy.
Epilepsia **42**, Suppl. 4, 1 - 6

LIU, Z., T. NAGAO, G. C. DESJARDINS, P. GLOOR u. M. AVOLI (1994):
Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures.
Epilepsy Res. **17**, 237 - 247

LÖSCHER, W. (1986):
Experimental models for intractable epilepsy in nonprimate animal species.
in: D. SCHMIDT, P. L. MORSELLI (Hrsg): *Intractable Epilepsy: Experimental and Clinical Aspects*; Raven Press, New York, S. 25 – 37

LÖSCHER, W. (1991):
The epileptic gerbil. Neuronal networks and actions of antiepileptic drugs.
in: C. L. FAINGOLD, G. H. FROMM (Hrsg.): *Drugs for control of epilepsy*;
CRC Press, Boca Raton, S. 309 - 323

LÖSCHER, W. (1993):
Basic aspects of epilepsy.
Curr. Op. Neur. Neurosurg. **6**, 223 - 232

LÖSCHER, W. (1994):
Neue Antiepileptika – ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Tiere?
Kleintierpraxis **2**, 325 - 342

LÖSCHER, W. (1997):
Animal models of intractable epilepsy.
Prog. Neurobiol. **53**, 239 – 258

LÖSCHER, W. (1998):
New visions in the pharmacology of anticonvulsion.
Eur. J. Pharmacol. **342**, 1 – 13

LÖSCHER, W (1999):
Animal models of epilepsy and epileptic seizures.
in: M. J. EADIE, F. J. E. VAJDA (Hrsg.): *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 138, Antiepileptic Drugs, Pharmacology and Therapeutics*; Springer Verlag, Berlin, S. 19 - 62

LÖSCHER, W., D. SCHWARTZ-PORSCHE, H.-H. FREY u. D. SCHMIDT (1985):
Evaluation of epileptic dogs as an animal model of human epilepsy.
Arzneim.-Forsch. **35**, 82 - 87

LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (1988):
Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs?
A proposal based on experimental and clinical considerations.
Epilepsy Res. **2**, 145 - 181

LÖSCHER, W. u. C. RUNDFELDT (1991):
Kindling as a model of drug-resistent partial epilepsy: selection of phenytoin-resistant and nonresistent rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **258**, 483 - 489

LÖSCHER, W., C. RUNDFELDT u. D. HÖNACK (1993):
Pharmacological characterization of phenytoin-resistent amygdala-kindled rats, a new model of drug-resistent partial epilepsy.
Epilepsy Res. **15**, 207 - 219

LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (1994):
Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random sreening and structural variation?
Epilepsy Res. **17**, 95 - 134

LÖSCHER, W., D. HÖNACK u. C. RUNDFELDT (1998a):
Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **284**, 474 – 479

LÖSCHER, W., S. CRAMER u. C. RUNDFELDT (1998b):
Selection of phenytoin responders and nonresponders in male and female amygdala-kindled Sprague-Dawley rats.
Epilepsia **39**, 1138 – 1147

LÖSCHER, W. u. D. HÖNACK (2000):
Development of tolerance during chronic treatment of kindled rats with the novel antiepileptic drug levetiracetam.
Epilepsia **41**, 1499 - 1506

LÖSCHER, W., E. REISSMÜLLER u. U. EBERT (2000):
Kindling alters the anticonvulsant efficacy of phenytoin in Wistar rats.
Epilepsy Res. **39**, 211 - 220

LONGO, B. M. u. L. E. MELLO (1999):
Effect of long-term spontaneous recurrent seizures or reinduction of status epilepticus on the development of supragranular mossy fiber sprouting.
Epilepsy Res. **36**, 233 - 241

LOTHMAN, E. W., E. H. BERTRAM, J. W. BEKENSTEIN u. J. B. PERLIN (1989):
Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics.
Epilepsy Res. **3**, 107 - 119

LOTHMAN, E. W., E. H. BERTRAM, J. KAPUR u. J. L. STRINGER (1990):
Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus.
Epilepsy Res. **6**, 110 - 118

LOWENSTEIN, D. H. u. B. K. ALLDREDGE (1993):
Status epilepticus at an urban public hospital in the 1980s.
Neurology **43**, 483 - 488

LOWENSTEIN, D. H., T. P. BLECK u. R. L. MACDONALD (1999):
It's time to revise the definition of status epilepticus.
Epilepsia **40**, 120 - 122

LUKYANETZ, E. A., V. M. SHKRYL u. P. G. KOSTYUK (2001):
Levetiracetam selctively blocks N-type calcium channels in rat isolated CA1 hippocampal neurons.
Epilepsia **42**, Suppl. 7, 96

MAGLOCZKY, Z. u. T. F. FREUND (1995):
Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield.
Neuroscience **66**, 847 - 860

MARESCAUX, C., M. VERGNES u. A. DEPAULIS (1992):
Genetic absence epilepsy in rats from strasbourg – a review.
J. Neural. Transm. **35**, 37 - 69

MATHERN, G. W., J. K. PRETORIUS u. T. L. BABB (1995a):
Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe epilepsy.
J. Neurosurg. **82**, 220 - 227

MATHERN, G. W., T. L. BABB, B. G. VICKREY, M. MELENDEZ u. J. K. PRETORIUS (1995b):
The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuronal loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy.
Brain **118**, 105 - 118

MATTHES, A. u. H. SCHNEBLE (1992):
Epilepsien: Diagnostik und Therapie für Klinik und Praxis.
5. Auflage, Thieme Verlag, New York

MAYTAL, J., S. SHINNAR, S. L. MOSHE u. L. A. ALVAREZ (1989):
Low morbidity and mortality of status epilepticus in children.
Pediatrics **83**, 323 - 331

McINTYRE, D. C., D. NATHANSON u. N. EDSON (1982):
A new model of partial status epilepticus based on kindling.
Brain Res. **250**, 53 - 63

MELLO, L. E., E. A. CAVALHEIRO, A. M. TAN, W. R. KUPFER, J. K. PRETORIUS, T. L. BABB u. D. M. FINCH (1993):
Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting.
Epilepsia **34**, 985 - 995

MELLO, L. E. u. L. COVOLAN (1996):
Sontaneous seizures preferentialy injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures.
Epilepsy Res. **26**, 123 - 129

MIKATI, M. A., G. L. HOLMES, A. CHRONOPOULOS, P. HYDE, S. THURBER, A. GATT, Z. LIU, S. WERNER u. C. E. STAFSTROM (1994):
Phenobarbital modifies seizure-related brain injury in the developing brain.
Ann. Neurol. **36**, 425 - 433

MORRISETT, R. A., R. S. JOPE u. O. C. SNEAD (1987):
Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats.
Exp. Neurol. **97**, 193 - 200

MUMFORD, H. u. J. R. WETHERELL (2001):
A simple method for measuring EEG in freely moving guines pigs.
J. Neurosci. Methods **107**, 125 - 130

NADLER, J. V. (1981):
Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy.
Life Sci. **29**, 2031 – 2042

NADLER, J. V., B. W. PERRY u. C. W. COTMAN (1978):
Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells.
Nature **271**, 676 - 677

NEDIVI, E., D. HEVRONI, D. NAOT, D. ISRAELI u. Y. CITRI (1993):
Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning.
Nature **363**, 718 - 722

NELSON, M. F., R. ZACZEK u. J. T. COYLE (1980):
Effects of sustained seizures produced by intrahippocampal injection of kainic acid on noradrenergic neurons: evidence for focal control of norepinephrine release.
J. Pharmac. Exp. Ther. **214/3**, 694 - 702

NISSINEN, J. T. u. A. PITKÄNEN (2000):
An animal model of TLE with spontaneous seizures: a new tool for testing the antiepileptic effects of new compounds.
Epilepsia **41**, Suppl. 7, 38 - 39

NISSINEN, J., T. HALONEN, E. KOIVISTO u. A. PITKÄNEN (2000):
A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat.
Epilepsy Res. **38**, 177 – 205

NOEBELS, J. L. (1979):
Analysis of inherited epilepsy using single locus mutations in mice.
Fed. Proc. **38**, 2405 - 2410

OLNEY, J. W., M. P. HONCHAR u. W. R. SHERMAN (1983):
Diazepam prevents lithium-pilocarpine neurotoxicity in rats.
Soc. Neurosci. Abstr. **9**, 401

ORMANDY, G. C., R. S. JOPE u. O. C. SNEAD (1989):
Anticonvulsant actions of MK-801 on the lithium-pilocarpine model of status epilepticus in rats.
Exp. Neurol. **106**, 172 - 180

PAXINOS, G. u. C. WATSON (1998):
The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition.
Academic Press, Sydney

PENRY, J. K., B. G. WHITE u. C. E. BRACKETT (1979):
A controlled prospective study of pharmacologic prophylaxis of posttraumatic epilepsy.
Neurology **29**, 600 - 601

PERSINGER, M. A., Y. R. BUREAU, M. KOSTAKOS, O. PEREDERY u. H. FALTER (1993):
Behaviors of rats with insidious, multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine.
Physiol. Behav. **53**, 849 - 866

PINEL, J. P. u. L. I. ROVNER (1978):
Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats.
Exp. Neurol. **58**, 190 - 202

PISA, M., P. R. SANBERG, M. E. CORCORAN u. H. C. FIBIGER (1980):
Spontaneously recurrent seizures after intracerebral injections of kainic acid in rat: a possible model of human temporal lobe epilepsy.
Brain Res. **200**, 481 - 487

PITKÄNEN, A., J. TUUNANEN u. T. HALONEN (1996):
Vigabatrin and carbamazepin have different efficacies in the prevention of status epilepticus induced neuronal damage in the hippocampus and amygdala.
Epilepsy Res. **24**, 29 - 45

PRATS, J. M. u. C. GARAIZAR (1999):
Etiology of epilepsy in adolescents.
Rev. Neurol. **28**, 32 - 35

PRIEL, M. R., N. F. DOS SANTOS u. E. A. CAVALHEIRO (1996):
Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy.
Epilepsy Res. **26**, 115 – 121

QUESNEY, L. F. (1986):
Clinical and EEG features of complex partial seizures of temporal lobe origin.
Epilepsia **27**, Suppl. 2, 27 - 45

RACINE, R. J. (1972):
Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.
Electroenceph. Clin. Neurophysiol. **32**, 281 - 294

REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999):
Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsy.
Epilepsy Res. **34**, 109 - 122

RUTH, R. E. (1981):
Kainic acid lesions of the hippocampus produced iontophoretically: the problem of distant damage.
Exp. Neurol. **76**, 508 - 527

SAGDUYU, A., S. TARLACI u. H. SIRIN (1998):
Generalized tonic-clonic status epilepticus: causes, treatment, complications and predictors of case fatality.
J. Neurol. **245**, 640 - 646

SAMREN, E. B., C. M. VAN DUIJN, S. KOCH, V. K. HIILESMAA, H. KLEPEL, A. H. BARDY, G. B. MANNAGETTA, A. W. DEICHL, E. GAILY, M. L. GRANSTROM, H. MEINARDI, D. E. GROBBEE, A. HOFMAN, D. JANZ u. D. LINDHOUT (1997):
Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy.
Epilepsia **38**, 981 - 990

SANDER, J. W. A. S. (1993):
Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review.
Epilepsia **34**, 1007 - 1016

SANKAR, R., D. H. SHIN, H. LIU, A. MAZARATI, A. PEREIRA DE VASCONCELOS u. C. G. WASTERLAIN (1998):
Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences.
J. Neurosci. **18**, 8382 - 8393

SCHIERHOUT, G. u. I. ROBERTS (1998):
Prophylactic antiepileptic agents after head injury: a systematic review.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry **64**, 108 - 112

SCHMIDT, D. (1984):
Prognosis of chronic epilepsy with complex partial seizures.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry **47**, 1274 - 1278

SCHMIDT, D. (1986):
Diagnostics and therapeutic management of intractable epilepsy.
in: D. SCHMIDT, P. L. MORSELLI (Hrsg): *Intractable Epilepsy: Experimental and Clinical Aspects*; Raven Press, New York, S. 237 – 257

SCHMIDT, D. (1993):
Epilepsien und epileptische Anfälle.
Thieme Verlag, Stuttgart

SCHWOB, J. E., T. FULLER, J. L. PRICE u. J. W. OLNEY (1980):
Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injection of kainic acid: a histological study.
Neuroscience **5**, 991 - 1014

SEYFRIED, T. N. (1979):
Audiogenic seizures in mice.
Fed. Proc. **38**, 2399 - 2404

SHIRASAKA, Y. u. C. G. WASTERLAIN (1994):
Chronic epileptogenicity following focal status epilepticus.
Brain Res. **655**, 33 - 44

SHORVON, S. D. u. E. H. REYNOLDS (1982):
Early prognosis of epilepsy.
Br. Med. J. **285**, 1699 - 1701

SHORVON, S. D., A. LOWENTHAL, D. JANZ, E. BIELEN u. P. LOISEAU; *European Levetiracetam Study Group* (2000):
Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of levetiracetam as add-on therapy in patients with refractory partial seizures.
Epilepsia **41**, 1179 - 1186

SLOVITER, R. S. (1983):
Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies.
Brain Res. Bull. **10**, 675 – 697

SLOVITER, R. S. (1991):
Permanently altered hippocampal structure, excitability and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy.
Hippocampus **1**, 41 - 46

SMITH, M. C. (1994):
Febrile seizures. Recognition and management.
Drugs **47**, 933 - 944

SO, N., L. F. QUESNEY, M. JONES-GOTMAN, A. OLIVIER u. F. ANDERMAN (1989):
Depth electrode investigations in patients with bitemporal abnormalities.
Ann. Neurol. **25**, 423 – 431

SOFIA, R. D., R. GORDON, M. GELS u. W. DIAMANTIS (1993):
Effects of felbamate and other anticonvulsant drugs in two models of status epilepticus in the rat.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **79**, 335 - 341

SPERK, G., H. LASSMANN, H. BARAN, S. KISH, F. SEITELBERGER u. O. HORNYKIEWICZ (1983):
Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes.
Neuroscience **10**, 1301 - 1315

SPERK, G., H. LASSMANN, H. BARAN, F. SEITELBERGER u. O. HORNYKIEWICZ (1985):
Kainic acid-induced seizures: dose relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes.
Brain Res. **338**, 289 - 295

SPIGELMAN, I, X. X. YAN, A. OBENAUS, E. Y. LEE, C. G. WASTERLAIN u. C. E. RIBAK (1998):
Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy.
Neuroscience **86**, 109 - 120

STAFSTROM, C. E., J. L. THOMPSON u. G. L. HOLMES (1992):
Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures.
Develop. Brain Res. **65**, 227 - 236

STEWART, L. S., L. S. LEUNG u. M. A. PERSINGER (2001):
Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity.
Epilepsy Res. **44**, 207 - 212

TAKEMOTO, T. (1978):
Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids.
in: E. G. McGEER, J. W. OLNEY, P. L. McGEER (Hrsg.): *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*; Raven Press, New York, S. 1 - 15

TAN, M. u. U. TAN (2001):
Sex difference in susceptibility to epileptic seizures in rats: importance of estrous cycle.
Int. J. Neurosci. **108**, 175 - 191

TEMKIN, N. R., S. S. DIKMEN, A. J. WILENSKY, J. KEIHM, S. CHABAL u. H. R. WINN (1990):
A randomized double-blind study of phenytoin for the prevention of posttraumatic seizures.
N. Engl. J. Med **323**, 497 - 502

TEMKIN, N. R., S.S. DIKMEN, G. D. ANDERSON, A. J. WILENSKY, M. D. HOLMES, W. COHEN, D. W. NEWELL, P. NELSON, A. AWAN u. H. R. WINN (1999):
Valproate therapy for prevention of posttraumatic seizures: a randomized trial.
J. Neurosurg. **91**, 593 – 600

THEODORE, W. H., R. J. PORTER, P. ALBERT, K. KELLEY, E. BROMFIELD, O. DEVINSKY u. S. SATO (1994):
The secondarily generalized tonic-clonic seizure: a videotype analysis.
Neurology **44**, 1403 - 1407

TOWNE, A. R., J. M. PELLOCK, D. KO u. R. J. DELORENZO (1994):
Determinants of mortality in status epilepticus.
Epilepsia **35**, 27 - 34

TURSKI, L. (1989):
Die konvulsive Wirkung von Pilocarpin bei Ratten: Pharmakologische, elektroenzephalo-graphische u. morphologische Untersuchungen zur Bedeutung zentraler cholinerger Mechanismen für die Krampfgenese.
Hrissanthi Ikonomidou, Selbstverlag, Berlin, ISBN 3-9802072-0-X

TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, M. SCHWARZ, S. J. CZUCZWAR, Z. KLEINROK u. L. TURSKI (1983):
Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study.
Behav. Brain Res. **9**, 315 - 335

TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, C. COINMBRA, M. DA PENHA BERZAGHI, C. IKONOMIDOU-TURSKI u. L. TURSKI (1987):
Only certain anticonvulsant drugs prevent seizures induced by pilocarpine.
Brain Res. **434**, 281 - 305

TURSKI, L., C. IKONOMIDOU, W. A. TURSKI, Z. A. BORTOLOTTO u. E. A. CAVALHEIRO (1989):
Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy.
Synapse **3**, 154 - 171

VANNESTE-GOEMAERE, J., H. KLITGAARD, A. MATAGNE u. D.-G. MARGINEANU (1999):
Electrophysiological and neuropathological changes resulting from pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: dependence on seizure duration.
Epilepsia **40**, Suppl. 7, 38

VERITY, C. M., E. M. ROSS u. J. GOLDING (1993):
Outcome of childhood status epilepticus and lengthy febrile convulsions: findings of national cohort study.
Br. Med. J. **307**, 225 - 228

VICEDOMINI, J. P. u. J. V. NADLER (1987):
A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways.
Exp. Neurol. **96**, 681 - 691

VOIGT, H. (1999):
Charakterisierung eines Pilocarpin-Modells für Temporallappenepilepsie mit spontan auftretenden Anfällen bei der Ratte.
Diplomarbeit, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover

WALTON, N. Y. u. D. M. TREIMAN (1988):
Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam.
Exp. Neurol. **101**, 267 - 275

WOZNIAK, D. F., G. R. STEWART, J. P. MILLER u. J. W. OLNEY (1991):
Age-related sensitivity to kainate neurotoxicity.
Exp. Neurol. **114**, 250 - 253

YABLON, S. A. (1993):
Posttraumatic seizures.
Arch. Phys. Med. Rehabil. **74**, 983 – 1001

YAFFE, K. u. D. H. LOWENSTEIN (1993):
Prognostic factors for pentobarbital therapy for refractory generalized status epilepticus.
Neurology **43**, 895 - 900

YLINEN, A., A. VALJAKKA, H. LATHTINEN, R. MIETTINEN, T. F. FREUND u. P. RIEKKINEN (1991):
Vigabatrin pre-treatment prevents hilar somatostatin cell loss and the development of interictal spiking activity following sustained stimulation of the perforant path.
Neuropeptides **19**, 205 - 211

ZUCKER, D. K., G. F. WOOTEN, E. M. LOTHMAN u. J. W. OLNEY (1981):
Neuropathological changes associated with intravenous kainic acid.
J. Neuropath. Exp. Neurol. **40**, 324

PUBLIKATIONEN

Glien, M., C. Brandt, H. Potschka, U. Ebert u. W. Löscher (2001):
Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: an improved model of epilepsy.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Supplement 363, R 94

Glien, M., C. Brandt, H. Potschka, U. Ebert, H. Voigt u. W. Löscher (2001):
Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy.
Epilepsy Research 46, 111 - 119

Glien, M., C. Brandt, H. Potschka u. W. Löscher (2001):
Anticonvulsant effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.
Epilepsia 42, Supplemente 7, 268

Brandt, C., M. Glien, H. Potschka, U. Ebert u. W. Löscher (2001):
Recurrent spontaneous seizures and brain lesions after prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.
Epilepsia 42, Supplemente 7, 232

Glien, M., C. Brandt, H. Potschka u. W. Löscher (2002):
Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.
Epilepsia 43, 350 - 357

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt *Herrn Prof. Dr. W. Löscher* für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung dieser Dissertation sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Frau Dr. H. Potschka für die freundliche und geduldige Beantwortung meiner Fragen und ihre zuverlässige wissenschaftliche und persönliche Unterstützung;

Frau C. Brandt für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, Geduld und Freundschaft;

Herrn Dr. U. Ebert für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung;

Herrn H. Voigt für die Einführung in die Technik von Video- und Beschleunigungssensor-Aufzeichnungen sowie seine Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen;

allen Angehörigen des Instituts für die freundliche Aufnahme, die stets gewährte Hilfsbereitschaft und die Beantwortung unzähliger Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Großmutter und meinem Lebensgefährten, die mir durch ihre Unterstützung die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.