

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Institut für Physiologie

**Einfluss von Levetiracetam und Topiramat auf
den intrazellulären pH-Wert und die bioelektrische Aktivität
hippocampaler CA3-Neurone
des Meerschweinchens**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Jan Thöne
aus
Gelsenkirchen
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.H. Jöckel

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Wiemann

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Udo Bonnet

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2006

Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertationsarbeit

1. Thöne, J., Leniger, T., & Wiemann, M. (2003)
Effects of topiramate on epileptiform activity of hippocampal CA3 neurons.
Eur. J. Physiol. 445, 53

2. Leniger, T., Thöne, J. & Wiemann, M. (2004)
Levetiracetam inhibits Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻-exchange of adult hippocampal CA3 neurons from guinea-pigs.
Br. J. Pharmacol. 142, 1073-1080.

3. Leniger, T., Thöne, J., Bonnet, U., Hufnagel, A. & Wiemann, M. (2004)
Topiramate modulates pH of hippocampal CA3 neurons by combined effects on carbonic anhydrase and Cl⁻/HCO₃⁻-exchange.
Br. J. Pharmacol. 142, 831-842.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	7
1.1	Entwicklung der Epileptologie	7
1.2	Definition von Epilepsie	8
1.3	Ätiologie, Einteilung und Pathophysiologie	8
1.4	Therapieindikation, Therapieansätze und Therapieziele	12
1.5	Wirkmechanismen und Anwendungsgebiete gängiger Antikonvulsiva	12
1.6	Levetiracetam	15
1.7	Topiramat	16
1.8	Regulation des intrazellulären pH-Werts in Neuronen	18
1.9	Rolle des pHi bei der Entstehung pathologischer ZNS-Prozesse	20
1.10	4-Aminopyridin im experimentellen Epilepsiemodell	21
1.11	Fragestellung	22
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Herstellung hippocampaler Gewebeschnitte	23
2.2	Chemikalien und Lösungen	24
2.3	Intrazelluläre Ableitungen und Registrierung neuronaler Aktivität	24
2.4	Messung des intrazellulären pH-Werts	25
2.5	Ammonium-Präpuls-Technik	27
2.6	Experimentelles Vorgehen	26
2.7	Datenanalyse	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Levetiracetam	30
3.1.1	Einfluss von Levetiracetam auf den intrazellulären pH-Wert hippocampaler CA3-Neurone	30

3.1.2	Einfluss von Levetiracetam auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone	32
3.2	Topiramat	35
3.2.1	Einfluss von Topiramat auf den pHi-Wert hippocampaler CA3- Neurone	35
3.2.2	Einfluss von Topiramat auf die pHi-Regulation	36
3.2.3	Einfluss von Topiramat auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone	37
4.	DISKUSSION	45
4.1	Topiramat und Levetiracetam senken den pHi-Wert und reduzieren die neuronale Aktivität	45
4.1.1	Effekte von Topiramat und Levetiracetam auf den pHi-Wert	45
4.1.2	Effekt von Topiramat und Levetiracetam auf die neuronale Aktivität	50
4.1.3	Ausbleiben eines Topiramat- und Levetiracetam-Effektes	53
5.	ZUSAMMENFASSUNG	55
6.	LITERATURVERZEICHNIS	56

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1 Entwicklung der Epileptologie

Die Bezeichnung Epilepsie stammt aus dem Griechischen (Epilambanein) und bedeutet „ergriffen“, „überwältigt“. Bereits Hippocrates befasste sich in seinem Corpus Hippocraticum mit der sog. Heiligen Krankheit (lat. Morbus sacer), jedoch ohne einen göttlichen Ursprung in Erwägung zu ziehen. Vielmehr erkannte er bereits einen Zusammenhang zwischen Erkrankung und Vererbung und sah den Ursprung des Leidens im Gehirn. Die hohe Wertschätzung, die dem Leiden auch in anderen Religionen eingeräumt wurde, hat ihre Wurzeln in der Überzeugung, dass es die Lebensfunktionen nicht etwa herabsetzt, sondern steigert und zu einem Wissen führt, das dem Gesunden verschlossen bleibt.

Der neurophysiologische Nachweis der Hypothese, dass das Gehirn der Ursprungsort epileptischer Sensationen ist, gelang Fritsch und Hitzig 1870, indem sie epileptische Ereignisse durch Reizung motorischer Großhirnareale auslösten. Die bereits im 20. Jahrhundert erzielten Erfolge der Epilepsitherapie beruhen ganz überwiegend auf einer neuropharmakologischen Behandlung. In den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts wurden darüber hinaus neurochirurgische Therapieansätze erarbeitet, die vor allem bei medikamentös nicht befriedigend zu behandelnden Epilepsien zum Einsatz kommen.

Obschon ca. 1% der Bevölkerung an Epilepsie leidet, gibt es auch heute noch Vorurteile und Ressentiments, so dass Epilepsie zum Teil als eine Form der Besessenheit missverstanden wird. Durch ein besseres Verständnis zu Grunde liegender Mechanismen sollte es gelingen, diese Vorurteile abzubauen. Neue prophylaktische und akute Therapiestrategien, seien es pharmakologische oder neurochirurgische, müssen somit entwickelt werden, um den Betroffenen eine weitgehend normale Lebensführung zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der zum Teil noch unklaren Wirkmechanismen neuer Antikonvulsiva mit dem Ziel, zur Weiterentwicklung neuer Therapiestrategien beitragen zu können.

1.2 Definition von Epilepsie

Epilepsien sind heterogene Erkrankungen des Zentralen-Nervensystems (ZNS), die maßgeblich durch anscheinend spontan rezidivierend auftretende epileptische Anfälle gekennzeichnet sind. Bei diesen Anfällen kommt es zu Verhaltens- und Befindungsstörungen. Das zerebrale elektrophysiologische Korrelat besteht in paroxysmalen Entladungen, die rhythmisch und synchron in ausreichend großen Neuronengruppen auftreten. Sowohl iktal als auch interiktal finden sich Auffälligkeiten im EEG. Die Diagnose epileptischer Anfälle wird dementsprechend auf der Grundlage typischer elektrophysiologischer Veränderungen im Oberflächen-EEG sowie der Anfallsanamnese gestellt. Anfallsanamnese und EEG-Befund sind auch die maßgebenden Parameter, nach denen die Einteilung von Epilepsien und letztendlich auch die Auswahl des in Frage kommenden Antikonvulsivums erfolgt.

1.3 Ätiologie, Einteilung und Pathophysiologie

Eine allgemein gültige Erklärung für das Auftreten aller epileptischen Phänomene existiert derzeit nicht. Sicher ist, dass sowohl genetische als auch symptomatische Ursachen eine wichtige Rolle bei der Entstehung epileptischer Anfälle spielen, so dass von einer multifaktoriell, polyätiologisch bedingten Erkrankung gesprochen werden muss.

Ätiologisch unterscheidet man kryptogene- (mutmaßlich symptomatische Epilepsien ohne Nachweis der Grundkrankheit), idiopathische- (Epilepsie aus vermuteter oder nachgewiesener genetischer Disposition) und symptomatische- (als Ausdruck einer identifizierbaren Grundkrankheit) Epilepsien. Zu symptomatischen Epilepsien kommt es z.B. posttraumatisch, postinfektiös, postoperativ oder im Rahmen von Intoxikationen, Infektionen,

Stoffwechselerkrankungen, frühkindlichen Hirnschäden, raumfordernden Prozessen, vaskulären Affektionen und degenerativen Hirnprozessen.

Prinzipiell können zwei Hauptformen der Anfalls- und Epilepsieentstehung unterschieden werden, nämlich Epilepsien fokalen Ursprungs und primär (idiopathisch) generalisierte Epilepsien (Abb.1).

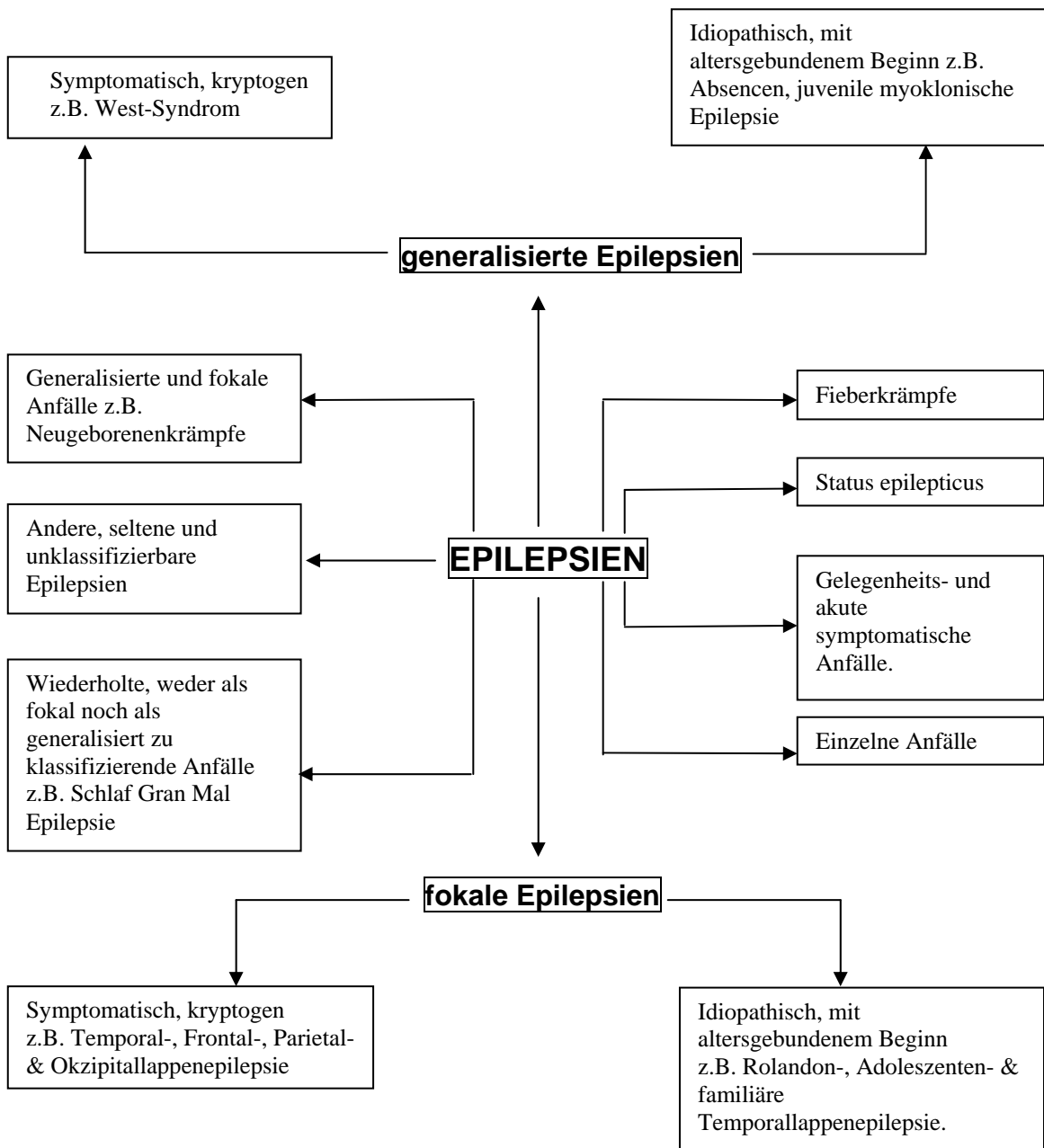


Abb.1: Vereinfachte, internationale Klassifikation der Epilepsien und Epilepsiesyndrome (nach Commission on Classification and Terminology of International League against Epilepsy, 1989).

Bei Epilepsien fokalen Ursprungs entsteht der Anfall in einer epileptogenen Schrittmacherzone und ist zumeist mit einer epileptogenen Läsion assoziiert. Von dort breitet sich der Anfall über benachbarte, synaptisch verbundene, kortikale Strukturen aus. Dieser Vorgang wird sicherlich vom Zustand der neuronalen Erregbarkeit wesentlich bestimmt. Bei den generalisierten Anfällen entstehen die Epilepsie-typischen Entladungen weitgehend synchron in beiden Hemisphären. Für ihre Entstehung werden vor allem kortiko-thalamische Interaktionen verantwortlich gemacht. Charakteristisch für das einzelne epileptische Neuron sind eine abnorme Instabilität des Membranpotentials und die damit einhergehende Neigung zu Spontanentladungen (Speckmann & Elger, 1991), z.B. durch

- Störungen spezieller Membranstrukturen
- Störungen des extra-/intrazellulären Ionenhaushalts
- Imbalanz exzitatorischer Neurotransmitter
- sowie Mangel an inhibitorischen Nervenzellfunktionen.

(Avanzini & Franceschetti, 2003)

Im Fall epileptischer Entladungen kommt es zu auffälligen Depolarisationen von bis zu 50mV Amplitude, die mehrere 100ms andauern können und zu Beginn von hochfrequenten Aktionspotentialserien überlagert sind. Dieses bioelektrische Ereignis wird nach Matsumoto & Ajmono-Marsan (1964a,b) als paroxysmale Depolarisation (PDS) bezeichnet. Bei der Entstehung einer PDS sind vor allem Calcium- und Kalium-Ströme bedeutend (Dalby & Mody, 2001). Gefolgt und begrenzt werden PDS in der Regel von einer Nachhyperpolarisation.

Bei der Entstehung epileptischer Aktivität muss aber nicht nur das einzelne Neuron, sondern vielmehr der epileptogene, synchron aktive Neuronenverband berücksichtigt werden (Connors, 1984). Normalerweise ist ein epileptogener Neuronenverband (Focus) von einem Hemmungshof umgeben, der die Ausbreitung der PDS verhindert (Prince & Wilder, 1967; Elger & Speckmann 1983). Der Hemmungshof kann jedoch überwunden werden, wenn es zu einer Reduzierung der den PDS folgenden Hyperpolarisationen kommt. Dann kann sich iktale Aktivität ausbreiten.

Der Beginn eines Anfalls wird heute durch zunehmende Synchronisierung von PDS im epileptischen Zellverband erklärt. Die Synchronisierung erfolgt dabei

vorwiegend über synaptische Effekte, die eventuell im Sinne einer positiven Rückkopplung wirken und zur Rekrutierung größerer Zellverbände führen. Die Lokalisation des primären Fokus und das Ausmaß sekundär rekrutierter Hirnregionen führen schließlich zu den Erscheinungsformen der genannten Anfallstypen, deren sensorische und motorische Fehlleistungen durch die beteiligten Neuronengruppen erklärbar sind.

Die Verminderung inhibitorischer Einflüsse kann als förderlicher Mechanismus ebenfalls zum Tragen kommen. Daher spielt zum einen der Verlust inhibitorischer Interneurone, zum anderen eine Abnahme inhibitorischer Chlorid- oder Kaliumionen vermittelter Ströme eine Rolle (Sloviter, 1987; Bernard et al., 2000).

Neben den beteiligten Nervenzellen und Nervenzellverbänden sind sicher auch Gliazellen indirekt an der Regulierung/Entstehung epileptischer Ereignisse beteiligt. Diskutiert wird die Rolle der Gliazellen vor allem beim Metabolismus/Abtransport von Neurotransmittern und bei der Pufferung von extrazellulären Kalium- und Chloridionen, die während eines epileptischen Anfalls vermehrt anfallen (Avanzini & Franceschetti, 2003).

Eine Besonderheit für die Entstehung von Anfällen stellen die medio-temporalen Strukturen des Hippocampus und der Amygdala dar. Hier kommt es möglicherweise infolge früherer Traumatisierung oder anhaltender epileptischer Entladungen zu Sekundärveränderungen, die zum Teil mit neuronalen Zelluntergängen einhergehen. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind aber auch Regenerationsmechanismen sowie eine neuronale Neogenese von Bedeutung, so dass es insgesamt zur Umgestaltung des neuronalen Netzwerks kommen kann (Avanzini & Franceschetti, 2003). Erst seit kurzem ist bekannt, dass es nach Anfällen zu einer verstärkten Regeneration von Neuronen aus Körnerzellen im Hippocampus kommt. In welchem Umfang diese in Reparaturmechanismen eingreifen und welche Rolle sie bei der Ausbildung neuronaler Verschaltung spielen können ist ungeklärt (Scharfmann, 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl pathologische Membranveränderungen, ein Mangel an Hemmechanismen, eine gestörte Erregungsbegrenzung sowie synchrone Erregungen in einem epileptisch

aktiven Neuronenverband für die Entstehung ichtaler Aktivität eines Gehirns entscheidende Parameter sind.

1.4 Therapieindikation, Therapieansätze und Therapieziele

Nach Diagnosestellung wird dem Patienten zunächst eine prophylaktische, pharmakologisch antikonvulsive Monotherapie nahegelegt. Ausgehend von der Tatsache, dass innerhalb eines Jahres mit einer Wahrscheinlichkeit von 40-50% ein weiterer Anfall auftritt, wird eine medikamentöse Therapie zumeist nach dem zweiten oder dritten Anfall begonnen. In Ausnahmefällen besteht bereits eine Therapieindikation nach dem ersten Anfall. Dies gilt z.B. bei genetischer Prädisposition in Kombination mit einer epileptogenen Veränderung im ZNS (z.B. Gefäßmalformationen, Tumorleiden, Zustand nach Encephalitis oder Hirnblutung). Das primäre Therapieziel ist die Anfallsfreiheit, bzw. eine tolerabel niedrige Anfallsfrequenz. Es kann bei ca. 60% der Patienten mit fokaler und bei ca. 80% der Patienten mit generalisierter Epilepsie erreicht werden. Erweist sich eine Epilepsie jedoch als pharmakoresistent oder ist eine effektive medikamentöse Therapie aufgrund von Arzneimittelnebenwirkungen, z.B. eine Leber- & Niereninsuffizienz, nicht durchführbar, kann ggf. die Indikation für einen epilepsiechirurgischen Eingriff oder die Implantation eines Vagusnervstimulators gegeben sein (Cascino, 2004).

Für viele Betroffene bleibt die medikamentöse Therapie jedoch unbefriedigend. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, antikonvulsive Behandlungsmöglichkeiten weiter zu erforschen und neue effektive Antikonvulsiva zu entwickeln.

1.5 Wirkmechanismen und Anwendungsgebiete gängiger Antikonvulsiva

Der Auswahl des passenden Antikonvulsivums kommt in der Epilepsitherapie eine große Bedeutung zu. Keine der augenblicklich zur Epilepsitherapie zur Verfügung stehenden Substanzen ist bei allen Anfallsformen gleich effektiv (Tab.1). Das uneinheitliche Wirkprofil beruht sicherlich auf unterschiedlichen

Epilepsieform	Antiepileptikum der 1. Wahl	Antiepileptikum der 2. Wahl	Geeignet zur Zusatztherapie
Einfach oder komplex fokale Anfälle	Carbamezepin, Oxcarbazepin	Phenytoin, Primidon, Phenobarbital, <i>Topiram</i> at, Tiagabin, <i>Levetiracetam</i>	<i>Levetiracetam</i> , <i>Topiram</i> at, Gabapentin, Tiagabin
Sekundär generalisierte Anfälle	Carbamazepin	Phenytoin, Primidon, Phenobarbital, Valproinsäure,	<i>Levetiracetam</i> , <i>Topiram</i> at, Tiagabin, Gabapentin
Grand Mal Anfälle	Valproinsäure, Phenobarbital	Carbamazepin, Lamotrigin, <i>Topiram</i> at	<i>Topiram</i> at, <i>Levetiracetam</i> ?
Status epilepticus	Diazepam	Clonazepam, Phenytoin, Thiopental Phenobarbital	
Absencen („Petit Mal“)	Valproinsäure	Ethosuximid,	
Myoklonische Anfälle	Valproinsäure Primidon	Lamotrigin, Ethosuximid,	
Atonische Anfälle	Valproinsäure	Clonazepam, <i>Topiram</i> at,	
BNS Anfälle	Valproinsäure	Vigabatin, Felbamat,	<i>Topiram</i> at
Psychomotorische Anfälle	Carbamazepin Oxcarbazepin	Clonazepam, Primidon, Phenytoin,	
Lennox-Gastaut-Syndrom	Lamotrigin	<i>Topiram</i> at	Vigabatin, Felbamat

Tab.1: Anwendungsgebiete gängiger Antiepileptika

Wirkmechanismen der einzelnen Medikamente und spiegelt gleichzeitig die Mannigfaltigkeit der oben genannten Anfallsursachen wider.

Wie in Tabelle 2 gezeigt ist, scheinen die meisten Antikonvulsiva über mehr als einen Wirkmechanismus zu verfügen. Dies gilt auch für das in dieser Arbeit eingesetzte Topiram (s.u.), während für das untersuchte Levetiracetam derzeit lediglich ein hemmender Effekt auf Na⁺-Kanäle sicher nachgewiesen wurde (s.u.).

	Na ⁺	GABA	Glutamat	T-Ca ²⁺	Serumspiegel in µg/ml
Alte Antiepileptika					
Benzodiazepine	+	++	0	0	?
Carbamazepin	++	+/-	+/-	?	4 – 12
Ethosuximid	0	0	0	+	40 – 80 (100)
Phenobarbital	+	+	+	0	10 – 40
Phenytoin	++	+/-	+/-	0	10 – 20
Valproat	++	+	+/-	0	60 – 100
Neue Antiepileptika					
Felbamat	+	+	++	?	125 – 250
Lamotrigin	++	0	+/-	0	10 – 60
Gabapentin	+/-	+	+/-	0	70 – 120
Oxcarbazepin	++	0	?	?	50 – 140
Tiagabin	?	++	?	?	50 – 250
Vigabatrin	?	++	?	?	6 – 278
Rufinamid	++	0	0	0	?
Zonisamide	+	+/-	?	?	45 – 180
<i>Levetiracetam</i>	+	-	-	-	35 – 120
<i>Topiramat</i>	+	+	+	+	15 – 60

Tab.2: Wirkmechanismen (nach Löscher und Schmidt 1994) und Serumspiegel aktueller Antikonvulsiva (nach Johannessen et al. 2003). Für Topiramat und Levetiracetam wurden die Wirkmechanismen in Anlehnung an die aktuelle Literatur ergänzt (vgl. Kapitel 1.6 & 1.7).

Abkürzungen: Na⁺ = Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle; GABA = Potenzierung GABA_{erg}-Mechanismen; Glutamat = Blockade glutamaterger Mechanismen; T-Ca²⁺ = Blockade von T-Calcium-Kanälen; +,++ = effektiv; +/- inkonsistente Daten; 0 = kein Effekt; ? = keine Daten publiziert.

1.6 Levetiracetam

Levetiracetam (LEV; Handelsname: Keppra) ist das S-Enantiomer des Ethyl-Analogons des Nootropikums Piracetam. Es gehört zur Gruppe der „neuen“ Antiepileptika und wird erfolgreich bei Patienten mit fokalen und sekundär generalisierten Epilepsien verwendet (Shorvon et al., 2000; Cereghino et al., 2000). Die Therapie wird zunächst an zwei Tagen mit 500mg/dl begonnen und bei Bedarf in mehreren Schritten auf 3000mg/d gesteigert.

Im Hinblick auf die Pharmakokinetik von Levetiracetam ist festzuhalten, dass es nach peroraler Applikation vollständig resorbiert wird und trotz guter Wasserlöslichkeit die Blut-Hirn-Schranke hinreichend gut überwindet. Die ZNS-Konzentrationen entsprechen annähernd dem Serumspiegel (Doheny et al., 1999). Maximale Plasmaspiegel sind etwa 1,3 Stunden nach oraler Einnahme erreicht. Die durchschnittliche Eliminationshalbwertszeit liegt zwischen sechs und elf Stunden. Levetiracetam wird überwiegend unverändert renal eliminiert, lediglich $\frac{1}{3}$ wird zu inaktiven Metaboliten hydrolysiert, die keine antikonvulsive Wirkung besitzen (Patsalos, 2004). Aus diesen Daten lässt sich eine für in vitro Versuche relevante Konzentration ableiten, die etwa im Bereich von 20-100 μ M liegen sollte.

In klinischen Studien konnte mit Levetiracetam sowohl als Zusatztherapeutikum, als auch als Monotherapeutikum die Anfallshäufigkeit deutlich gesenkt werden (Cereghino et al., 2000; Shorvon et al., 2000). Ebenso erwies es sich beim Lennox-Gastaut-Syndrom des Kindes als wirksam (De Los Reyes et al., 2004). Nebenwirkungen können sein: Somnolenz, Asthenie, Benommenheit und Kopfschmerzen. Selten kommt es zu einer Thrombozytopenie.

Darüberhinaus wurden mit Levetiracetam aber auch posthypoxische und postenzephalitische Myoklonien, Tics und neuropathische Schmerzen erfolgreich behandelt. Ferner wurde es zur Migräneprophylaxe sowie als Antimanikum (Spina & Perugi, 2004) eingesetzt.

Der Wirkmechanismus von Levetiracetam ist bisher nicht genau bekannt. Diskutiert werden eine Beeinflussung des GABA-Metabolismus und der GABA-

induzierten Ströme (Rigo et al., 2002; Poulain & Margineau, 2002; Margineau & Klitgaard, 2003), eine Modulation oder Hemmung von Ionenkanälen (Lukjanetz et al., 2002; Madeja et al., 2003) sowie eine Modulation der Neurotransmitterfreisetzung (Stahl, 2004). Einige Arbeiten konnten einen inhibitorischen Effekt von Levetiracetam auf Calcium-Kanäle vom N- und P/Q-Typ zeigen, während L- und T-Typ Calcium-Kanäle nicht gehemmt werden (Niespodziany et al., 2001; Zona et al., 2001; Gorji et al., 2002; Lukyanetz et al., 2003; Pisani et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass reizinduzierte Veränderungen der Genexpression im Temporallappen von Ratten durch Levetiracetam moduliert werden (Gu et al., 2004). Insgesamt scheint Levetiracetam seine antikonvulsive Wirkung eher über eine De-Synchronisation als über eine Beeinflussung der synaptischen Transmission zu entfalten (Birnstiel et al., 1997).

1.7 Topiramate

Topiramate (TPM; Handelsname: Topamax) ist ein Fructosederivat und gehört ebenfalls zur Gruppe der „neuen“ Antiepileptika. Es wird bei Patienten mit partiellen epileptischen Anfällen mit oder ohne sekundäre Generalisierung sowie generalisierten Epilepsien erfolgreich eingesetzt (Sharief et al., 1996;). Begonnen wird die Therapie mit 25-50mg/d oral und kann langsam auf 50-100mg/d gesteigert werden. Präklinische antikonvulsive Profile legen nahe, dass es vor allem die Ausbreitung der Krampfaktivität verhindert (Shank et al., 2000). Pharmakokinetisch besitzt Topiramate eine hohe Wasserlöslichkeit, kann aber dennoch Zellmembranen gut passieren (Shank et al., 2000; Dodgson, 2000). Entsprechend wird Topiramate schnell resorbiert. Die meisten Patienten erreichen innerhalb von zwei Stunden eine maximale Plasmakonzentration. Bei schwacher Bindung an Plasmaproteine (Perucca, 1996) beträgt die Bioverfügbarkeit 81-95%. Die Konzentration im ZNS beträgt ca. $\frac{1}{3}$ der Blutplasma-Konzentration und die durchschnittliche Halbwertszeit im Serum liegt bei 21 Stunden (Perucca, 1996; Shank et al., 2000). Dem entspricht eine in vitro Konzentration von ca. 10-50µM.

Ausgeschieden wird Topiramate überwiegend unmetabolisiert über die Nieren. Keiner von den bisher identifizierten Metaboliten trägt zu den antikonvulsiven Eigenschaften bei (Nortey, 1997).

In klinischen Studien konnte Topiramate bei der Monotherapie sowie als Zusatztherapeutikum die Anfallshäufigkeit deutlich senken. Auch bei Epilepsien des Kindes- und Jugendalters konnte die Wirksamkeit von Topiramate belegt werden (Mikaeloff, et al., 2003). Als Nebenwirkungen treten Effekte wie Müdigkeit, Benommenheit, Ataxie und Nervosität am häufigsten auf. Da Topiramate das Cytochrom-P450-System in der Leber stimuliert, kann die Wirksamkeit anderer Arzneimittel wie orale Kontrazeptiva, Steroide oder Digoxin herabgesetzt werden.

Abgesehen von der Epilepsitherapie hat sich Topiramate in den letzten Jahren auch zur Prophylaxe von Migräneattacken (Spina & Perugi, 2004) sowie zur Behandlung von Essstörungen, des essentiellen Tremors und der Alkoholabhängigkeit als wirksam erwiesen.

Es ist anzunehmen, dass sowohl das breite Anwendungsgebiet in der Epilepsitherapie, als auch die immer zahlreicher werdenden neuen Behandlungsindikationen Folge der multiplen und nach wie vor nicht vollständig verstandenen Wirkmechanismen des Topiramate sind. So wirkt es schwach inhibitorisch auf spannungsabhängige Na⁺-Kanäle (Zona et al., 1997; De Lorenzo et al. 2000) und hemmt „high-voltage“ aktivierte Calcium-Kanäle (Zhang et al., 2000). GABA_{erg}-Ströme und damit die GABA-vermittelte Inhibition werden verstärkt (White et al., 1997). Ferner hemmt es AMPA-Rezeptoren (ein Subtyp der Glutamat-Rezeptoren) und vermindert so AMPA-induzierte Ströme (Gibbs et al., 2000). Dieser Effekt wird unter anderem für die inhibitorischen Effekte des Topiramate verantwortlich gemacht (Angehagen et al., 2004). Diskutiert werden zudem neuroprotektive Effekte (Rigoulot et al., 2004). Das Wissen, dass exzessive Stimulation von Glutamat-Rezeptoren, neuronale Zellschäden auslöst (Lipton & Rosenberg, 1994) und das Topiramate Glutamat-Rezeptoren zu hemmen vermag, könnte diese neuroprotektiven Effekte erklären. Weiterhin ist beschrieben, dass Topiramate die Isoenzyme I-IV der Carboanhydrase hemmt (Dodgson et al., 2000). Besonders dieser Umstand führte in dieser Arbeit dazu, die Wirkung von Topiramate auf den neuronalen pH-Wert genauer zu prüfen.

1.8 Regulation des intrazellulären pH-Werts in Neuronen

Neurone weisen einen intrazellulären pH-Wert (pH_i) um $7,0 \pm 0,2$ auf. Würden sich die Protonen passiv gemäß des elektrochemischen Protonen-Gradienten über der Membran verteilen, müßte der pH_i -Wert etwa bei 6,2 liegen. Diese Differenz zeigt, dass pH_i -regulierende Mechanismen für einen Netto-Auswärtsstrom von Protonen sorgen. Der aktuelle pH_i ist stets Folge der zellulären Säureproduktion, der intrazellulärer Pufferkapazität und des transmembranösen H^+ -Fluxes. Während Säureproduktion und intrazelluläre Pufferkapazität eher gleichbleibende Größen sind, wird der Säuretransport reguliert und durch das Zusammenspiel von H^+ -exportierenden- ("Acid-Extruder") und H^+ -importierenden- ("Acid-Loader") Mechanismen bewerkstelligt. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass an diesen Mechanismen vor allem der Na^+ -abhängige transmembranöse Transport von H^+ und HCO_3^- beteiligt ist (Schwiening & Boron 1994; Baxter & Church, 1996; Chesler, 2003). Neben den neuronalen pH_i -Wert regulierenden Mechanismen kommt aber sicherlich auch den Gliazellen eine besondere Bedeutung bei der pH_i -Regulation zu. So scheint die Beseitigung extrazellulärer Säureäquivalente unter anderem eine Leistung der Gliazellen zu sein (Deitmer & Rose, 1996).

In Neuronen sind zwei Typen von Säureextrusoren beschrieben: Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) sowie Na^+ -abhängige Cl^-/HCO_3^- -Austauscher (NCHE) (Raley-Susman et al., 1991, Baxter & Church, 1996; Grichtchenko et al., 2000). Beide nutzen den einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten, um Protonen aus der Zelle, bzw. HCO_3^- im Austausch gegen Cl^- in die Zelle zu transportieren. Sowohl NHE als auch NCHE sind im neutralen Bereich aktiv und reagieren auf einen Abfall des pH_i mit einer Steigerung der Säureextrusion (Abb.2).

Der Na^+ -abhängige Cl^-/HCO_3^- -Austauscher war der erste Transporter, für den ein pH_i -Wert regulierender Effekt nachgewiesen wurde. In vielen Neuronen scheint er der wichtigste, den pH_i -Wert regulierende Mechanismus zu sein. NCHEs werden z.B. von Stilben-Derivaten (DIDS & SITS) gehemmt (Schwiening & Boron 1994; Baxter & Church, 1996).

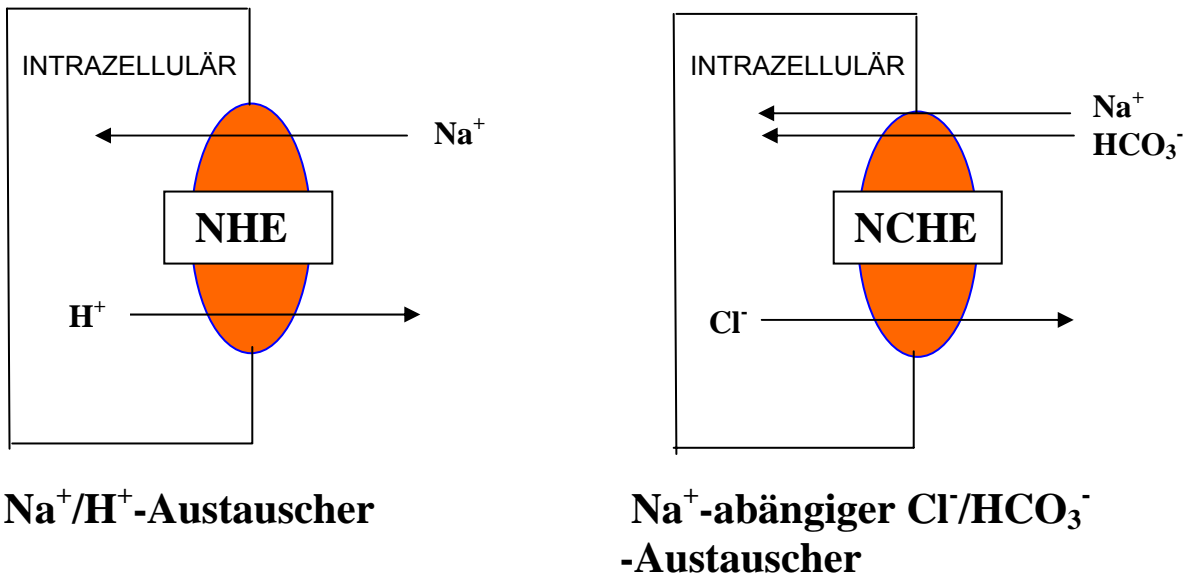


Abb.2: Schematische Darstellung des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE) und des Na⁺-abhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers (NCHE)

Desweiteren weisen Neurone noch einen Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher auf, der vor allem bei alkalischem pHi-Wert aktiviert wird und einem überschießendem pHi-Anstieg entgegen wirkt (Baxter et Church, 1996). Durch den Netto-Export von HCO₃⁻ wirkt dieser als „Acid Loader“. Wie bereits bei NCHE und NHE angeführt, spielen vermutlich auch bei diesem Austauscher „Second-Messenger“ Prozesse eine bedeutende Rolle (Brett et al., 2002).

NHEs kommen in jeder Zelle vor. Bisläng konnten 8 verschiedene NHE-Subtypen identifiziert werden (NHE1-8). Im ZNS überwiegen NHE1 und NHE5, NHE4 ist vornehmlich im Hippocampus lokalisiert, scheint aber vor allem bei hyperosmolaren Stimuli aktiviert zu werden (Bookstein et al., 1996). Zudem sind entwicklungs- und regionenspezifische Verteilungsmuster bekannt (Raley-Susman et al., 1991; Ma & Haddad, 1997; Attaphitaya et al., 1999), was das Verständnis für das Auftreten verschiedener Subtypen erschwert. Wie bei den oben genannten NCHE und NHE ist die Aktivität des Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers vor allem vom pHi und von intrazellulären „Second-Messenger“ Prozessen abhängig (Raley-Susmann et al., 1991; Baxter & Church, 1996; Bevensee et al., 1996). Ein molekularer pHi-Sensor, der zu einer

Steigerung der NHE-Aktivität führt, konnte auf einem zytoplasmatisch Abschnitt des NHE1 lokalisiert werden (Orlowski & Grinstein, 2004).

Neben der Regulation des pH_i sind NHEs auch an der Regulation des Zellvolumens beteiligt (Chesler, 2003) und werden z.T. durch „Nerv Growth Factor“ aktiviert (Orlowski & Grinstein, 2004). Dies erlaubt die Vermutung, dass NHEs auch an der Umwandlung von extra- in intrazelluläre Signale beteiligt sind.

1.9 Rolle des pH_i bei der Entstehung pathologischer ZNS-Prozesse

Die Regulation des neuronalen pH_i -Werts ist von nicht zu vernachlässigender Bedeutung für die Funktion des Nervensystems (Chesler, 2003). In Nervenzellen können Erhöhungen des pH_i zu einer gesteigerten Erregbarkeit führen, bedingt durch die Modulation von Ionenkanälen, gap-junctions und der synaptischen Transmission (Rorig et al., 1996). pH_i -Schwankungen treten bereits unter physiologischen Bedingungen z.B. als Folge gruppierter Entladungen und vermehrtem Calcium-Einstrom auf (Deitmer et Rose, 1996), sind aber im Rahmen gesteigerter neuronaler Aktivität, z.B. bei epileptischen Anfällen, sicherlich verstärkt (Trapp et al., 1996). Manche Autoren sehen in einer durch Calcium-Einstrom ausgelösten Absenkung des pH_i einen regulatorischen Mechanismus, der die Erregbarkeit von Neuronen begrenzt (Bonnet & Wiemann, 1999; Bonnet et al., 2000a; Bonnet et al., 2000b). Dies hebt die Bedeutung pH_i -Wert regulierender Mechanismen sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch pathophysiologischen Bedingungen hervor. Auch lassen mehrere Studien einen ursächlichen Effekt des pH_i auf die Entstehung von Epilepsien (Cox et al., 1997) und anderer ZNS-Erkrankungen vermuten, wie z.B. affektive Psychosen oder Panikstörungen. Neuere Befunde zum Wirkmechanismus einiger Antiepileptika legen darüberhinaus nahe, dass diese Substanzen pH_i -Wert modulierende Eigenschaften besitzen, die zu ihrem antikonvulsiven Mechanismus beitragen (Bonnet et al., 2002; Leniger et al., 2003). Aus diesem Grunde könnte ein besseres Verständnis der neuronalen pH_i -Regulation und der daran beteiligten Systeme zur Entwicklung neuer Antikonvulsiva führen.

1.10 4-Aminopyridin im experimentellen Epilepsiemodell

In dieser Arbeit wurden Substanzeffekte von Topiramate und Levetiracetam an einem Epilepsiemodell getestet, bei dem im Hippokampuschnitt epileptiforme Entladungen mittels 4-Aminopyridin (4-AP) ausgelöst wurden. Dieses Krampfgift blockiert K^+ -Kanäle und löst in vivo (Szente & Baranyi, 1987) und in vitro (Rutecki et al., 1987) epileptische Entladungen aus. Diese epileptiformen Ereignisse kommen durch eine erleichterte Neurotransmitter-Freisetzung sowohl an inhibitorischen, als auch an exzitatorischen Synapsen zustande (Rutecki et al., 1987; Perreault & Avoli, 1991). Dazu gehören auch glutamaterge Nervenendigungen (Pena & Tapia, 2000).

Es mag zunächst widersprüchlich erscheinen, dass 4-AP die GABA-induzierte Inhibition zu steigern vermag. Es wird jedoch angenommen, dass diese Steigerung GABA-induzierter IPSPs (Perreault & Avoli, 1991) mehr Zellen gleichzeitig in ein Refraktärstadium versetzt, das wiederum eine synchrone Aktivierung großer Neuronengruppen erleichtert (Babb et al., 1989). Auch depolarisierende GABA-Antworten zusammen mit einer Reduzierung der spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockade von NMDA-Rezeptoren, könnten zur Steigerung der neuronalen Erregbarkeit durch 4-AP beitragen (Perkins & Wong, 1996).

Von praktischer Bedeutung ist, dass 4-AP in geringer Konzentration zu einer gesteigerten neuronalen bioelektrischen Aktivität führt, die durch das Auftreten von besonders gleichmäßigen epileptiformen Entladungen, $GABA_{erg}$ -Hyperpolarisationen sowie normalen, in ihrer Frequenz gesteigerten Aktionspotentialen gekennzeichnet ist (Rutecki et al., 1987). Dadurch können stabile Ableitungen über einen mehrstündigen Zeitraum vorgenommen werden, was in der vorliegenden Arbeit für die Beurteilung antiepileptischer Substanzeffekte von besonderer Bedeutung war.

1.11 Fragestellung

Ausgehend von der Vorstellung, dass einige Antiepileptika die intrazelluläre Protonenkonzentration verändern und zumindest Topiramat die Carboanhydrase von Neuronen beeinflusst (Dodgson et al., 2000), sollten zunächst Effekte von Levetiracetam und Topiramat auf den neuronalen pHi-Wert untersucht werden. Um die pHi-Regulation unter dem Einfluss von Topiramat zu testen, wurde die Ammoniumpräpuls-Methode u.a. in Verbindung mit dem Carboanhydrase-Inhibitor Acetazolamid eingesetzt.

In parallelen Untersuchungen sollte die antiepileptische Wirkung von Levetiracetam bzw. Topiramat erstmals am 4-AP-Modell des Hippocampus in vitro gezeigt werden. Um die pHi-Abhängigkeit antiepileptischer Effekte von Levetiracetam und Topiramat zu testen, sollte darüberhinaus geprüft werden, ob ihre Wirkungen durch eine intrazelluläre Alkalose antagonisiert werden.

Die Ergebnisse lassen für beide Substanzen den Schluss zu, dass ihre antiepileptischen Eigenschaften zumindest teilweise auf induzierte Änderungen des neuronalen pHi zurückgehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herstellung hippocampaler Gewebeschnitte

Das Gehirn adulter Meerschweinchen (300-400g) wurde in tiefer Ether- oder Isofluran-Narkose entnommen. Beide Hippocampusformationen wurden heraus präpariert und in einen auf 4°C gekühlten Schneideblock gelegt. Anschließend wurden unter der Lupe 400–500µM dicke Gewebeschnitte (Slices) quer zur Längsachse des Hippocampus mit einer geführten, sterilisierten Rasierklinge angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden für mindestens 1 Stunde in einer 28°C warmen, CO₂/HCO₃⁻-gepufferten Salzlösung vorinkubiert, die kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast wurde. Diese Vorinkubationslösung bestand aus NaCl (124mM), KCl (3mM), CaCl₂ (0,75mM), MgSO₄ (1,3mM), KH₂PO₄ (1,25mM), NaHCO₃ (26mM) und Glucose (10mM). Der pH-Wert der Carbogen-begasteten Lösung lag zwischen 7,35-7,40.

Nach der Vorinkubation wurden die Slices in eine Kammer mit Glasboden (Volumen 4ml) überführt, die auf ein inverses Mikroskop (Zeiss, Invertoskop D) montiert war (Abb.3).

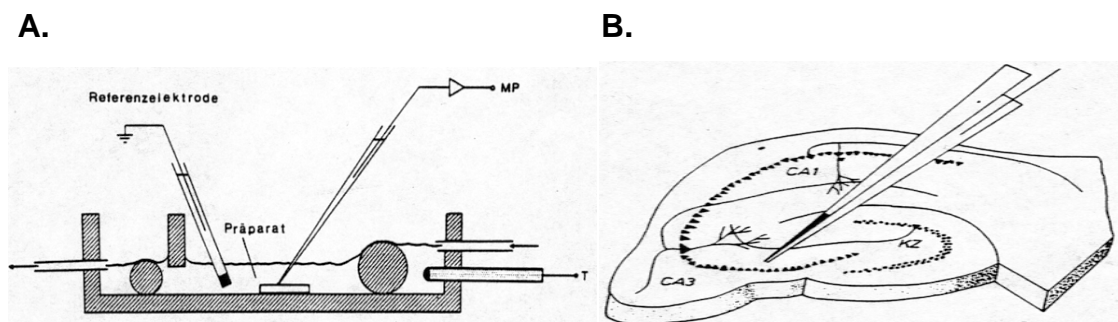


Abb.3: Schematische Darstellung eines hippocampalen Gewebeschnitts in der Experimentierkammer sowie der Position von Ableit- und Referenzelektrode.

(A) Anordnung von Slice, Mikroelektrode (MP) und Referenzelektrode in der Glaskammer. Der Slice wird während der gesamten Zeit kontinuierlich, laminar überspült. (B) Hippocampaler Gewebeschnitt, quer zur Längsachse geschnitten. CA1-, CA3- und Körnerzellregion (KZ) sind benannt. In der CA3-Region befindet sich die Mikroelektrode.

In der Kammer wurden die Slices kontinuierlich mit einer 32°C warmen Standardlösung (ACSF) überspült, deren Zusammensetzung, ausgenommen der auf 1,75 mM angehobenen CaCl_2 Konzentration (Bingmann & Speckmann; 1989), mit der Vorinkubationslösung identisch war. Die Perfusionsrate betrug ca. 4,5 ml/min und gewährleistete den Austausch der Badflüssigkeit einmal pro Minute. Die sichere Identifizierung der CA3-Pyramidenzellregion erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle.

2.2 Chemikalien und Lösungen

Standardlösung (ACSF), enthält NaCl (124mM), KCl (3mM), CaCl_2 (1,75mM), MgSO_4 (1,3mM), KH_2PO_4 (1,25mM), NaHCO_3 (26mM) und Glucose (10mM).

HEPES-Lösung ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freie ACSF) enthielt 26mM Na^+ Hepes anstatt $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$.

4-Aminopyridin (4-AP), wurde der ACSF in einer Konzentration von 50 μM zugesetzt, um epileptiforme-Aktivität auszulösen.

BCECF-AM (2',7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl-Ester; Molecular Probes, Leiden, Netherlands) wurde als frische Stammlösung in Dimethylsulfoxid gelöst (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Levetiracetam (LEV, M.W. 170,21; UCB S.A., Braine-l'Alleud, Belgium), wurde im Konzentrationsbereich von 10-500 μM verwendet.

Topiramate (TPM, M.W. 339,37; R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, Spring House, Pennsylvania, USA), wurde im Konzentrationsbereich von 25-1000 μM verwendet.

Trimethylamin (TMA, Sigma), wurde zur Verschiebung des pH_i in alkalotische Richtung bei intrazellulären Ableitungen und pH-Messungen in einer Konzentration von 5mM verwendet.

NH_4Cl (10mM), wurde im Rahmen der Ammonium-Präpuls-Technik verwendet (siehe auch 2.5).

2.3 Intrazelluläre Ableitungen und Registrierung neuronaler Aktivität

Das Membranpotential wurde von den Somata hippocampaler CA3-Neurone abgeleitet. Intrazelluläre Ableitungen wurden mit scharfen Mikroelektroden (Spitzendurchmesser $<0,5\mu\text{m}$) durchgeführt, die mit Kaliummethylsulfat (2M) gefüllt waren und einen Widerstand von 120-180M Ω aufwiesen (Bingmann & Speckmann, 1986). Gemessen wurde das Membranpotential mit einem hochohmigen Verstärker, der über eine Brückenschaltung die Injektion von Strom zur Messung des Membranwiderstands erlaubte. Das 10-fach vorverstärkte Membranpotential wurde mit einem DABAS-System (Widmann et Bingmann, 1996) zur digitalen Wandlung analoger Signale gespeichert und ausgewertet. Die Frequenz der Aktionspotentiale sowie der epileptiformen Entladungen wurden off-line bestimmt. Dazu wurde ein Trigger-Level verwendet, der etwa 40mV höher lag als das Ruhemembranpotential. Mit dieser Einstellung war es möglich, die Frequenz von Aktionspotentialen automatisch zu erfassen. Die Anzahl von Burst-Ereignissen wurde von Hand in vorgegebenen Intervallen ausgezählt.

Zur Auswertung des Levetiracetam- und Topiramateffektes wurden Durchschnittswerte der Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen Entladungen gebildet. Die Zeitspanne, die zur Berechnung der Frequenz von Aktionspotentialen und Burst vor der Applikation von Topiramate oder Levetiracetam gewählt wurde, betrug mindestens 10 Minuten. Nach Beendigung der Substanzapplikation betrug die Auswaschzeit mindestens 20 Minuten, bevor erneut Topiramate oder Levetiracetam verabreicht wurden. Vor Überführung eines neuen Gewebeschnittes in die Glaskammer wurde die gesamte Apparatur für mindestens 30 Minuten mit Standardlösung gespült.

2.4 Messung des intrazellulären pH-Wertes

Zur Messung des intrazellulären pH-Wertes wurden die hippocampalen Gewebeschnitte mit BCECF-AM in der Vorinkubationslösung gefärbt. BCECF-AM ist ein membranpermeabler Farbstoff, der durch intrazelluläre Esterasen (Abspaltung des Acetoxymethylester-Restes) in das fluoreszierende BCECF

verwandelt wird (Boyarski et al., 1996). Zur Färbung wurden Slices in einem Volumen von 2 ml Standardlösung (3,5cm Petrischale) mit 5 µl dieser Stammlösung versetzt und für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. BCECF reichert sich in Abhängigkeit von der Esterase-Aktivität einer Zelle intrazellulär an. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden in die Mikroskopierkammer überführt. Fluoreszierende CA3-Pyramidenzellen konnten anhand ihrer Lage im Stratum pyramidale (CA3-Region) sowie ihrer fluoreszierenden apikalen Dendriten identifiziert werden. Vor Beginn der Messung wurde mindestens 20 Minuten lang mit Standardlösung überspült. Temperatur und Badfluss entsprachen denen der elektrophysiologischen Experimente.

Alle pHi-Messungen wurden mit einem aufrechten Mikroskop (Olympus Bx50Wi) mit 20x oder 60x Wasserimmersions-Optik (Olympus) durchgeführt.

Für die Messung des pHi wurde die Methode des „Excitation-Ratio“ eingesetzt. Fluoreszenzbilder wurden mit wechselnden Anregungswellen (Emissionen >520nm) von einer CCD-Kamera (PTI, Surbiton, Surrey, England) alle 20 Sekunden aufgenommen. Das Licht der Wellenlänge 490nm wurde mit einem Graufilter abgeschwächt. Mittels eines CARAT-Systems (Dr. O. Ahrens, Bargteheide, Deutschland) wurde von den Originalbildern der Hintergrund, bestehend aus Eigenfluoreszenz, Streulicht und Kamerarauschen subtrahiert.

Die Intensitätswerte des Hintergrundes wurden durch gleiche Beleuchtung eines ungefärbten Präparats, oder nach komplettem Ausbleichen der BCECF-Färbung erhalten. Hintergrundkorrigierte Originalbilder wurden auf Pixel-Basis durcheinander dividiert („Ratio-Imaging“), um ein von der Farbstoffverteilung unabhängiges Maß (Ratio 440 nm/490 nm, R-Wert) zu erhalten. Das Ratio-Bild und der R-Wert ausgewählter Zellen wurden während oder nach dem Versuch berechnet. Intensitätswerte, die nur 10 Graustufen über der Hintergrundintensität lagen, wurden von der Berechnung ausgeschlossen. Verschiebungen des Bildes in X-Y-Richtung wurden durch interaktive, computergestützte Bildkorrektur ausgeglichen. Verschiebungen in der Z-Ebene wurden durch Nachfokussieren während der Messung behoben.

Spontan auftretende pH-Veränderungen bewegten sich im Bereich von +/- 0,05 pH-Einheiten. pHi-Wert-Änderungen wurden als substanzbedingt gedeutet, wenn sie 0,05 pH-Einheiten überschritten (bezogen auf den pHi-Wert 10

Minuten vor Substanzgabe) und in fester zeitlicher Relation zum Beginn und Ende der Substanzapplikation standen. Keines der verwendeten Medikamente beeinflusste das Fluoreszenzsignal oder veränderte den pH-Wert der Lösung.

2.5 Ammonium-Präpuls-Technik

Ammonium (NH_4^+) liegt bei pH 7,4 nur zu einem kleinen Teil als NH_3 vor. Durch die größere Permeabilität der Zellmembranen für NH_3 kommt es zu einer Trennung der konjugierten Pufferkomponenten. Folge einer pulsatilen Applikation von Ammonium-haltiger Standardlösung (bei unverändertem Bad pH-Wert) ist daher eine intrazelluläre Alkalose, die sich beim Auswaschen des Ammoniums (durch intrazellulär zurückbleibendes NH_4^+) in eine Azidose umkehrt (Roos & Boron, 1981) (Abb.4).

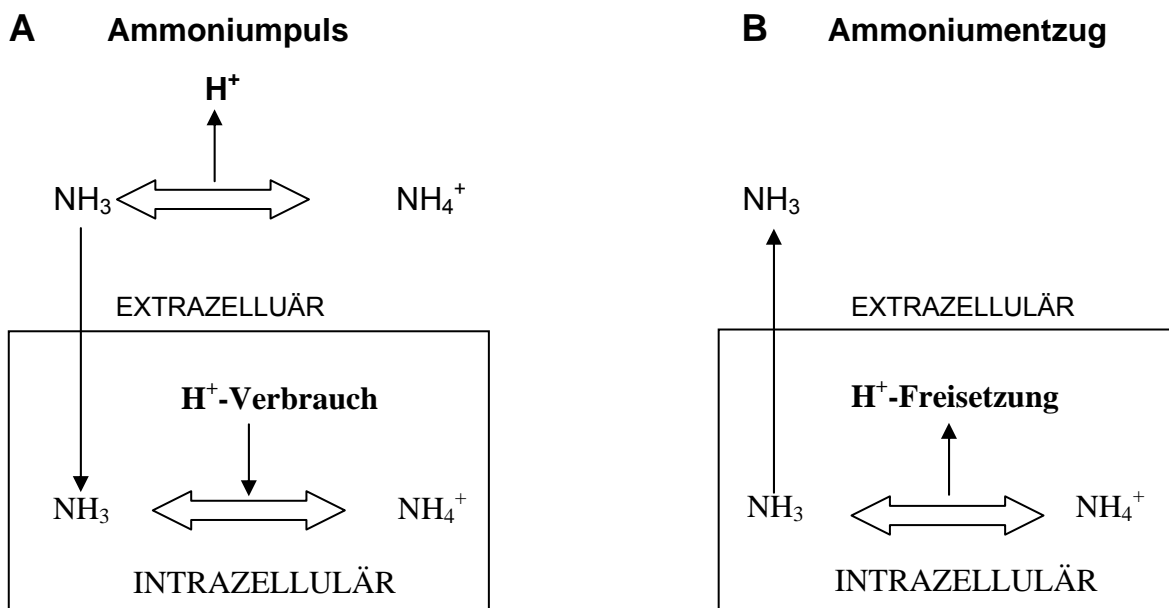


Abb.4: Ammonium-Präpuls-Technik.

(A) Einwaschen von Ammoniumchlorid: NH_3 , das im pH-abhängigen Gleichgewicht mit NH_4^+ steht, diffundiert dem Konzentrationsgradienten folgend in die Zelle, bindet dort H^+ und alkalisiert den Intrazellulärraum.

(B) Ammoniumentzug: Beim Auswaschen des Ammoniumchlorids bleibt NH_4^+ vermehrt intrazellulär zurück, da NH_3 seinem Gradienten folgend die Zelle verlässt. Freisetzung von H^+ aus NH_4^+ , führt zur intrazellulären Azidose, die mit Hilfe von Säureextrusoren (NHE, NCHE) reguliert wird, so dass sich der ursprüngliche pH-Wert wieder einstellt.

Die intrazelluläre Ansäuerung wird in der Folge vor allem durch die Aktivierung von Säure-Extrusoren gegenreguliert.

Im Austausch gegen eine äquimolare Menge NaCl wurde NH_4Cl der Standardlösung in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Die Applikationsdauer betrug zwischen 1 und 10 Minuten.

2.6 Experimentelles Vorgehen

Intrazelluläre Ableitungen: Einzelne Neurone der CA3-Region wurden mit scharfen Mikroelektroden punktiert. Etwa 30min nach Stabilisierung des Membranpotentials (≤ -50 mV) sowie der Aktionspotential-Frequenz wurde 4-AP eingewaschen, was nach etwa 10-20 Minuten die Aktionspotential-Frequenz erhöhte und zur Bildung gleichförmiger epileptiformer-Bursts sowie $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Hyperpolarisation führte. Levetiracetam oder Topiramamat wurden erst dann zusätzlich eingewaschen, wenn auch in dieser Phase eine stabile Ableitung bestand. Die Dauer der Substanzgabe lag zwischen 20 und 45 Minuten. In den meisten Experimenten wurde nur eine Substanzkonzentration geprüft, die mehrfach ein- und ausgewaschen wurde. Der Membranwiderstand wurde im Falle des Topiramamat zusätzlich vor und 10–20 Minuten nach Topiramamat-Applikation gemessen, indem hyperpolarisierende Pulse ($-0,1$ nA) von 100 ms Dauer gegeben wurden. Bei 3 Neuronen wurde mindestens 60 Minuten vor Topiramamat-Applikation die Standardlösung gegen Hepes-gepufferte, Bicarbonatfreie Lösung ausgetauscht.

In einigen Experimenten wurde Trimethylamin eingewaschen, nachdem es unter Topiramamat- oder Levetiracetam-Einfluss zur konstanten Reduzierung der bioelektrischen Aktivität gekommen war. Die Dauer der TMA-Gabe betrug 5–10 Minuten und wurde angewandt, um den Substanzeffekt durch eine gezielt vorgenommene Alkalisierung des Intrazellulärraumes zu antagonisieren.

pHi-Messungen: Vor Beginn der Messungen wurden die Gewebeschnitte für mindestens 20 Minuten mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepuffertes Lösung überspült, um freien Farbstoff (BCECF) aus dem Gewebe zu entfernen. Der Verlust von Farbstoff im Experiment (gemessen als Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Anregung

mit der pH insensitiven Wellenlänge, 440nm) betrug weniger als 0,5%/min. Die Messungen fanden in einem abgedunkelten Raum statt, um Streulicht zu vermeiden. Durch Reduktion der anregenden Lichtintensitäten von 440nm und 490nm auf ein Minimum (bei hoher Verstärkung der Kamera) waren optische Aufzeichnungen von bis zu 4 Stunden möglich. Fokuskorrekturen wurden vorgenommen, wenn die Abweichung in der Z-Achse mehr als 3 μm betrug. Bei der Durchführung der Ammonium-Präpuls-Technik wurde sorgfältig darauf geachtet, exakt gleiche Mengen von NH_4Cl (Variationsbreite <1%) zu superfundieren. Nur so war eine Vergleichbarkeit der pHi-Kurven gewährleistet. Die pHi-Rückregulation im Anschluss an die azidotische Spitze nach Ammonium-Praepuls wurde als relatives Maß der pHi-Regulation zur Messung benutzt. Im Falle des Levetiracetams wurde bei 3 Neuronen mindestens 60 Minuten vor Levetiracetam-Applikation die Standardlösung gegen Hepes-gepufferte, Bicarbonat-freie Lösung ausgetauscht.

2.7 Datenanalyse

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die Datenpunkte für die pHi-Rückregulation nach Ammonium-Präpuls wurden 10 Minuten nach der azidotischen Spitze bestimmt. Zum Vergleich der pHi-Rückregulationsrate wurde der T-Test für „paired“ Versuche verwendet. Signifikanz wurde festgelegt für einen P-Wert von $\leq 0,05$ (Statistical Package for the Social Science [SPSS] 11.0)

3. ERGEBNISSE

3.1 Levetiracetam

3.1.1 Einfluss von Levetiracetam auf den pHi-Wert hippocampaler CA3-Neurone

Zur Untersuchung des Einflusses von Levetiracetam auf den intrazellulären pH-Wert von CA3-Neuronen wurden BCECF-AM-beladene Slices verwandt und die pH-Wert abhängige Änderung des Fluoreszenz-Signals von einzelnen Neuronen des Stratum pyramidale registriert. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung betrug der gemessene pHi-Wert neuronaler Somata $7,05 \pm 0,16$ ($n=16$). Die Applikation von Levetiracetam ($50 \mu\text{M}$) erhöhte die freie H^+ -Konzentration in 8 von 11 Neuronen (Abb.5A). Im steady-state (nach 5-18 Minuten) betrug die Levetiracetam abhängige durchschnittliche Ansäuerung $0,14 \pm 0,09$ pH-Einheiten ($n=11$). Wurden die nicht auf Levetiracetam ansprechenden Neurone ("non-responder") von der Mittelwertbildung ausgeschlossen, stieg dieser Wert auf $0,19 \pm 0,07$ pH-Einheiten ($n=8$). Eine Erhöhung der Levetiracetam-Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ erbrachte keine Steigerung der intrazellulären Ansäuerung ($n=4$). In einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ war kein Effekt auf den pHi-Wert mehr messbar. Der Levetiracetam-Effekt bildete sich beim Auswaschen der Substanz innerhalb von 20-32 Minuten weitgehend zurück.

In einer weiteren Untersuchung wurden größere Areale des Stratum pyramidale mit geringer Mikroskop-Vergrößerung (20fach Objektiv) optisch analysiert. Diese Vorgehensweise erlaubte es, Substanzeffekte auf den pHi des neuronalen Gewebes zu erfassen, ohne auf einzelne Neurone zu fokussieren. Dadurch wurden Messungen auch bei Änderungen des Zellvolumens möglich. Die so erhaltenen optischen Ableitungen waren zudem durch geringes Ausbleichen und eine große Wiederholungsgenauigkeit gekennzeichnet. Levetiracetam wurde bei diesen Messungen im Konzentrationsbereich zwischen $10-50 \mu\text{mol}$ eingesetzt und verminderte in einer Konzentration von

50 μM den pHi-Wert um $0,11 \pm 0,04$ pH-Einheiten (Abb.5B). In der Abwesenheit von extrazellulärem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Hepes-gepufferte Lösung), trat keine Veränderung des pHi-Werts auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Levetiracetam eine Verminderung des neuronalen pHi-Werts bewirkt, die von extrazellulärem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gehalt abhängt.

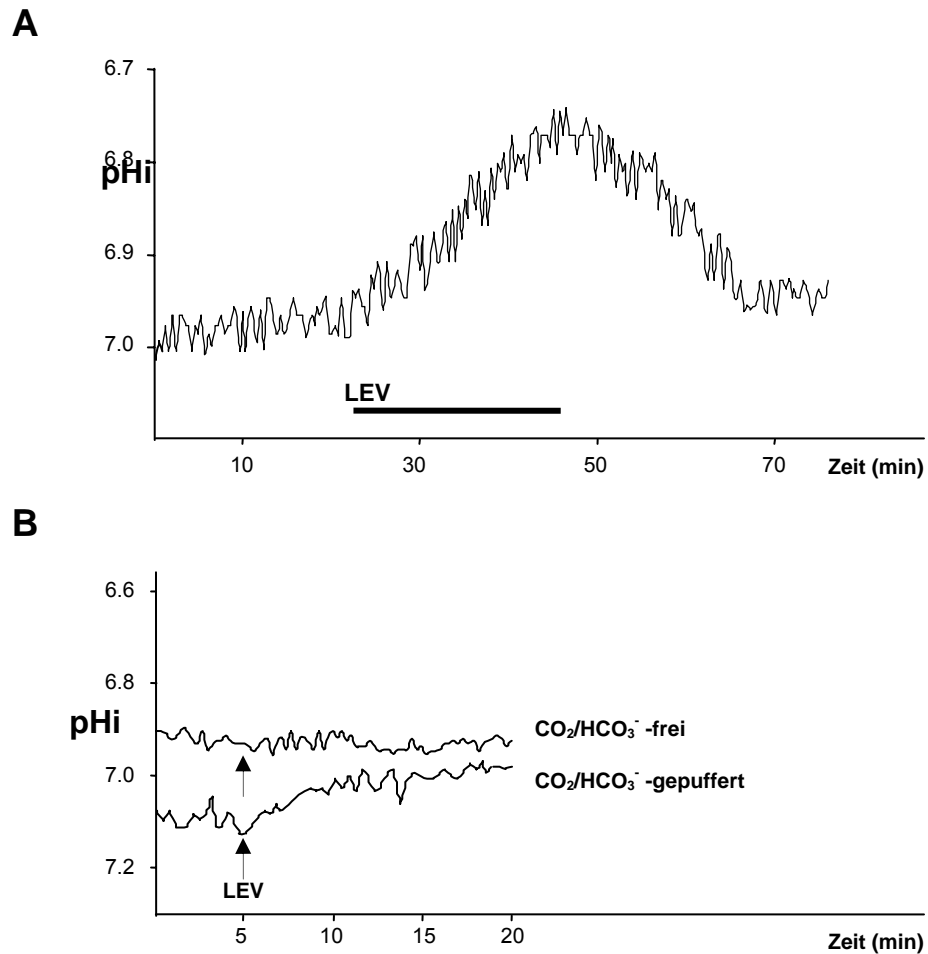


Abb.5: Einfluss von Levetiracetam auf den neuronalen steady-state-pHi.

(A) Der pHi eines BCECF-AM beladenen CA3-Neuron wurde reversibel durch Levetiracetam (50 μM) in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Lösung gesenkt. (B) Effekt von Levetiracetam (50 μM) auf den pHi gemessen im Stratum pyramidale (Die Größe der untersuchten Areale betrug ca. $200 \times 40 \mu\text{m}^2$). In Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Hepes-gepufferte, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freie Lösung) trat keine Levetiracetam-abhängige pHi-Änderung auf. Pfeile markieren den Zeitpunkt der Levetiracetam-Gabe (LEV). Die pH-Messungen stammen von zwei unterschiedlichen Slices und sind repräsentativ für jeweils fünf Experimente.

3.1.2 Einfluss von Levetiracetam auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone

Die Untersuchung des Levetiracetam-Effektes auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone wurde an 20 CA3-Neuronen von 20 verschiedenen Slices (14 Meerschweinchen) vorgenommen. Alle intrazellulären Ableitungen wurden unter kontinuierlicher Applikation von 4-AP durchgeführt, um den Einfluss von Levetiracetam auf CA3-Neurone zu untersuchen, deren bioelektrische Aktivität durch epileptiforme Entladungen, intermittierende Aktionspotentiale sowie spontan auftretende $\text{GABA}_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisationen gekennzeichnet war. Es wurden Neurone untersucht, deren Membranwiderstand zwischen 50–110 M Ω lag und ein Membranpotential von mindestens -50 mV hatten. Die Amplitude der Aktionspotentiale und der epileptiformen-Bursts war ≥ 50 mV. Die Tiefe der untersuchten Neurone in den Gewebeschnitten lag zwischen 10 und 150 μm .

In 18 der 20 CA3-Neurone konnte die bioelektrische Aktivität durch Applikation von Levetiracetam in Konzentrationen von 10-500 μM reversibel reduziert werden. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigten 10 μM (n=2), 50 μM (n=6) und 100 μM (n=2) innerhalb von 10–30 Minuten inhibitorische Effekte (Abb.6). Die statistische Auswertung des Levetiracetam-Effektes auf Aktionspotential- und epileptiforme Entladungsfrequenz (10-100 μM) zeigte, dass die Frequenz der Aktionspotentiale nach 30 minütiger Applikation um $39 \pm 9\%$ (vs. Kontrolle vor Substanzgabe) verringert war. Die Frequenz epileptiformer-Bursts nahm dabei um $48 \pm 7\%$ ab. Dieser inhibitorische Effekt auf die neuronale Aktivität war innerhalb von 7-29 Minuten nach Beginn des Auswaschens weitgehend reversibel.

Unter Levetiracetam-Applikation kam es nicht zu Veränderungen von Form oder Amplitude der Aktionspotentiale. Auch epileptiforme Depolarisationen wurden in ihrem Potentialverlauf nicht verändert (Abb.6). Ebenso traten keine Veränderungen des Membranpotentials oder Membranwiderstandes zu Tage, so dass der inhibitorische Effekt von Levetiracetam nicht auf eine Hyperpolarisation der Neurone zurückgeführt werden kann. Die gleichen Beobachtungen wurden auch im supratherapeutischen Konzentrationsbereich von 250 μM (n=2) oder 500 μM (n=3) gemacht.

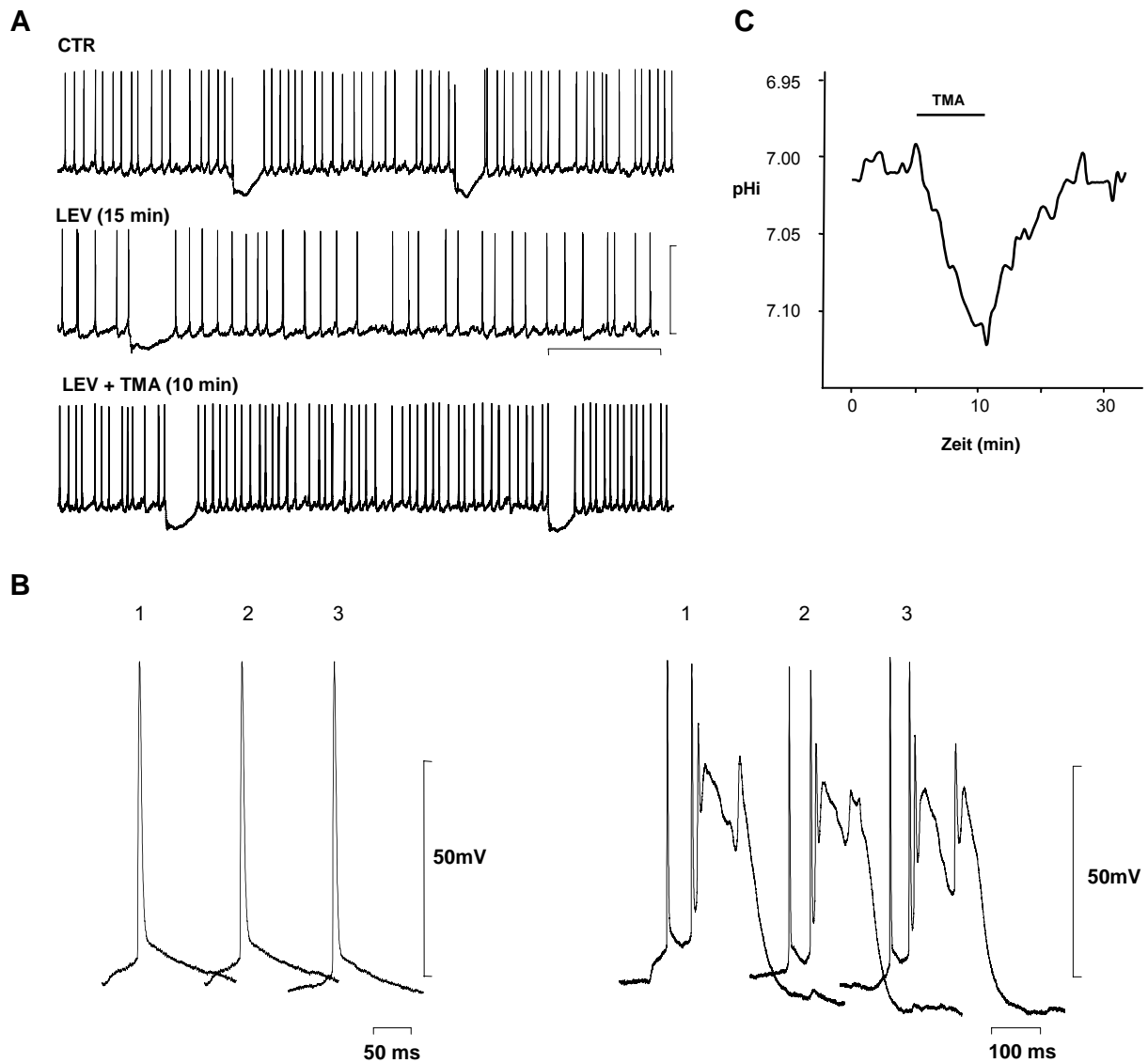


Abb. 6: Wirkung von Levetiracetam (LEV) und Trimethylamin (TMA) auf die Frequenz von Aktionspotentialen, epileptiformen-Bursts und GABA_{ergen}-Hyperpolarisationen von CA3-Neuronen. (A) Bioelektrische Aktivität unter Kontrollbedingungen (CTR) hervorgerufen durch 4-AP (50 μ M). Levetiracetam (50 μ M) reduziert die bioelektrische Aktivität nach 15 min. Levetiracetam zusammen mit 5 mM TMA (LEV+TMA) führt wieder zu einer Zunahme der bioelektrischen Aktivität nach 10 min. Das Membranpotential dieses Neurons betrug ca. -57 mV. (B) Form und Amplitude der Aktionspotentiale und epileptiformen Entladungen stellten sich nahezu identisch dar, unter Kontrollbedingungen (1), nach 15 min Levetiracetam-Behandlung (2) und nach 10 min Behandlung von Levetiracetam + TMA (3).

Bei zwei Neuronen kam es unter dem Einfluss von Levetiracetam nicht zur Änderung der bioelektrischen Aktivität. Dies konnte auch nicht durch eine verlängerte Einwaschzeit (45 min) sowie durch eine Konzentrationserhöhung auf 100 μM erreicht werden.

Unter Levetiracetam kam es sowohl im therapeutischen, als auch im supratherapeutischen Konzentrationsbereich vereinzelt zu Veränderungen der ausgeprägten $\text{GABA}_{\text{ergen}}$ -Hyperpolarisationen, die für die 4-AP-induzierte epileptiforme Aktivität kennzeichnend sind (Perreault & Avoli, 1991; Avoli et al., 1993). Diese Effekte waren jedoch hinsichtlich der Veränderung des Potentialverlaufs inkonstant. So konnten zum einen gesteigerte und zum anderen verminderte $\text{GABA}_{\text{erge}}$ -Depolarisationen unter Levetiracetam beobachtet werden (Abb.7). Die Veränderungen der Hyperpolarisationen bildeten sich nach Auswaschen von Levetiracetam zurück, so dass trotz der Variabilität des Effekts von einer Substanzwirkung ausgegangen werden muss.

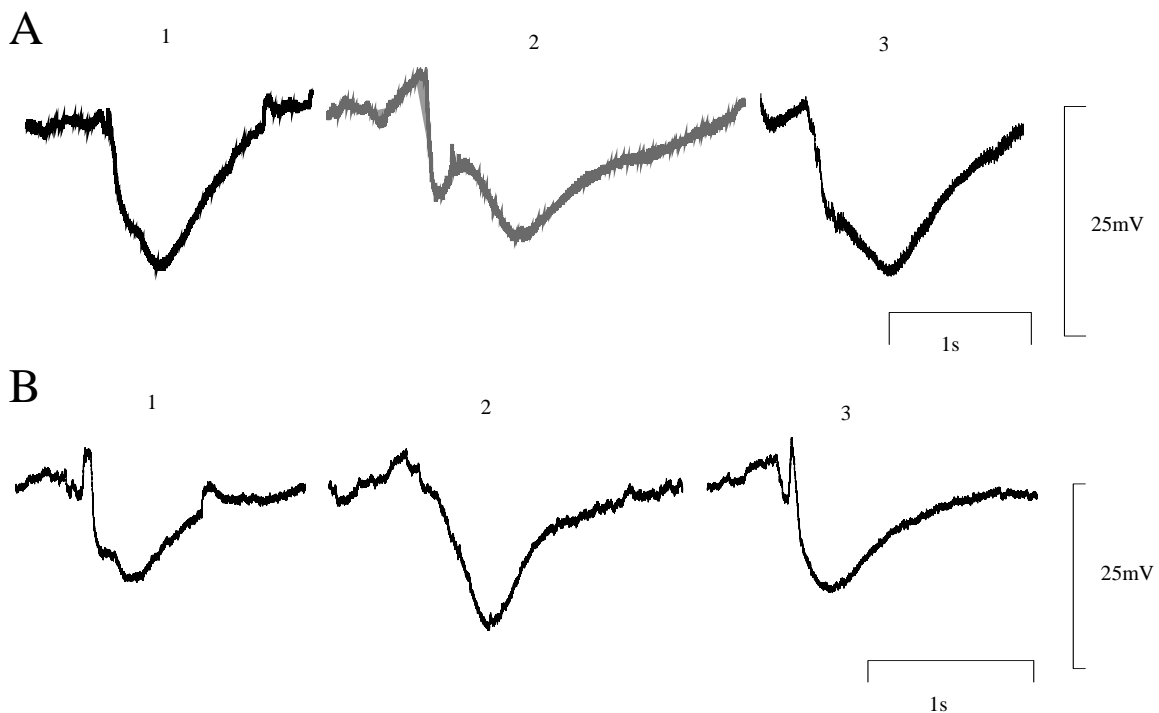


Abb.7: Einfluss von Levetiracetam auf 4-AP vermittelte $\text{GABA}_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisation.

Einfluss von Levetiracetam auf 4-AP vermittelte $\text{GABA}_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisation, unter Kontrollbedingungen (1), unter Levetiracetameinfluss (2) und nach 20 min Auswaschen (3). Ableitungen stammen von zwei unterschiedlichen Neuronen von unterschiedlichen Slices. (A) Levetiracetam (250 μM) verlängert und reduziert die Amplitude $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Hyperpolarisation. (B) Levetiracetam (250 μM) erhöht die Amplitude $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Hyperpolarisationen.

3.2 Topiramamat

3.2.1 Einfluss von Topiramamat auf den pHi-Wert hippocampaler CA3- Neurone

Intrazelluläre pH-Wert-Messungen wurden an 14 BCECF-AM beladenen Neuronen von 10 verschiedenen Slices (8 Meerschweinchen) in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung vorgenommen. Der vor Topiramamat-Gabe gemessene durchschnittliche steady-state-pHi betrug $7,03 \pm 0,18$. Topiramamat ($25\text{-}50 \mu\text{M}$) reduzierte in 10 von 14 Neuronen den pHi innerhalb von 5–10 Minuten um $0,18 \pm 0,07$ pH-Einheiten (Abb.8). In 4 Neuronen blieb der pHi nach Topiramamat-Gabe unverändert. Wurden diese auf Topiramamat nicht reagierenden Neurone („non-responder“) in die Berechnung des mittleren pHi-Werts einbezogen, sank der Wert auf $0,13 \pm 0,09$ pH-Einheiten. Der Topiramamat-Effekt war in allen Fällen reversibel. In der Regel wurde nach 20–25 Minuten wieder ein stabiler steady-state-pHi erreicht. Die gleiche Wirkung wie für $50 \mu\text{M}$ ($n=10$) konnte auch mit niedrigeren Topiramamatkonzentrationen ($25 \mu\text{M}$, $n=4$) erzielt werden (Abb.8). Die non-responder reagierten auch nach Anheben der Topiramamat-Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ und Verlängerung der Einwaschzeit nicht.

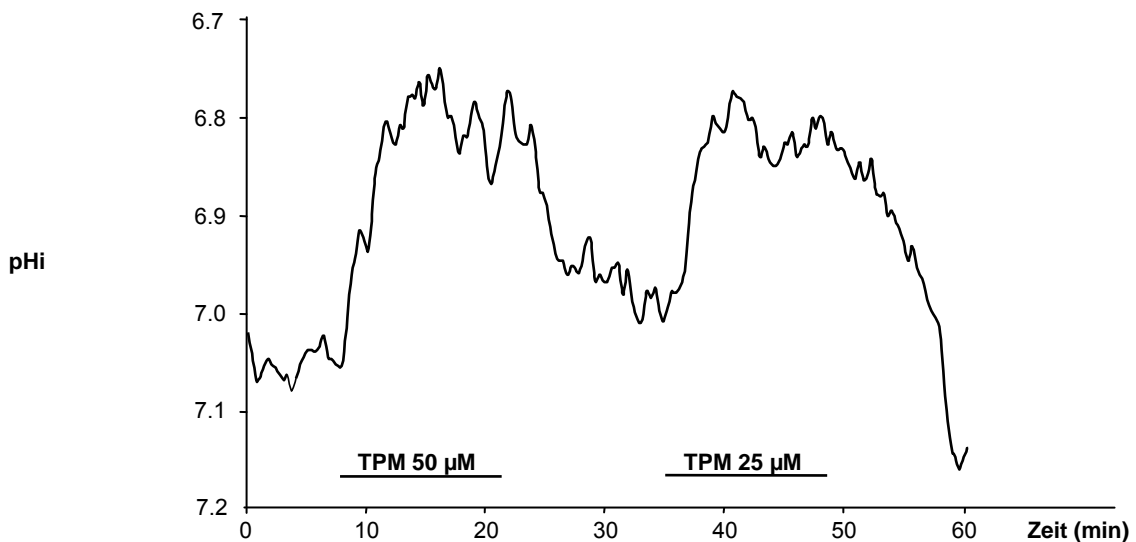


Abb.8: Effekt von Topiramamat (TPM) auf den steady-state-pHi gemessen an BCECF-AM beladenen hippocampalen CA3-Somata. Die Messung erfolgte in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung. Topiramamat ($25\text{-}50 \mu\text{M}$) senkte reversibel den pHi-Wert.

3.2.2 Einfluss von Topiramamat auf die pHi-Regulation

Versuche zum Effekt von Topiramamat auf die Regulation des pHi wurden am Stratum pyramidale mit geringer Mikroskop-Vergrößerung (20fach Objektiv) durchgeführt, um die vergleichsweise geringen Substanzeffekte besser erfassen zu können und um eine hohe Wiederholungsgenauigkeit zu gewährleisten. Die Ammonium-Präpuls-Experimente erfolgten in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung. Vergleichend wurden unter den gleichen Bedingungen Versuche mit dem Carboanhydrase-Inhibitor Azetazolamid vorgenommen. Topiramamat (50 μM ; 20 min Vorbehandlung) änderte den Verlauf des pHi. Die initiale Alkalose wurde verstärkt und die folgende Azidose war schneller ausgeprägt, während die "azidotische Spitze" nicht erreicht wurde. Die pHi-Rückregulation war teilweise gehemmt (Abb.9; n=5).

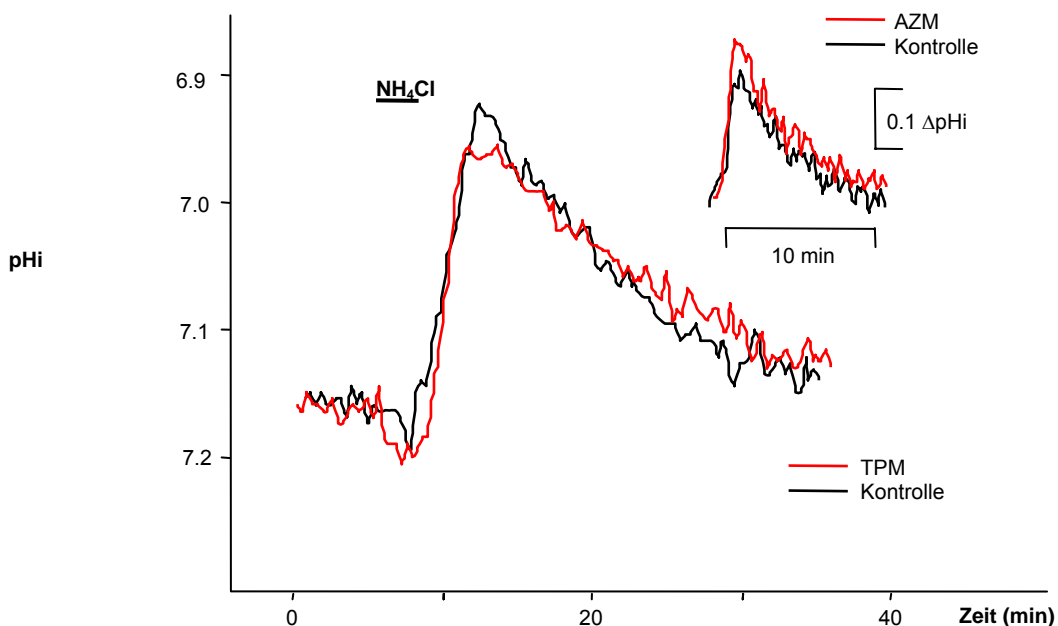


Abb.9: Effekt von Topiramamat (50 μM) auf die pHi-Regulation hippocampaler CA3-Neurone. Superposition zweier pHi-Verläufe gemessen am selben Gewebeabschnitt nach konsekutiven Ammonium-Präpuls (NH₄Cl 20 mM, 3 min). Im Vergleich zur Kontrolle (schwarze Linie) kam es unter Topiramamat (rote Linie) zu einer Betonung der initialen Alkalose (reduzierten Pufferkapazität), einer Verminderung der "azidotischen Spitze" und einer verminderten pHi-Rückregulation. Topiramamat wurde 20 min vor Versuchsbeginn eingewaschen; die Zeit zwischen den beiden NH₄Cl Pulsen betrug 40 min. Der Ausgangs pHi-Wert betrug 7,15 (Kontrolle), bzw. 7,09 (Topiramamat). Unter gleichen Bedingungen verursachte Acetazolamid (0,5 mM, kleine Abbildung, rote Linie) eine Überhöhung der "azidotischen Spitze" und eine im Anfangsteil beschleunigte pHi-Rückregulation. Der Anfangs pHi-Wert betrug 7,05.

Wurde der gleiche Versuch unter dem Einfluss von Acetazolamid (0,5 mM) durchgeführt, so kam es zu Effekten, die insgesamt auf eine Abnahme der Pufferkapazität deuteten: Abweichend vom Topiramamat-Effekt verursachte Acetazolamid eine Überhöhung der "azidotischen Spitze" und beschleunigte die pHi-Rückregulation (Abb.9; n=5).

Die Effekte von Topiramamat zeigen, dass Topiramamat die pHi-Regulation in einer komplexen Weise beeinflusst, die nicht mit einer Hemmung der Carboanhydrase zu erklären ist.

3.2.3 Einfluss von Topiramamat auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone

Die elektrophysiologischen Effekte von Topiramamat auf die neuronale Aktivität hippocampaler CA3-Neurone wurden an 34 CA3-Neuronen von 34 verschiedenen Slices (24 Meerschweinchen) durchgeführt. Die Neurone in der CA3-Region, von denen mit scharfen Mikroelektroden abgeleitet wurde, lagen in einer Tiefe von 9 bis 150 μm . Bei der Auswahl der Neurone galten die gleichen Kriterien wie unter Punkt 3.1.2 für Levetiracetam beschrieben.

32 Ableitungen erfolgten unter kontinuierlicher Gabe von 4-AP. 29 Neurone dieser Ableitungen wurden während der gesamten Versuchszeit mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Standardlösung überspült, bei 3 Neuronen wurde mindestens 60 Minuten vor Topiramamat-Applikation die Standardlösung gegen Hepes-gepufferte, Bicarbonat-freie Lösung ausgetauscht. Der Wechsel von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter zu Hepes-gepufferter Lösung verursachte eine Abnahme der 4-AP bedingten Hyperexzitation (Bonnet et al., 1998). Die bioelektrische Aktivität dieser 3 Neurone war jedoch weiterhin ausreichend, um den Einfluss von Topiramamat auch unter diesen Bedingungen zu untersuchen.

In 20 Ableitungen wurde Topiramamat in einer Konzentration von 25 oder 50 μM in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung verabreicht. Es zeigte sich, dass Topiramamat die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen-Bursts in 16 der 20 Neurone reduzierte (Abb.10). Der inhibitorische Effekt auf Aktionspotentiale und epileptiforme Entladungen fand innerhalb von 10–15 Minuten statt. Bei einzelnen Neuronen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der

Konzentration vor allem zu einer beschleunigten Inhibition führte, ohne dass eine qualitative Änderung des Effektes eintrat. Da die Verminderung der bioelektrischen Aktivität unabhängig davon war, ob Topiramat in niedriger Konzentration (25 μM) oder hoher Konzentration (50 μM) verabreicht wurde, wurden die Daten aus beiden Gruppen zusammen ausgewertet. Die statistische Auswertung ergab, dass die Frequenz von Aktionspotentialen bzw. epileptiformen Ereignissen unter dem Einfluss von Topiramat um durchschnittlich $46.1 \pm 13.4\%$ und $48.9 \pm 15.3\%$ vermindert war ($n=13$). Für die Berechnung diente jeweils ein 10 min Intervall direkt vor Substanzgabe als Bezugswert. Alle Topiramat-Effekte bildeten sich innerhalb von 5–15 Minuten nach Beginn des Auswaschens zurück.

In 4 Neuronen stellte sich keine Verminderung der Frequenz von Aktionspotentialen und Bursts ein. Dies war auch dann nicht der Fall, wenn die Einwaschzeit auf 45 Minuten verlängert und/oder die Konzentration auf 500 μM erhöht wurde. In keiner der Ableitungen waren wesentliche Veränderungen des Membranpotentials oder des Membranwiderstandes ersichtlich (Abb.10A). Ebenso konnten weder Veränderungen der Amplitude, noch der Form von Aktionspotentialen und/oder der epileptiformen Entladungen beobachtet werden (Abb.10A/C). Unter Hepes-gepufferten Bedingungen ($n=3$) blieb die Topiramat-induzierte Hemmung der bioelektrischen Aktivität aus (Abb.10C). Auch hier änderten sich Membranwiderstand oder Membranpotential unter der Substanz nicht. Im Konzentrationsbereich zwischen 25-50 μM kam es nicht zu einer Beeinflussung der 4-AP induzierten GABA_{erg} -Hyperpolarisationen. Dies trifft sowohl auf $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferte, als auch auf Hepes-gepufferte Neurone zu.

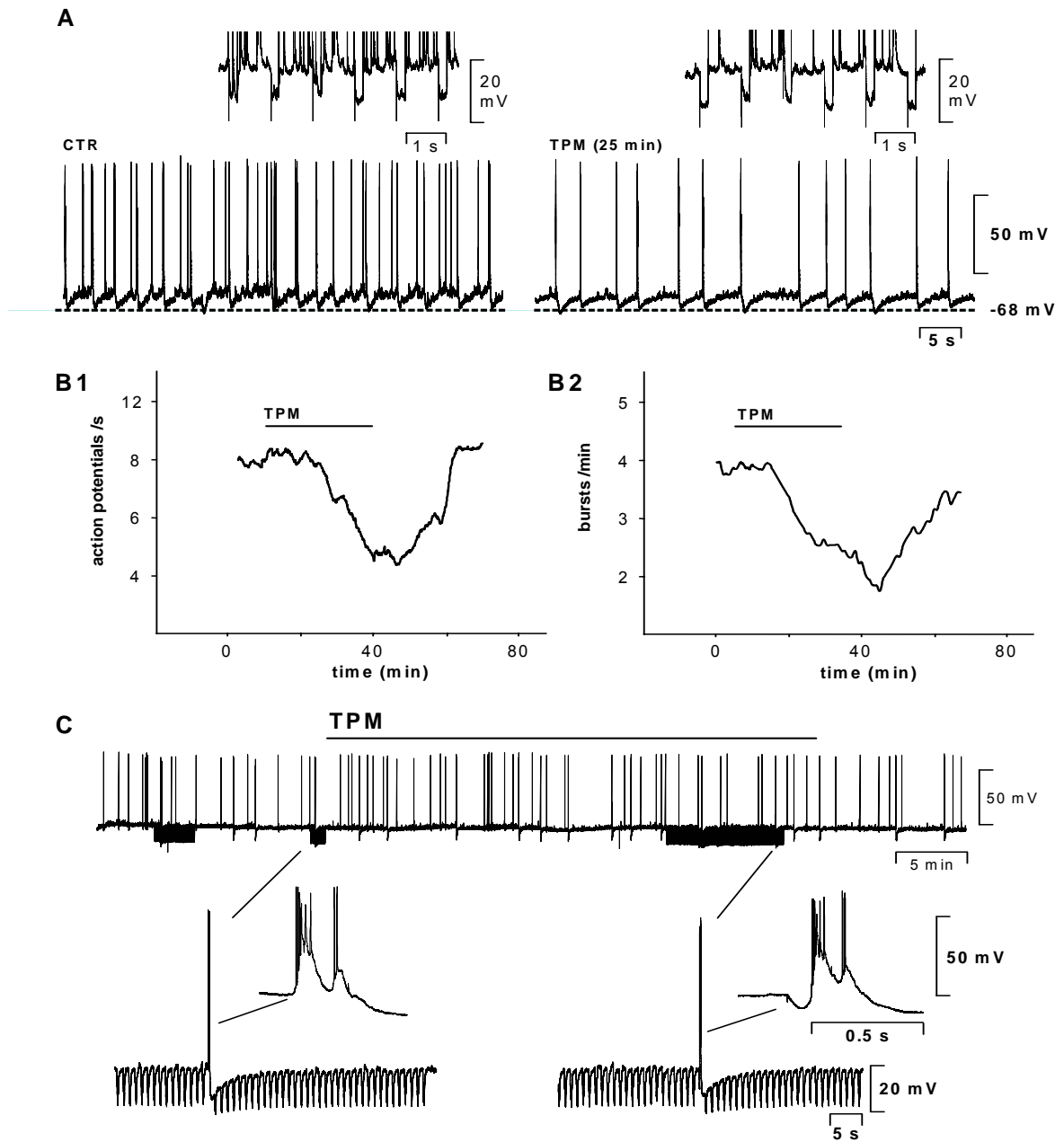


Abb. 10: Effekt von Topiramat (TPM, 50 μM) auf das Membranpotential von 4-AP-behandelten Neuronen. (A) Die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen-Bursts wurde durch Topiramat reduziert. Änderungen des Membranpotentials oder Membranwiderstandes (obere Darstellung anderes Neuron (current pulses: -0.1 nA, 200 ms) traten nicht auf. B1 and B2 zeigen numerische Auswertungen des Topiramat-Effektes (50 μM) auf die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen Ereignissen. (C) Fehlender Einfluss von Topiramat auf CA3-Neurone in Abwesenheit von extrazellulärem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (2 h vorbehandelt mit Hepes-gepufferter Lösung). Membranpotential und Membranwiderstand (Strominjektion: -0.1 nA, 200 ms), sowie Form und Amplitude der epileptiformen Bursts sind ebenfalls unverändert.

Wie zuvor für Levetiracetam beschrieben (3.2) wurde auch für Topiramamat versucht, die intrazelluläre Azidose bzw. den inhibitorischen Effekt von Topiramamat durch Gabe von TMA zu antagonisieren (n=3). TMA (5 mM) erhöht den pHi-Wert innerhalb von 3-5 Minuten um 0,1–0,15 pH-Einheiten (Abb.11C). In Anwesenheit von Topiramamat führte diese Behandlung nach 6-8 Minuten zu einem Anstieg der Aktionspotential- und epileptiformen-Burst-Frequenz. Das Muster der bioelektrischen Aktivität nach TMA-Applikation entsprach dabei weitgehend dem Entladungsmuster, das vor der jeweiligen Topiramamat-Gabe registriert wurde (Abb.11A). Veränderung des Membranwiderstandes, des Membranpotentials, sowie von Amplitude und Potentialverlauf der Aktionspotentiale oder epileptiformen Entladungen traten nicht auf (Abb.11B). Alle Beobachtungen trafen in gleicher Weise zu, wenn sehr hohe Topiramamat-Konzentrationen (500 μ M) verwendet wurden (n=2, Abb.12). Es ist daher unwahrscheinlich, dass TMA lediglich mit Topiramamat um dessen Bindungsstellen konkurriert. Aufgrund der zeitlichen Übereinstimmung zwischen TMA-Gabe und Anstieg der bioelektrischen Aktivität lässt sich auch in diesem Fall folgern, dass der hemmende Effekt des Levetiracetams durch eine TMA-induzierte Alkalose aufgehoben wurde.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zum Topiramamat lassen insgesamt vermuten, dass eine intrazelluläre Ansäuerung zu den antikonvulsiven Eigenschaften des Topiramamat beiträgt und dass der daran beteiligte Mechanismus Bicarbonat-abhängig ist.

Um einen möglichen Einfluss von Topiramamat auf Amplitude und Form von Aktionspotentialen und epileptiformen Entladungen genauer zu untersuchen, wurde Topiramamat bei 11 Experimenten auch in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt (250 μ M (n=2), 500 μ M (n=4) und 1000 μ M (n=3)). Zwei Versuche (mit je 500 und 1000 μ M) wurden dabei ohne 4-AP-Zusatz vorgenommen. Durchgeführt wurden die Versuche vor allem deswegen, da für Topiramamat hemmende Effekte auf Ionenkanäle beschrieben sind, die sich in einer Veränderung von Form und Amplitude der Aktionspotentiale und epileptiformen Ereignisse zeigen könnten. Die Aktionspotentiale und epileptiformen-Bursts änderten sich unter dem Einfluss hoher Konzentrationen jedoch nicht (Abb.13A,B). Das traf auch auf die zwei Ableitungen zu, bei denen auf die Gabe von 4-AP verzichtet wurde (Abb.13C).

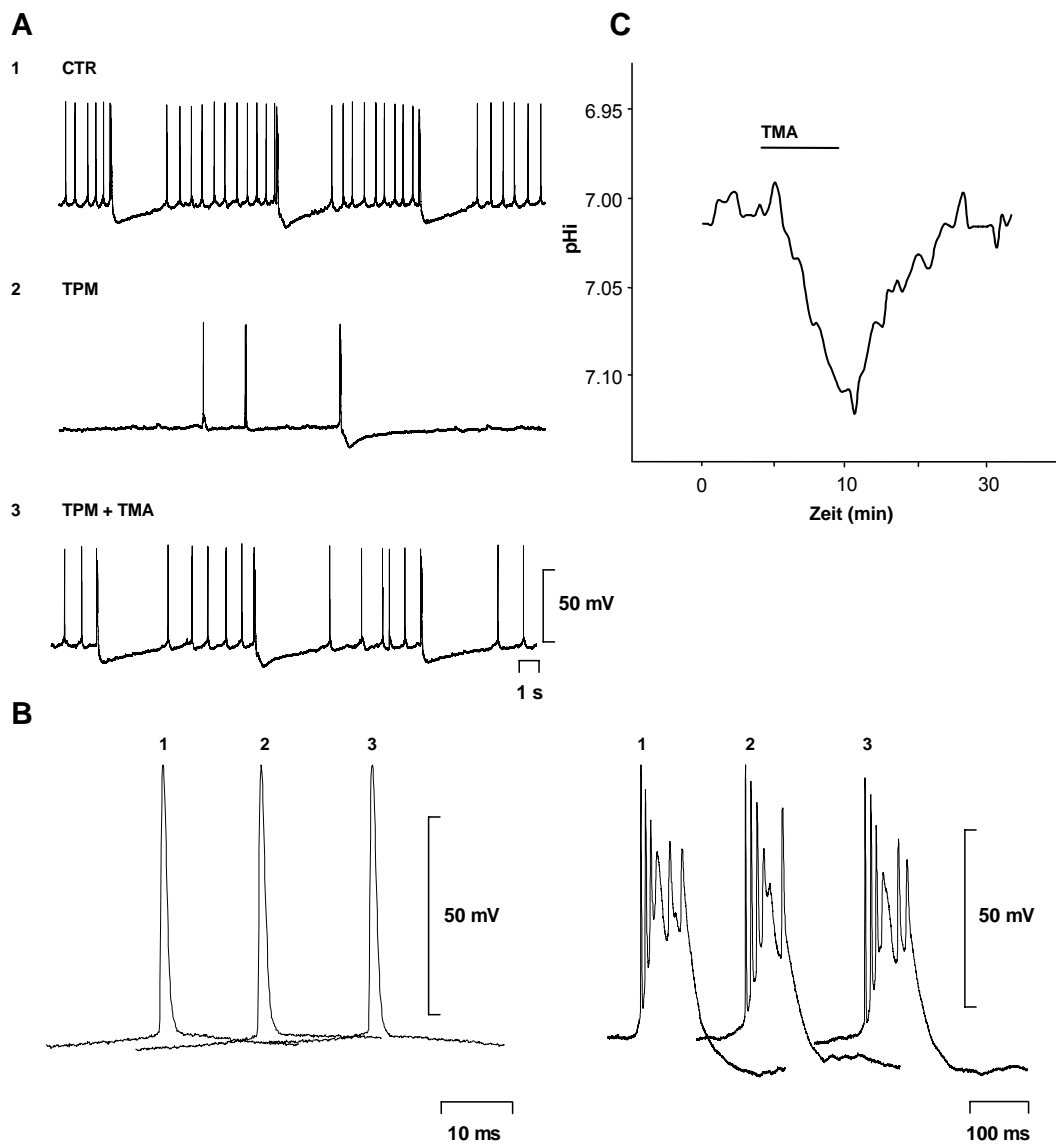


Abb. 11: Einfluss von TMA auf die Topiramat-induzierte Hemmung der bioelektrischen Aktivität. Der inhibitorische Effekt von Topiramat (50 μ M) auf die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen-Burst (ausgelöst bei einem CA3-Neuron durch 50 μ M 4-AP) wurde durch eine TMA-induzierte (5 mM) Alkalose antagonisiert. (A) Bioelektrische Aktivität unter Kontrollbedingungen (1), nach 20 min Topiramat (2), und nach 10 min Topiramat + TMA (3). (B) Aktionspotentiale and typische epileptiforme Entladungen (1, Kontrollbedingungen) bleiben unter Topiramat-induzierter Inhibition (2) oder nach Kombination mit TMA (3) unverändert. (C) TMA (5 mM) erhöht reversibel den pH_i, gemessen in einem CA3-Somata (in CO₂/HCO₃⁻-gepufferter Lösung, n=3).

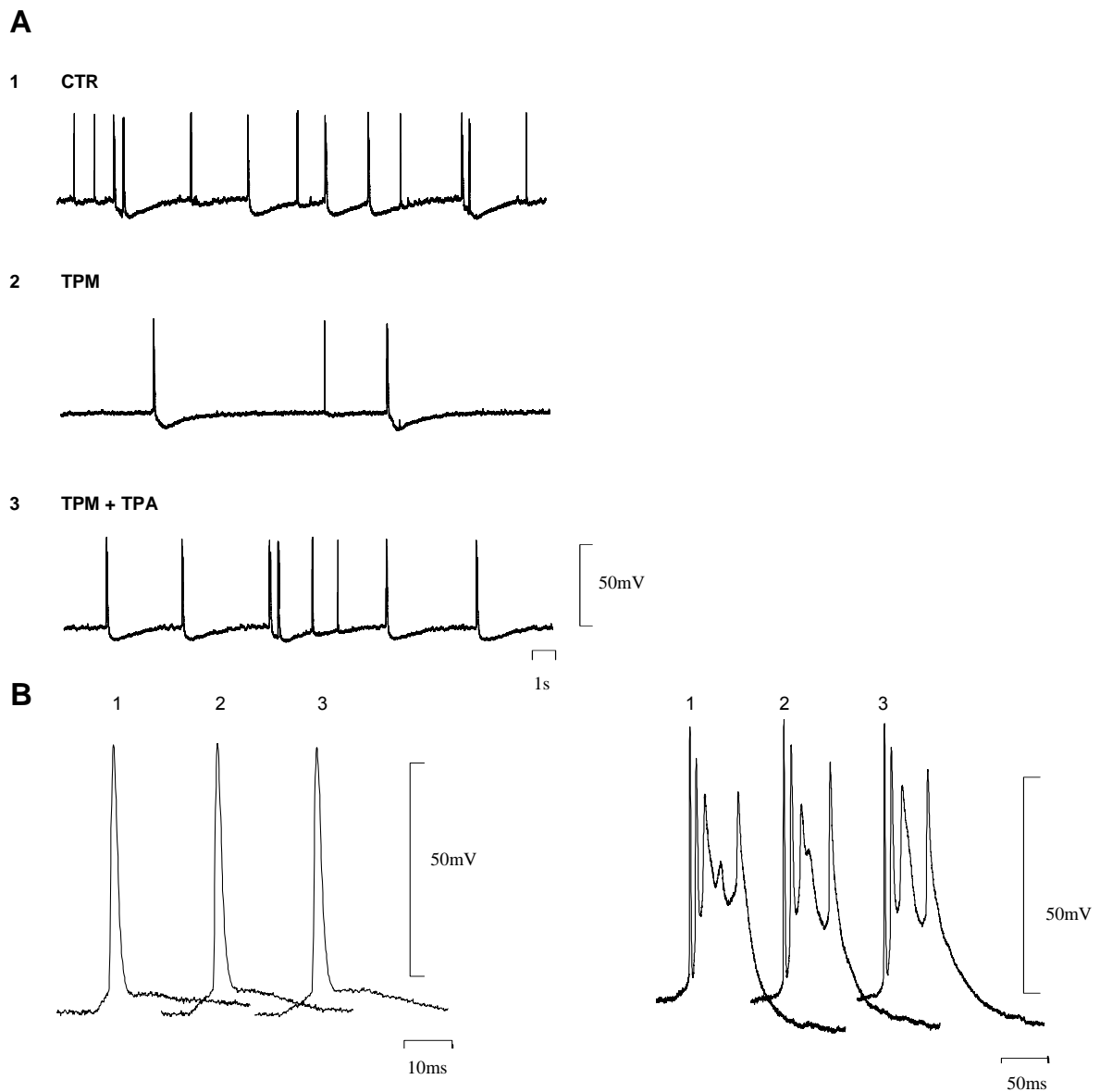


Abb.12: Einfluss von TMA auf die Hemmung der bioelektrischen Aktivität durch eine *hohe* Topiramate-Konzentration. In Übereinstimmung mit Abb.11 kann der inhibitorische Effekt von Topiramate (500 μ M) auf die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen-Burst (4-AP-behandelter Slice) durch 5 mM TMA antagonisiert werden. (A) Bioelektrische Aktivität unter Kontrollbedingungen (1), nach 25 min Topiramate (2), und nach 8 min Topiramate + TMA (3). (B) Aktionspotentiale und typische epileptiforme-Entladungen (1, Kontrollbedingungen) bleiben unter Topiramate-induzierter Inhibition (2) oder nach Kombination mit TMA (3) unverändert.

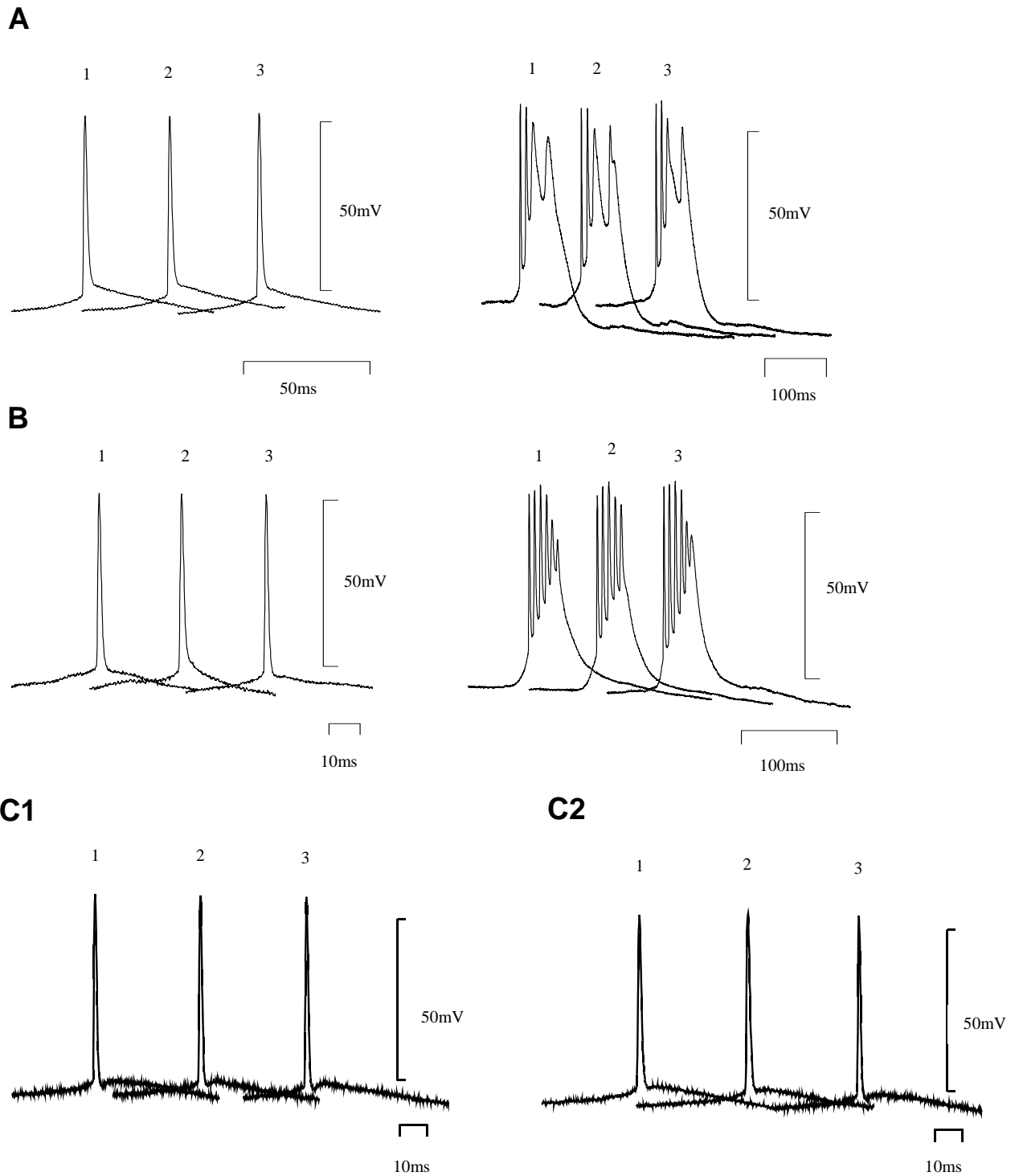


Abb.13: Fehlender Effekt von Topiramate auf Aktionspotentiale und 4-AP induzierte epileptiforme Entladungen.

(A) 250 μ M, (B) 500 μ M, (C) 500 μ M (links) und 1000 μ M Topiramate (rechts). In (A) und (B) zeigen 1, 2 und 3 jeweils die Potentiale vor, während (15 min nach Substanzgabe) und nach Auswaschen von Topiramate. Bei allen Neuronen erfolgte eine Topiramate-bedingte Inhibition der Burst- bzw. AP-Frequenz (nicht gezeigt). (C) zeigt Aktionspotentiale ohne 4-AP Behandlung (C1=500 μ M; C2=1 mM).

Ähnlich wie oben für Levetiracetam beschrieben, kam es vereinzelt zu Veränderungen der unter 4-AP auftretenden GABA_{erg}-Hyperpolarisationen. Wiederum wurden sowohl Verlängerungen (Abb.14A) als auch Verminderungen der Amplituden gefunden (Abb.14B). Alle Änderungen waren reversibel und wurden daher als Substanzeffekt gedeutet.

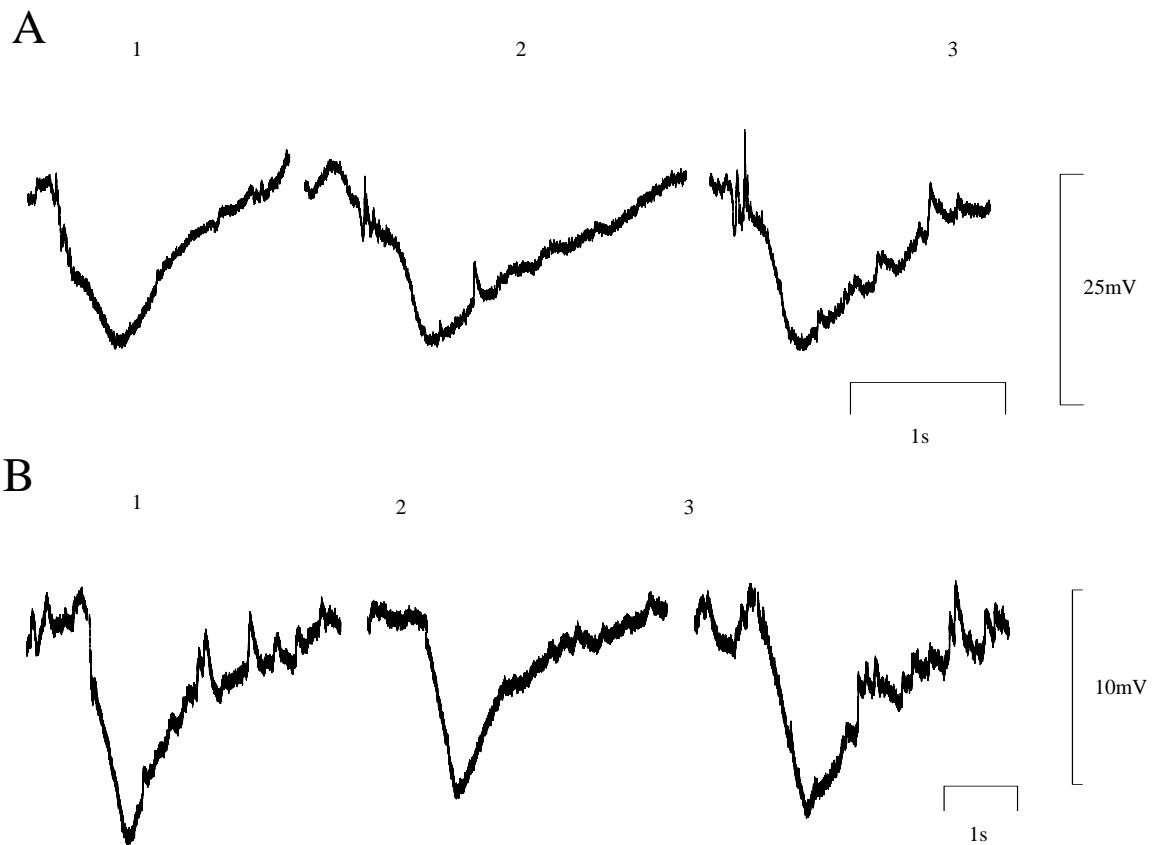


Abb. 14: Topiramate-induzierte Veränderungen 4-AP-bedingter GABA_{erg}-Hyperpolarisationen. Typische Potentiale unter Kontrollbedingungen (1), unter Topiramate-Einfluss (2) und 20 min nach Auswaschen von Topiramate (3). A und B stammen von unterschiedlichen Slices. (A) Topiramate (250 μM) verlängerte die Dauer; (B) Topiramate (500 μM) reduziert die Amplitude der Hyperpolarisationen.

4. Diskussion

4.1 Topiramat und Levetiracetam senken den pHi und reduzieren die neuronale Aktivität

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Topiramat als auch Levetiracetam den intrazellulären pH-Wert und die bioelektrische Aktivität hippocampaler CA3-Neurone reversibel senken. Gemeinsam war ihnen weiterhin, dass sie zu keiner Änderung der Form oder Amplitude von Aktionspotentialen oder epileptiformen Entladungen führten und dass die inhibitorische Wirkung in beiden Fällen durch eine gezielt vorgenommene Alkalisierung des Intrazellularraumes mit Trimethylamin antagonisiert werden konnte. Für beide Substanzen wurden Effekte bei Verwendung therapeutischer Konzentrationen erzielt und änderten sich auch bei höheren Konzentrationen nicht. Die therapeutische Konzentration des Topiramat liegt im Bereich von 25-50 μM (Perucca & Bialer, 1996; Shank et al., 2000) und die des Levetiracetam bei 10-75 μM (Doheny et al., 1999). Obwohl die Effekte auf die pHi-Regulation sowie auf die neuronale Aktivität bei beiden Substanzen relativ ähnlich erscheinen, könnten sich die dazu führenden Mechanismen unterscheiden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser sowie vorheriger Arbeiten (Bonnet et al., 1998; 2000b) liegt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von Topiramat und Levetiracetam auf die intrazelluläre pHi-Regulation ein wesentlicher Faktor des antikonvulsiven Wirkmechanismus beider Substanzen ist. Dass eine intrazelluläre Azidose eine Abnahme der neuronalen Aktivität induziert und dass dieser Effekt unabhängig vom Verfahren zur intrazellulären Ansäuerung ist, wurde vor wenigen Jahren gezeigt (Bonnet et al., 1998, 2000a).

4.1.1 Effekte von Topiramat und Levetiracetam auf den pHi-Wert

Die Topiramat- und Levetiracetam-abhängige pHi-Verminderung war ein wichtiger Befund. Grundsätzlich können unterschiedliche Mechanismen dazu beigetragen haben:

1. Eine gesteigerte intrazelluläre Säureproduktion (z.B. Laktat) nach Substanzapplikation. Das nach Substanzgabe eine gesteigerte Säureproduktion stattfand ist jedoch unwahrscheinlich, da eine pH_i -Verschiebung in HEPES-gepufferter Lösung ausblieb.

2. Eine gesteigerte intrazelluläre Säureproduktion infolge Zunahme der neuronalen bioelektrischen Aktivität (Trapp et al., 1996). Da sowohl Topiramat als auch Levetiracetam in den intrazellulären Ableitungen eine deutliche Abnahme der bioelektrischen Aktivität induzierten, scheidet dieser Mechanismus ebenfalls aus.

3. Eine Hemmung der Carboanhydrase. Dass eine Hemmung der Carboanhydrase unter unseren Versuchsbedingungen stattfindet, erscheint zumindest für Topiramat sehr wahrscheinlich. Dass Topiramat per se einen Carboanhydrase hemmenden Effekt besitzt, ist zudem bereits beschrieben (Dodgson et al., 2000; Stringer, 2000). Nach den vergleichenden pH_i -Messungen mit Acetazolamid, einem klassischen Hemmer der Carboanhydrase, ist jedoch auch klar, dass die isolierte Hemmung der Carboanhydrase nicht alle Topiramat-Effekte erklärt (Abb.9).

Eine Levetiracetam-abhängige Hemmung der Carboanhydrase scheint nicht stattzufinden.

4. Eine Veränderung der Säureextrusion, durch Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers, des Na^+ -abhängigen Cl^-/HCO_3^- -Austauschers oder des Na^+ -unabhängigen Cl^-/HCO_3^- -Austauschers. Da die H^+ -Extrusion gegen einen elektrochemischen Gradienten ständig stattfindet, um einen stabilen steady-state- pH_i aufrecht zu erhalten, führt eine Hemmung der H^+ -Extrusion zur Ansammlung intrazellulärer Protonen. Eine entscheidende Rolle spielen die Mechanismen der H^+ -Extrusion speziell im Rahmen einer intrazellulären Säurebelastung, da es z.B. im Rahmen gesteigerter neuronaler Aktivität zur Zunahme der intrazellulären Säureproduktion kommt (Siesjo et al., 1985). Experimentell wurde eine intrazelluläre Säurebelastung durch die Ammonium-Präpuls-Technik erzeugt. In CO_2/HCO_3^- -gepufferter Lösung kam es nach einem Ammoniumpuls zur leichten Abnahme der pH_i -Rückregulation unter Topiramat, d.h. wahrscheinlich zur Beeinflussung der Säureextrusion. Welcher der oben genannten Mechanismen durch die Wirkstoffe beeinflusst wird, kann man anhand der durchgeführten Versuche nur vermuten.

Für Topiramat gilt, dass eine Inhibition des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Baxter et Church, 1996) eher unwahrscheinlich ist, da der zu beobachtende Effekt auf die pHi -Regulation nach Ammoniumpuls nicht mit dem Effekt klassischer Hemmstoffe des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers, z.B. DIDS gleicht. Nach DIDS-Applikation (Yao et al., 1999) erfolgte zwar auch eine Beeinträchtigung der pHi -Rückregulation, allerdings fand diese unmittelbar nach der „azidotischen Spitze“ statt. Unter Topiramat-Einfluss kam es hingegen erst später zur Hemmung der pHi -Rückregulation (Abb.9).

Im Rahmen der vorgenommenen Untersuchungen bleibt der Mechanismus der Topiramat-Wirkung auf den pHi daher unklar. Weiterführende Untersuchungen konnten jedoch veranschaulichen, dass Topiramat den Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher stimuliert, da es unter Na^+ -freien Bedingungen in Anwesenheit von Topiramat zu pHi -Verschiebungen kommt (Leniger et al., 2004b).

Möglich ist daher, dass Topiramat eine intrazelluläre Ansäuerung bewirkt, indem es den Efflux von HCO_3^- fördert. So könnte die in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferter Lösung beobachtete Betonung des alkalischen- und azidotischen-Shifts (Abb.9), das Resultat einer reduzierten Pufferkapazität sein. Bestätigt werden könnte diese Annahme durch Versuche, bei denen man dem Extrazellulärraum gezielt Cl^- entzieht. Raley-Susman et al. (1993) zeigten nämlich, dass der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch verstärkt in entgegengesetzter Richtung, d.h. in Richtung Alkalose arbeitet, wenn dem Extrazellulärraum Cl^- entzogen wird. Der Entzug von extrazellulärem Cl^- verursachte unter Topiramat in der Tat eine Betonung der Alkalose (Leniger et al., 2004b), was für eine Aktivierung des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers spricht. Ursache der pHi -Erhöhung scheint somit eine Steigerung des HCO_3^- -Einstroms zu sein. Vermutlich kann der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher seine Transportrichtung abhängig vom pHi wechseln und HCO_3^- in oder aus der Zelle heraus transportieren (Schwartz et al., 2002). Dieser Mechanismus könnte auch die abgeschnittene „azidotische Spitze“ im Ammonium-Präpuls-Versuch erklären: Die abgeschnittene Spitze würde den pHi -Bereich kennzeichnen, an dem der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher unter dem stimulierenden Einfluss von Topiramat seine Transportrichtung wechselt und nun der steigenden Ansäuerung entgegen wirkt.

Unklar ist, wie Topiramate mit dem Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher interagiert. Eine Topiramate-vermittelte Beeinträchtigung der Phosphorylierung erscheint denkbar, da Shank et al. (2000) sowie Angehagen et al. (2004) zeigen konnten, dass Topiramate die Phosphorylierung von Ionenkanälen beeinflusst.

Eine Aktivierung des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers durch den Phosphatase-Inhibitor Okadaicinsäure ist beschrieben (De la Rosa et al., 2002). Okadaicinsäure wirkt auf die pHi-Regulation in ähnlicher Weise wie Topiramate (Leniger et al., 2004b). In diesem Zusammenhang muss auch die Publikation von Brett et al. (2002) genannt werden, die zeigt, dass sowohl der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher als auch der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in pHi abhängiger Weise durch Protein-Kinase-A (PKA) moduliert werden. Die Autoren verwendeten Rp-cAMPS zur Hemmung der PKA. In Na^+ -freier Lösung führte Rp-cAMPS in sauren Neuronen ($\text{pH} \leq 7.2$) zum pHi-Anstieg. Wie wir in weiterführenden Experimenten zeigen konnten, führte Topiramate unter den gleichen Bedingungen zu ähnlichen Effekten, was ebenfalls als Zeichen einer Beeinflussung des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers gedeutet werden kann. Offen bleibt jedoch, ob Topiramate eine direkte Hemmung der PKA induziert, oder, wie von Angehagen et al. (2004) für verschiedene Ionenkanäle beschrieben, die Phosphorylierung von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern bremst.

Für Levetiracetam gilt, dass es seine Wirkung auf den pHi, wahrscheinlich durch Inhibition des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers entfaltet. Das entweder der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - oder der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher durch Levetiracetam moduliert werden, zeigen die pHi-Messungen (Abb.5). Levetiracetam verursachte nur dann eine Abnahme des pHi, wenn die extrazelluläre Lösung $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ enthielt. Fehlte hingegen $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ induzierte Levetiracetam keine pHi-Änderung (Abb.5). Zwar erlaubte diese Versuchsanordnung zunächst nicht zwischen Na^+ -unabhängigen- und Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern zu differenzieren, doch schließt sie einen Levetiracetam-Effekt auf den Na^+/H^+ -Austauscher aus. Zur Differenzierung zwischen dem Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und dem Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher wurde in Folgeuntersuchungen

gezeigt, dass Levetiracetam die pHi-Veränderung (Alkalisierung) bei Cl⁻-Entzug nicht veränderte (Leniger et al., 2004a). Damit kann ein Effekt auf den Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher ausgeschlossen werden (Raley-Susman et al., 1993). Ein weiterer Aspekt, der auch durch die bereits erläuterten Experimente nicht geklärt werden kann, ist eine mögliche Levetiracetam-abhängige Beeinflussung des Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporters. Dieser Aspekt ist vermutlich jedoch nur von untergeordneter Bedeutung, da die Dichte des Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporters im Bereich neuronaler Somata hippocampaler CA3-Neurone gering ist (Schmitt et al., 2000). Zudem ist seine Bedeutung für den steady-state-pHi sowie die pHi-Regulation nach Säurebelastung noch unklar (Pederson et al., 1998). Ursprünglich wurde bezüglich des Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporters vor allem ein Effekt auf Gliazellen diskutiert (Chesler et al., 1990).

Der Na⁺-abhängige Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher ist für die pHi-Regulation hippocampaler Neurone bedeutend (Schwiening et Boron, 1994). In Neuronenkulturen liegt der anfänglich gemessene steady-state-pHi zwischen 6,4 und 7,6 (Brett et al., 2002). Interessanterweise ist die Hemmwirkung von DIDS auf den Cl⁻/HCO₃⁻-Transporter abhängig vom Ausgangs-pHi: Während DIDS in alkalotischen Neuronen den pHi anhebt, verursacht es in azidotischen Neuronen eine pHi-Abnahme. Erklärt wird dieser Effekt durch den Einfluss von DIDS sowohl auf den Na⁺-abhängigen als auch auf den Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher und durch unterschiedliche Aktivitäten beider Austauscher, die wiederum vom Phosphorylierungszustand abhängen (Brett et al., 2002). Liegt der neuronale pHi im Bereich von 7,0-7,1, wie bei humanen Neuronen mit PNMR gemessen (Garcia et al., 1994; Chu et al., 1996), so könnte eine Hemmung des Na⁺-abhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers durch Levetiracetam überwiegen, was durch eine Minderung des HCO₃⁻-Einstroms zur Senkung des pHi führt und so möglicherweise zu einer Abnahme der epileptischen Aktivität beiträgt. Neben den Somata besitzen auch Dendriten Na⁺-abhängige Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher. Willoughby und Schwiening (2002) zeigten, dass in Dendriten pHi-Veränderungen in HCO₃⁻/CO₂-gepufferter Lösung im Anschluss an eine Depolarisation dreimal so stark ausfallen wie im Somata. Daher könnte eine Hemmung des Na⁺-abhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers auch die synaptische

Transmission beeinflussen und auf diese Weise eine Verminderung der Erregbarkeit bewirken.

4.1.2 Effekt von Topiramat und Levetiracetam auf die neuronale Aktivität

Im 4-AP Epilepsiemodell senkten Topiramat und Levetiracetam die bioelektrische Aktivität im therapeutischen Konzentrationsbereich. Ein Anheben der Konzentration in den supratherapeutischen Konzentrationsbereich (250-1000 μM) beschleunigte zwar den Wirkungseintritt, aber eine weitere Steigerung des inhibitorischen Effekts oder eine Veränderung der Potentiale blieb aus. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Zielstrukturen der beiden Substanzen im 4-AP Epilepsiemodell bereits bei Konzentrationen $\leq 50 \mu\text{M}$ gesättigt sind.

Konzentrationen $\leq 50 \mu\text{M}$ entsprechen beim Topiramat auch jenem Konzentrationsbereich, der für die Hemmung unterschiedlicher Ionenkanäle vom Na^+ -, Ca^{2+} - oder Cl^- -Typ beschrieben ist (White et al., 1997; Zona et al., 1997; De Lorenzo et al., 2000; McLean et al., 2000; Zhang et al., 2000). Trotz der vielfältigen Effekte von Topiramat auf unterschiedliche Ionenkanäle blieben in dem verwendeten Epilepsiemodell Veränderungen der Form oder Amplitude von Aktionspotentialen und epileptiformen Entladungen aus. Dass Aktionspotentiale und epileptiforme-Burst sowohl im therapeutischen als auch supratherapeutischen Konzentrationsbereich unverändert bleiben, entspricht im Wesentlichen vorherigen Beobachtungen von Bonnet et al. (1998; 2000b) und Leniger et al. (2002). In beiden Studien wurde gezeigt, dass eine Verminderung des pHi zur Abnahme der bioelektrischen Aktivität führte sowie teilweise auch Veränderungen vor allem der Form von epileptiformen- Ereignissen auftraten. Warum ein Effekt von Topiramat auf Aktionspotentiale und epileptiforme Entladungen ausblieb, obwohl für Topiramat Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanal hemmende Effekte nachgewiesen worden sind, ist unklar. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei einer Untersuchung von Qian und Noebels (2003) an hippocampalen Neuronen der Maus. Topiramat senkte auch dort die Frequenz von Aktionspotentialen und epileptiformen Ereignissen. Für Neuronenkulturen konnte die gleiche Wirkung, die jedoch langsam einsetzte, gezeigt werden (Mc Lean et al., 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit entwickelte sich der

inhibitorische Effekt über mehrere Minuten, was sich mit dem Verlauf des pH-Werts deckt, so dass dieser auch in kultivierten Neuronen an der Topiramatbedingten Hemmung beteiligt sein könnten.

Widersprüchliche Ergebnisse fanden sich zur Arbeit von Herrero et al. (2002), die einen hyperpolarisierenden Effekt von Topiramat (20-100 μM) auf hippocampale CA1-Neurone fanden. Hingegen kam es in unserer und anderen Arbeiten (Hanaya et al., 1998) zu keiner Beeinflussung des Membranpotentials oder des Membranwiderstands (Abb.6,10). Für diese Unterschiede könnten jedoch andere Elektrodenfüllungen verantwortlich sein. So traten die von Herrero et al. (2002) beschriebenen Effekte auf das Membranpotential vor allem dann auf, wenn K^+ -Acetat gefüllte Elektroden verwendet wurden. Wurden hingegen, wie in unserer Arbeit, K^+ -Methylsulfat gefüllte Elektroden verwendet, so verschwanden die Effekte auf das Membranpotential. Neben der unterschiedlichen Elektrodenfüllung können zudem Zell- und Spezies-spezifische Ursachen zu den abweichenden Resultaten beigetragen haben.

Levetiracetam verursachte ebenfalls keine qualitativen Veränderungen von Aktionspotentialen und epileptiformen Ereignissen, obwohl es unterschiedliche Ionenkanäle teilweise hemmt (Madeja et al., 2003; Lukyanetz et al., 2002). Effekte auf K^+ - und Ca^{2+} - Kanäle traten jedoch vor allem bei Anwendung hoher Konzentrationen auf (50-500 μM). So berichteten Lukyanetz et al. (2002) über eine partielle irreversible Hemmung von N-Typ Ca^{2+} - Kanälen (von nur 15%) nach Gabe von 100 μM Levetiracetam. Madeya et al. (2002) fanden eine Hemmung von K^+ -Kanälen von weniger als 20% nach Gabe von 50 μM Levetiracetam. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit Konzentrationen zwischen 10–50 μM gearbeitet und vereinzelt mit Konzentrationen zwischen 250-500 μM . Da Levetiracetam keinen erkennbaren Effekt auf Aktionspotentiale und epileptiforme Entladungen ausübte, ist anzunehmen, dass die Wirkung auf Ionenkanäle zu gering ist, um sich auch bei Verwendung höherer Konzentrationen in einer Veränderung der Amplitude oder Form von Aktionspotentialen und Burst widerzuspiegeln. Die vorliegenden Ergebnissen entsprechen jedoch denen von Niespodziany et al. (2003), die ebenfalls eine Levetiracetam induzierte Abnahme der neuronalen Aktivität beobachteten, ohne dass es dabei zu einer Veränderung epileptiformer

Entladungen gekommen wäre. Die Autoren verwendeten dabei allerdings ein hoch K^+ /niedrig Ca^{2+} -Epilepsiemodell. Erneut war eine Verschiebung des Membranwiderstandes und Membranpotentials durch Topiramat nicht zu erkennen.

Die Vermutung, dass pHi-Veränderungen zur antikonvulsiven Wirkung beider Substanzen beitragen, konnte im Rahmen der TMA-Versuche weiter erhärtet werden. TMA bewirkt eine intrazelluläre Alkalose und antagonisierte den inhibitorischen Effekt. Nach TMA-Applikation stellte sich eine bioelektrische Aktivität ein, die dem bioelektrischen Aktivitätsmuster vor Wirkstoffgabe sehr ähnlich war (Abb.6). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die intrazelluläre Azidose zu den antikonvulsiven Eigenschaften beiträgt.

Dass eine intrazelluläre Azidose zur Hemmung der neuronalen Aktivität beiträgt, konnte bereits mehrmals im 4-AP Epilepsiemodell dargestellt werden (Bonnet et al., 1998, Bonnet & Wiemann, 1999; Bonnet et al. 2000a; Leniger et al., 2002). Welche Mechanismen zur pHi-Abnahme führen, lässt sich anhand der elektrophysiologischen Untersuchungen nicht sagen. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Antikonvulsiva, z.B. Acetazolamid oder Sulthiam (Leniger et al., 2002), so sieht man sehr ähnliche Effekte. Acetazolamid und Sulthiam vermögen, wie die beiden hier untersuchten Substanzen, den pHi zu senken und die bioelektrische Aktivität im 4-AP Epilepsiemodell zu verringern (Leniger et al., 2002). Sowohl Acetazolamid als auch Sulthiam hemmen die Carboanhydrase. Zumindest für das Topiramat konnte ebenfalls ein Carboanhydrase hemmender Effekt bestätigt werden (Dodgson et al., 2000; Stringer, 2000).

Die Topiramat- und Levetiracetam-induzierten Veränderungen $GABA_{\text{erger}}$ -Potentiale sind schwierig zu interpretieren. Sie waren lediglich in einigen Neuronen zu sehen, traten meist im Konzentrationsbereich zwischen 500-1000 μM auf und präsentierten sich zum einen als verlängerte $GABA_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisationen mit unveränderter Amplitude, und zum anderen als verkürzte $GABA_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisation mit reduzierter Amplitude. Allerdings stellten sie sich während Applikation gleichförmig dar und waren reversibel.

Vorherige Arbeiten berichten über eine Topiramats (10 μM) abhängige Zunahme $\text{GABA}_{\text{erger}}\text{-Cl}^-$ Ströme in zerebellären Granulosazellen und kortikalen Neuronen der Maus, wobei Topiramats allein keine signifikante Zunahme $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Ströme auslöste (White et al., 1997). Zwar wurden im Rahmen der Publikation von White et al. (1997) auch Zellen erfasst, die nicht auf Topiramats reagierten, jedoch war die Anzahl dieser „non-responder“ gering. Zudem kam es bei White et al. bereits ab Konzentrationen von 10 μM zu Veränderungen $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Ströme. Warum in unseren Ableitungen Veränderungen von GABA -Strömen nur vereinzelt und nur im Hochdosisbereich auftreten, ist unklar.

Für Levetiracetam ist eine Beeinflussung $\text{GABA}_{\text{erger}}$ -Ströme oder des GABA -Metabolismus bisher nicht bekannt (Sills et al., 1997). Warum es auch hier nur selten und zu wechselnden GABA -Antworten kam, bleibt ebenfalls fraglich. In beiden Fällen ist jedoch denkbar, dass eine Beeinflussung des Cl^- - und HCO_3^- -Gleichgewichtspotentials durch Topiramats und Levetiracetam für die wechselnden GABA -Antworten verantwortlich ist.

4.1.3 Ausbleiben eines Topiramats- und Levetiracetam-Effektes

Wenige Zellen reagierten während der elektrophysiologischen Untersuchungen und der pH-Messungen nicht auf Topiramats oder Levetiracetam. Das Topiramats in elektrophysiologischen Experimenten keine Wirkung induzierte, beschrieben bereits Skradski & White (2000). Es ist denkbar, dass diejenigen Neurone, deren Entladungsmuster unverändert blieb, auch keine pH-Veränderung erfahren. Unterstützt wird diese Annahme durch Studien am 4-AP Epilepsiemodell. Bonnet et al. (1998; 2002), Bonnet & Wiemann (1999) sowie Leniger et al. (2002) beobachteten, dass Neurone auf eine Senkung des pH, wenn diese mit physikochemischen Verfahren herbeigeführt wird, stets mit einer Abnahme der bioelektrischen Aktivität antworten. Wie von Brett et al. (2002) beschrieben, hängt die Aktivität des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers sowie des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers jedoch vom neuronalen pH vor Substanzgabe ab: Neurone mit einem Ausgangs-pH um 7,15–7,20 sind deutlich weniger sensibel für eine Modulation des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers und des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Brett et al. 2002). Daher könnte es sein, dass Neurone, die nicht auf die beiden

Substanzen reagierten, einen hohen Ausgangs-pHi besaßen, der für die fehlende Wirkung der Substanzen verantwortlich ist. Parallele Messungen der bioelektrischen Aktivität und des pHi könnten helfen, die Abhängigkeit der bioelektrischen Aktivität vom pHi unter Topiramat- oder Levetiracetam-Einfluss zu sichern. Weiterhin wäre möglich, dass die Substanz-induzierte Hemmung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers, bzw. Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers sowie der Carboanhydrase durch eine gesteigerte Funktion z.B. des Na^+/H^+ -Austauschers kompensiert wird (Raley-Susman et al., 1991; Baxter et Church, 1996).

Es bleibt festzuhalten, dass Levetiracetam und Topiramat auch im Hinblick auf das Ausbleiben einer Wirkung beim hier genutzten in vitro Modell sehr ähnlich sind. Das weitgehend überlappende Profil der klinischen Anwendungen (siehe Einleitung) könnte dabei, die hier gezeigten Einflussnahmen auf den neuronalen pHi-Wert widerspiegeln.

5. Zusammenfassung

Levetiracetam und Topiramate gehören zu den neuen Antiepileptika, deren Wirkmechanismus noch immer nicht vollständig bekannt ist. In dieser Arbeit wurde der Einfluss beider Substanzen auf den intrazellulären pH-Wert (pHi) sowie auf die bioelektrische Aktivität von CA3-Neuronen an Gewebeschnitten des Meerschweinchen-Hippocampus untersucht. Das Membranpotential der Neurone wurde in parallelen Versuchen intrazellulär mit Mikroelektroden abgeleitet. Effekte beider Substanzen wurden vor dem Hintergrund einer durch 4-Aminopyridin ausgelösten epileptiformen Aktivität geprüft. Levetiracetam verminderte den neuronalen steady state pHi-Wert um 0.14 ± 0.09 pH-Einheiten. Da der Effekt in Bicarbonat-freier, HEPES-gepufferter Lösung nicht mehr auftrat, kommt als Ursache vor allem eine Hemmung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers in Betracht. Topiramate führte ebenfalls innerhalb weniger Minuten zu einer Bicarbonat-abhängigen Verschiebung des intrazellulären pH-Werts um 0.13 ± 0.09 pH-Einheiten, die in HEPES-gepufferter Lösung nicht auftrat. Die pHi-Regulation nach Ammoniumpräpuls in Anwesenheit von Bicarbonat war jedoch weitgehend normal. Als Ursache für die neuronale Ansäuerung wurde daher eine Modulation des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers in Betracht gezogen. Beide Substanzen verminderten in der überwiegenden Zahl der Neurone die Frequenz der Aktionspotentiale und der epileptiformen-Bursts um bis zu 43%, bzw. 48%. Membranwiderstand, Form und Dauer der epileptiformen Potentiale sowie der Aktionspotentiale veränderten sich nicht. Der Zeitgang der Aktivitätsabnahme entsprach bei den Substanzen dem Verlauf der pHi-Verminderung. Eine intrazelluläre Alkalisierung mit Trimethylamin (5 mM) konnte die inhibierende Wirkung beider Substanzen antagonisieren. Reversibel veränderte $\text{GABA}_{\text{erge}}^-$ Hyperpolarisationen traten nur vereinzelt auf und schienen für die Änderung der neuronalen Aktivität von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Die Untersuchungen lassen insgesamt den Schluss zu, dass Levetiracetam und Topiramate die epileptiforme Aktivität hippocampaler Neurone in vitro zumindest zum Teil durch die Verminderung des pHi herabsetzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Angehagen, M., Ben-Menachem, E., Shank, R., Ronnback, L., Hansson, E. (2004)
Topiramate modulation of kainate-induced calcium currents is inversely related to channel phosphorylation level.
J. Neurochem. 88, 320-325.
2. Aram, J.A., Lodge, D. (1987)
Epileptiform activity induced by alkalosis in rat neocortical slices: block by antagonists of N-methyl-D-aspartate.
Neurosci. Lett. 83, 215-222.
3. Attaphitaya, S., Park, K., Melvin, J.E. (1999)
Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain.
J. Biol. Chem. 274, 4383-4388.
4. Avanzini, G., Franceschetti, S. (2003)
Cellular biology of epileptogenesis.
Lancet Neurol. 2, 33-42.
5. Babb, T.L., Pretorius, J.K., Kupfer, W.R., Crandall, P.H. (1989)
Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus.
J. Neurosci. 9, 2562-2574.
6. Baxter, K.A., Church, J. (1996)
Characterization of acid extrusion mechanisms in cultured fetal rat hippocampal neurones.
J. Physiol. 493, 457-470.

7. Bernard, C., Cossart, R., Hirsch, J.C., Esclapez, M., Ben-Ari, Y. (2000)
What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy?
Epilepsia 41, 90-95.
8. Bevensee, M.O., Cummins, T.R., Haddad, G.G., Boron, W.F.,
Boyarsky, G. (1996)
pH regulation in single CA1 neurons acutely isolated from the
hippocampi of immature and mature rats.
J. Physiol. 494, 315-328.
9. Bingmann, D., Speckmann, E.J. (1989)
Specific suppression of pentylenetetrazol-induced epileptiform
Discharges in CA3 neurons (hippocampal slice, guinea pig) by the
organic calcium antagonists flunarizine and verapamil.
Exp. Brain Res. 74, 239-248.
10. Birnstiel, S., Wulfert, E., Beck, S.G. (1997)
Levetiracetam (ucb LO59) affects in vitro models of epilepsy in CA3
pyramidal neurons without altering normal synaptic transmission.
Naunyn Schmiedebergers Arch. Pharmacol. 356, 611-618.
11. Bonnet, U., Wiemann, M., Bingmann, D. (1998)
CO₂/HCO₃⁻-withdrawal from the bath medium of hippocampal slices:
Biphasic effect on intracellular pH and bioelectric activity of CA3-
neurons.
Brain Res. 796, 161-170.
12. Bonnet, U., Wiemann, M. (1999)
Ammonium prepuls: effects on intracellular pH and bioelectric activity of
CA3-neurons in guinea pig hippocampal slices.
Brain Res. 840, 16-22.
13. Bonnet, U., Leniger, T., Wiemann, M. (2000a)
Alteration of intracellular pH and activity of CA3-pyramidal cells in guinea
pig hippocampal slices by inhibition of transmembrane acid extrusion.
Brain Res. 872, 116-124.

14. Bonnet, U., Bingmann, D., Wiemann, M. (2000b)
Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal neurones.
Eur. Neuropsychopharmacol. 10, 97-103.
15. Bonnet, U., Bingmann, D., Leniger, T., Scherbaum, N., Widman, G., Hufnagel, A., Wiemann, M. (2002)
Valproate acidifies hippocampal CA3-neurons--a novel mode of action.
Eur. Neuropsychopharmacol. 12, 279-285.
16. Bookstein, C., Musch, M.W., DePaoli, A., Xie, Y., Rabenau, K., Villereal, M. (1996)
Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus.
Am. J. Physiol. 271, 1629-1638.
17. Boyarsky, G., Hansen, C., Clyne, L.A. (1996)
Superiority of *in vitro* over *in vivo* calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells.
FASEB J. 10, 1205-1212.
18. Brett, C.L., Kelly, T., Sheldon, C., Church, J. (2002)
Regulation of Cl⁻-HCO₃⁻-exchanger by c-AMP dependent protein kinase in adult rat hippocampal neurons.
J. Physiol. 545, 837-853.
19. Cascino, G.D. (2004)
Surgical treatment for epilepsy.
Epilepsy Res. 60, 179-186.
20. Cereghino, J.J., Biton, V., Abou-Khalil, B., Dreifuss, F., Gauer, L.J., Leppik, I. (2000)
Levetiracetam for partial seizures: results of a double blind, randomised clinical trial.
Neurology 55, 236-242.

21. Chesler, M. (1990)
The regulation and modulation of pH in the nervous system.
Prog. Neurobiol. 34, 756-760.
22. Chesler, M. (2003)
Regulation and modulation of pH in the brain.
Physiol Rev. 83, 1183-1221.
23. Chu, W.J., Hetherington, H.P., Kuzniecky, R.J., Vaughan, J.T., Twieg, D.B., Faught, R.E., Gilliam, F.G., Hugg, J.W., Elgavish, G.A. (1996)
Is the intracellular pH different from normal in epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy? A ³¹P NMR study
Neurology 47, 756-760.
24. Connors, B.W. (1984)
Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex.
Nature 310, 685-687.
25. Cox, G.A., Lutz, C.M., Yang, C.L., Biemesderfer, D., Bronson, R.T., Fu, A., Aronson, P.S., Noebels, J.L., Frankel, W.N. (1997)
Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice.
Cell 91, 139-148.
26. Dalby, N.O., Mody, I. (2001)
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.
Curr. Opin. Neurol. 14, 187-192.
27. De La Rosa, L.A., Vilarino, N., Vieytes, M.R., Botana, L.M. (2002)
Okadaic acid a protein phosphatase inhibitor, stimulates the activity of Na⁺/H⁺ and Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in human lymphocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 365, 74-81.
28. De Lorenzo, R.J., Sombati, S., Coulter, D.A. (2000)
Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous

- recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons.
Epilepsia 41, 40-44
29. De Los Reyes, E.C., Sharp, G.B., Williams, J.P., Hale, S.E. (2004)
Levetiracetam in the treatment of Lennox-Gastaut syndrome.
Pediatr. Neurol. 30, 254-256.
 30. Deitmer, J.W., Rose, C.R. (1996)
pH regulation and proton signalling by glial cells.
Prog. Neurobiol. 48, 73-103.
 31. Dodgson, S.J., Shank, R.P., Maryanoff, B.E. (2000)
Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes.
Epilepsia 41, 35-39.
 32. Doheny, H.C., Ratnaraj, N., Whittington, M.A., Jefferys, J.G., Patsalos, P.N. (1999)
Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat.
Epilepsy Res. 34, 161-168.
 33. Elger, C.E., Speckmann, E.J. (1983)
Penicillin-induced epileptic foci in the motor cortex: vertical inhibition.
Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 56, 604-622.
 34. Garcia, P.A., Laxer, K.D., van der Grond, J., Hugg, J.W., Matson, G.B., Weiner, M.W. (1994)
Phosphorus magnetic resonance spectroscopic imaging in patients with frontal lobe epilepsy.
Ann Neurol. 35, 217-221.
 35. Gibbs III, J.W., Sombati, S., De Lorenzo, R.J., Coulter, D.A. (2000)
Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons.
Epilepsia 41, 10-16.

36. Gorji, A., Höhling, J.M., Madeja, M., Straub, H., Köhling, R., Truxhorn, I., Ebner, A., Wolf, P., Panneck, H.W., Behne, F., Lahl, R., Speckmann, E.J. (2002)
Effect of Levetiracetam on epileptiform discharges in human neocortical slices.
Epilepsia 43, 1480-1487.
37. Grichtchenko, I.I., Choi, I., Zhong, X., Bray-Ward, P., Russell, J.M., Boron, W.F. (2000)
Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger.
J. Biol. Chem. 276, 8358-8363.
38. Gu, J., Lynch, B.A., Anderson, D., Klitgaard, H., Lu, S., Elashoff, M., Ebert, U., Potschka, H., Loscher, W. (2004)
The antiepileptic drug Levetiracetam selectively modifies kindling - induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats.
Eur. J. Neurosci. 19, 334-345.
39. Hanaya, R., Sasa, M., Ujihara, H., Ishihara, K., Serikawa, T., Iida, K., Akimitsu, T., Arita, K., Kurisu, K. (1998)
Suppression by topiramate of epileptiform burst discharges in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rat *in vitro*.
Brain Res. 789, 274-282.
40. Herrero, A.I., Del Olmo, N., Gonzalez-Escalada, J.R., Solis, J.M. (2002)
Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance.
Neuropharmacology 42, 210-220.
41. Johannessen, S.I., Battino, D., Berry, D.J., Bialer, M., Kramer, G., Tomson, T., Patsalos, P.N. (2003)
Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs.
Ther. Drug. Monit. 25, 347-363.

42. Leniger, T., Wiemann, M., Bingmann, D., Hufnagel, A., Bonnet, U. (2000)
Different effects of GABAergic anticonvulsants on 4-aminopyridine-induced spontaneous GABAergic hyperpolarisations of hippocampal pyramidal cells – implication for their potency in migraine therapy.
Cephalgia 20, 533-537.
43. Leniger, T., Thöne, J., Wiemann, M. (2004a)
Levetiracetam inhibits Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻-exchange of adult hippocampal CA3 neurons from guinea-pigs.
Br. J. Pharmacol. 142, 1073-1080.
44. Leniger, T., Thöne, J., Bonnet, U., Hufnagel, A., Wiemann, M. (2004b)
Topiramate modulates pH of hippocampal CA3 neurons by combined effects on carbonic anhydrase and Cl⁻/HCO₃⁻-exchange.
Br. J. Pharmacol. 142, 831-842.
45. Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994)
Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.
N. Engl. J. Med. 330, 613-22.
46. Lukyanetz, E.A., Shkryl, V.M., Kostyuk, P.G. (2002)
Selective blockade of N-type calcium channels by Levetiracetam.
Epilepsia 43, 9-18
47. Ma, E., Haddad, G.G. (1997)
Expression and localization of Na⁺/H⁺ exchangers in rat central nervous system.
Neuroscience 79, 591-603.
48. Madeja, M., Margineanu, D.G., Gorji, A., Siep, E., Boerrigter, P., Iitgaard, H., Speckmann, E.J. (2003)
Reduction of voltage-operated potassium currents by Levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism?
Neuropharmacology 45, 661-671.

49. Margineanu, D.G., Klitgaard, H. (2003)
Levetiracetam has no significant gamma-aminobutyric acid-related effect on paired-pulse interaction in the dentate gyrus of rats.
Eur. J. Pharmacol. 466, 255-261.
50. Masereel, B., Rolin, S., Abbate, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2002)
Carbonic anhydrase inhibitors: anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties.
J. Med. Chem. 45, 312-320.
51. Matsumoto, H., Marsan, C.A. (1964a)
Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations.
Exp. Neurol. 80, 286-304
52. Matsumoto, H., Marsan, C.A. (1964b)
Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Ictal Manifestations.
Exp Neurol. 25, 305-326.
53. McLean, M.J., Bukhari, A.A., Wamil, A.W. (2000)
Effects of topiramate on sodium-dependent action-potential firing in spinal cord neurons in cell culture.
Epilepsia 41, 21-24.
54. Mikaeloff, Y., de Saint-Martin, A., Mancini, J., Peudener, S., Pedespan, J.M., Vallee, L., Motte, J., Bourgeois, M., Arzimanoglou, A., Dulac, O., Chiron, C. (2003)
Topiramate: efficacy and tolerability in children according to epilepsy syndromes.
Epilepsy Res. 53, 225-232.
55. Niespodziany, I., Klitgaard, H., Margineanu, D.G. (2003)
Desynchronizing effects of Levetiracetam on epileptiform responses in rat hippocampal slices.
Neuroreport 14, 1273-1276.

56. Nortey, S.O., Wu, W.N., Maryanoff, B.E. (1997)
Synthesis of hydroxylated derivatives of topiramate, a novel antiepileptic drug based on D-fructose: investigation of oxidative metabolites.
Carbohydr. Res. 304, 29-38.
57. Orłowski, J., Grinstein, S. (2004)
Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family.
Pflugers Arch. 447, 549-565.
58. Patsalos, P.N., (2004)
Clinical pharmacokinetics of levetiracetam
Clin. Pharmacokinet. 43, 707-724
59. Pena, F., Tapia, R. (2000)
Seizures and neurodegeneration in rat hippocampus *in vivo*: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and ion channels.
Neurosci. 101, 547-561.
60. Perkins, K.L., Wong, R.K. (1996)
Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells.
J. Neurophysiol. 76, 3886-3894.
61. Perreault P., Avoli M. (1991)
Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices.
J. Neurophysiol. 65, 771-785.
62. Perucca, E., Bialer, M. (1996)
The clinical pharmacokinetics of the newer antiepileptic drugs. Focus on topiramate, zonisamide and tiagabine.
Clin. Pharmacokinet. 31, 29-46.
63. Pisani, A., Bonsi, P., Martella, G., De Persis, C., Costa, C., Pisani, F., Bernardi, G., Calabresi, P. (2004)
Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by

- levetiracetam and lamotrigine.
Epilepsia 45, 719-728.
64. Poulain, P., Margineanu, D.G. (2002)
Levetiracetam opposes the action of GABA antagonists in hypothalamic neurones.
Neuropharmacology 42, 346-352.
65. Prince, D.A., Wilder, B.J. (1967)
Control mechanisms in cortical epileptogenic foci. "Surround" inhibition.
Arch. Neurol. 16, 194-202.
66. Qian, J., Noebels, J.L. (2003)
Topiramate alters excitatory synaptic transmission in mouse hippocampus.
Epilepsy Res. 55, 225-233.
67. Raley-Susman, K.M., Cragoe, E.J., Sapolsky, R.M., Kopito, R.R. (1991)
Regulation of intracellular pH in cultured hippocampal neurons by an amilorid-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger.
J. Biol. Chem. 266, 2739-2745.
68. Raley-Susman, K.M., Sapolsky, R.M., Kopito, R.R. (1993)
Cl⁻/HCO₃⁻-exchange function differs in adult and fetal rat hippocampal neurons.
Brain Res. 614, 308-314.
69. Rigoulot, M.A., Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig A. (2004)
Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 308, 787-95.
70. Rigo, J.M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Leprince, P., Moonen, G., Selak, I., Matagne, A., Klitgaard, H. (2002)
The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine gated currents.
Br. J. Pharmacol. 136, 659-672.

71. Roos, A., Boron, W.F. (1981)
Intracellular pH.
Physiol. Rev. 61, 396-434.
72. Rorig, B., Klaus, G., Sutor B. (1996)
Intracellular acidification reduced gap junction coupling between
immature rat neocortical pyramidal neurones.
J. Physiol. 490, 31-49.
73. Russo, E., Constanti, A. (2004)
Topiramate hyperpolarizes and modulates the slow poststimulus AHP of
rat olfactory cortical neurons *in vitro*.
Br. J. Pharmacol. 141, 285-301.
74. Rutecki, P.A., Lebeda, F.J., Johnston, D. (1987)
4-aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and
enhances synaptic excitation and inhibition.
J. Neurophysiol. 57, 1911-1924.
75. Scharfman, H.E. (2004)
Functional implications of seizure-induced neurogenesis.
Adv. Exp. Med. Biol. 548, 192-212.
76. Schmitt, B.M., Berger, U.V., Douglas, R.M., Bevensee, M.O., Hediger,
M.A., Haddad, G.G., Boron, W.F. (2000)
Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in rat brain: expression in glia, neurons, and
choroid plexus.
J. Neurosci. 20, 6839-6848.
77. Schwartz, G.J., Tsuruoka, S., Vijayakumar, S., Petrovic, S., Mian, A.,
Al-Awqati, Q. (2002)
Acid incubation reverses the polarity of intercalated cell transporters, an
effect mediated by hensin.
J. Clin. Invest. 109, 89-99.

78. Schwiening, C.J., Boron, W.F. (1994)
Regulation of intracellular pH in pyramidal neurons from the rat hippocampus by Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange.
J. Physiol. 475, 59-67.
79. Shank, R.P., Gardocki, J.F., Streeter, A.J., Maryanoff, B.E. (2000)
An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanisms of action.
Epilepsia 41, 3-9.
80. Sharief, M., Viteri, C., Ben-Menachem, E., Weber, M., Reife, R., Pledger, G., Karim, R. (1996)
Double-blind, placebo-controlled study of topiramate in patients with refractory partial epilepsy.
Epilepsy Res. 25, 217-224.
81. Shorvon, S.D., Lowenthal, A., Janz, D., Bielen, E., Loiseau, P. (2000)
Multicenter double-blind, randomised, placebo-controlled trial of Levetiracetam as add on therapy in patients with refractory partial seizures. European Levetiracetam Study Group.
Epilepsia 41, 1179-1186.
82. Siesjo, B.K., von Hanwehr, R., Nergelius, G., Nevander, G., Ingvar, M. (1985)
Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity.
J. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 47-57.
83. Sills, G.J., Leach, J.P., Fraser, C.M., Forrest, G., Patsalos, P.N., Brodie, M.J. (1997)
Neurochemical studies with the novel anticonvulsant levetiracetam in mouse brain.
Eur. J. Pharmacol. 23, 35-40.

84. Skradski, S., White, H.S. (2000)
Topiramate blocks kainate-evoked cobald influx into cultured neurons.
Epilepsia 41, 45-47.
85. Sloviter, R.S. (1987)
Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in
experimental epilepsy.
Science 235, 73-76.
86. Speckmann, E.J., Elger, C.E. (1991)
The neurophysiological basis of epileptic activity: a condensed overview.
Epilepsy Res. 2, 1-7.
87. Spina, E., Perugi, G. (2004)
Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy.
Epileptic Disord. 6, 57-75.
88. Stahl, S.M. (2004)
Psychopharmacology of anticonvulsants: levetiracetam as a synaptic
vesicle protein modulator.
J. Clin. Psychiatry 65, 1162-1163.
89. Stringer, J.L. (2000)
A comparision of topiramate and acetazolamid on seizure duration and
paired-pulse inhibition in the dentate gyrus of the rat.
Epilepsy Res. 40, 147-153.
90. Szente, M., Baranyi, A. (1987)
Mechanism of aminopyridine-induced ictal seizure activity in the cat
neocortex.
Brain Res. 413, 368-873.
91. Thöne, J., Leniger, T., Wiemann, M. (2003)
Effects of topiramate on epileptiforme activity of hippocampal CA3
neurons.
Eur. J. Physiol. 445, 53.

92. Trapp, S., Luckermann, M., Kaila, K., Ballanyi, K. (1996)
Acidosis of hippocampal neurones by plasmalemmal $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ calcium pump.
Neuroreport 7, 2000-2004.
93. Traynelis, S.F., Cull-Candy, S.G. (1991).
Pharmacological properties and H^{+} sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurons.
J. Physiol. 433, 727-763.
94. White, H.S., Brown, S.D., Woodhead, J.H., Skeen, G.A., Wolf, H.H. (1997)
Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked Chlorid currents in murine brain neurons and increases seizure threshold.
Epilepsy Res. 28, 167-179.
95. Widman, G., Bingmann, D. (1996)
DAPAS, a computerized workplace for digital aquisition and processing of analog signal,, with up to two gigabytes data per per registration.
J. Neorosci. Methods 67, 71-81.
96. Willoughby, D., Schwiening, C.J. (2002)
Electrically evoked dendritic pH transients in rat cerebellar Purkinje cells.
J. Physiol. 15, 487-499.
97. Yao, H., Ma, E., Gu, X.Q., Haddad, G.G. (1999).
Intracellular pH regulation of CA1 neurons in $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ isoform I mutant mice.
J. Clin. Invest. 104, 637-645.
98. Zhang, X., Velumian, A.A., Jones, T.J., Carlen, P.L. (2000)
Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate.
Epilepsia 41, 52-60.

99. Zona, C., Ciotti, M.T., Avoli, M. (1997)
Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar Granule cells in culture.
Neurosci. Lett. 231, 123-126

100. Zona, C., Niespodziany, I., Marchetti, C., Klitgaard, H., Bernardi, G., Margineanu, D.G. (2001)
Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents.
Seizure 10, 279-286.

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Standardlösung
AP	Aktionspotential
BCECF-AM	(2',7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl-Ester
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonsäure, -dinatriumsalz
EPSP	exitatorisch-postsynaptisches-Potential
GABA	gamma-amino-Buttersäure
IPSP	inhibitorisch-postsynaptisches Potential
KZ	Körnerzellregion
LEV	Levetiracetam
MP	Mikroelektrode
NCHE	Na ⁺ -abhängiger Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austauscher
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PDS	Paroxysmale-Depolarisation
pHe	pH-Wert, extrazellulärer
pHi	pH-Wert, intrazellulärer
PKA	Protein-Kinase-A
PNMR	Phosphorus-Magnet-Resonanz-Spektroskopie
SITS	Amino 4-Acetoamino-4'-aminostilben-2,2'-disulfonsäure
TMA	Trimethylamin
TPM	Topiramat
ZNS	Zentrales-Nervensystem
4-AP	4-Aminopyridin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Internationale Klassifikation der Epilepsien und Epilepsiesyndrome (nach Commission on Classification and Terminology of International League against Epilepsy (1989))	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) und des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (NCHE)	19
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines hippocampalen Gewebeschnitts in der Experimentierkammer sowie der Position von Ableit- und Referenzelektrode	23
Abbildung 4:	Ammonium-Präpuls-Technik	27
Abbildung 5:	Einfluss von Levetiracetam auf den neuronalen steady-state-pHi	31
Abbildung 6:	Wirkung von Levetiracetam (LEV) und Trimethylamin (TMA) auf die Frequenz von Aktionspotentialen, epileptiformen Bursts und $\text{GABA}_{\text{ergen}}$ -Hyperpolarisationen von CA3 Neuronen	33
Abbildung 7:	Einfluss von Levetiracetam auf 4-AP vermittelte $\text{GABA}_{\text{erge}}$ -Hyperpolarisation	34
Abbildung 8:	Effekt von Topiramate (TPM) auf den steady-state-pHi gemessen an BCECF-AM beladenen hippocampalen CA3-Somata	35

Abbildung 9: Effekt von Topiramat (50 μ M) auf die pHi-Regulation hippocampaler CA3-Neurone	36
Abbildung 10: Effekt von Topiramat (TPM, 50 μ M) auf das Membranpotential von 4-AP-behandelten Neuronen	39
Abbildung 11: Einfluss von TMA auf die Topiramat-induzierte Hemmung bioelektrischer Aktivität	41
Abbildung 12: Einfluss von TMA auf die Hemmung der bioelektrischen Aktivität durch eine hohe Topiramat-Konzentration	42
Abbildung 13: Fehlender Effekt von Topiramat auf Aktionspotentiale und 4-AP induzierte epileptiforme Entladungen	43
Abbildung 14: Topiramat-induzierte Veränderungen 4-AP-bedingter GABA _{erg} -Hyperpolarisationen	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anwendungsgebiete gängiger Antiepileptika	13
Tabelle 2:	Wirkmechanismen (nach Löscher und Schmidt 1994) und Serumspiegel (nach Johanessen et al., 2003 Jun., 25) aktueller Antikonvulsiva.	14

Danksagung

Dass ein in wissenschaftlicher Arbeit noch ungeübter Student der Unterstützung beim Planen und Verfassen seiner Dissertation bedarf, liegt auf der Hand. So wäre auch diese Arbeit niemals ohne die wertvolle Hilfe mehrerer Personen, die hier nicht unerwähnt bleiben sollen, vollendet worden.

Mein erster und größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Martin Wiemann. Sein Optimismus und seine Begeisterung für die Neurophysiologie, gepaart mit einer äußerst sympathischen Art, machten es mir leicht, mich für die Mitarbeit zu entscheiden. Nicht weniger dankbar bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Leniger, auf den das Gleiche zutrifft und der mir die klinische Relevanz neurophysiologischer Forschung nahe gebracht hat.

Beide standen mir während der gesamten Zeit im Labor motivierend und helfend zur Seite und haben mir soviel Unterstützung entgegengebracht, wie es sich ein Doktorand nur wünschen kann. Ihr Engagement ging dabei weit über das normale Maß hinaus. Meine Art wissenschaftlich zu arbeiten, zu denken und zu schreiben wurde von Ihnen im Rahmen zahlreicher fachlicher und persönlicher Gespräche geprägt. Für Ihr Vertrauen, das sie mir entgegengebracht haben, bedanke ich mich von ganzem Herzen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Bingmann, der ebenfalls immer ansprechbar war und mir jederzeit mit Rat und vor allem Tat zur Seite stand sowie bei Herrn Frank Spettschlösser und Frau Kerstin Göpelt für Ihre Hilfe bei Versuchsvorbereitung und Versuchsaufbau.

Zu großem Dank bin ich auch vielen anderen Personen verpflichtet: Meiner Freundin Nadine für ihre Unterstützung und unerschöpfliches Verständnis für schlechte Launen und lange Labornächte, sowie vielen guten Freunden für Ihr akribisches Korrekturlesen und Hilfe bei der optischen Gestaltung, namentlich Herrn Tobias Proyer, Herrn Phillip Kirsch, Herrn Jan Düspohl, Herrn Achim Göhring, Herrn Amir Joneidi und vielen anderen.

Lebenslauf

Jan Thöne

aus Bochum

Persönliche Daten

- Geboren am: 10.09.1976
- Geburtsort: Gelsenkirchen
- Familienstand: ledig

Schulbildung

Juli '83 – Juni '87

Dietrich Bonhoeffer-Grundschule, Wattenscheid

August '87 – Mai '96

Märkisches-Gymnasium, Wattenscheid

24. Mai '96

Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

01.08.'96 – 30.09.'97

Zentrale Notaufnahme Universitätsklinikum
Bergmannsheil, Bochum

Hochschulausbildung

SS '98 – WS '99/'00

Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf

März '00

Physikum

SS '00 – WS '04/'05

Studium der Humanmedizin an der Universität/
Gesamthochschule Essen/Duisburg

April '01

1. Staatsexamen

August '03

2. Staatsexamen

WS '03/'04 – SS '04	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Essen 1. Terial: Universitätsklinik für Neurologie (Wahlfach) 2. Terial: Universitätsklinik für Allgemein- und Transplantationschirurgie Universitätsklinik für Unfallchirurgie 3. Terial: Universitätsklinik für Gastroenterologie und Hepatologie
29. November '04	3. Staatsexamen
05. Januar '05	Erteilung der Approbation
01. März '05	Beginn der ärztlichen Tätigkeit als Assistenzarzt, Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Psychiatrie III, (Direktor: Prof. Dr. Dr. M. Spitzer)