



DER HIPPOCAMPUS IN VITRO IM DIENSTE DER EPILEPSIEFORSCHUNG

Hans-Rudolf Olpe and Helmut Haas*

CIBA-GEIGY AG
Biologie Departement
K-125.11.09
CH - 4002 Basel

* Neurochirurgische Universitätsklinik
CH - 8091 Zürich

ZUSAMMENFASSUNG

Ein in vitro Versuch wird vorgestellt, der in den letzten Jahren im Rahmen der Epilepsieforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Dünne Gewebsschnitte aus dem Hippocampus des Rattenhirns gewonnen, können über 10 Stunden lang in vitro am Leben erhalten werden. Nach Zugabe von Neurotoxinen oder gezielter Veränderung der Zusammensetzung des Perfusionsmediums zeigen die Zellverbände im Schnitt typische epilepsieartige Entladungen vergleichbar mit den in einem epileptischen Fokus in vivo messbaren Aktivitäten. Verschiedene, klinisch etablierte Antiepileptika, hemmen diese Entladungen in reversibler Weise, wenn sie während einiger Minuten auf die Schnitte einwirken. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass die Versuchsanordnung für die Entwicklung neuer Antiepileptika verwendet werden kann. Die Versuchsanordnung wird vorgestellt und die Vor- und Nachteile dieses schmerzfreien Versuchs diskutiert.



Wir möchten einen Versuch an dünnen Hirngewebsstücken vorstellen, der in den letzten zehn Jahren im In- und Ausland eine immer breiter werdende Verwendung gefunden hat. Besonders interessant und erfolgsversprechend sind Untersuchungen im Rahmen der Epilepsieforschung, über die wir näher berichten möchten. Die ersten Impulse zur Entwicklung dieser Methode entstammen der Neurochemie und erst Jahre später haben Elektrophysiologen (1), die Vorteile dieses Präparates erkannt und auszunützen begonnen. Abgesehen von bedeutenden methodischen Vorteilen dieser Versuchsanordnung kommt ihr auch im Rahmen der aktuellen Diskussion zur Frage der alternativen Tierversuche eine besondere Bedeutung zu. Mindestens in zwei Hinsichten erfüllt er die Erwartung an moderne Tierversuche. Er bringt eine Verfeinerung der Analyse und führt infolge der guten Reproduzierbarkeit und Quantifizierbarkeit auch zu einer Reduktion der benötigten Tierzahl pro Untersuchung. Pro Experiment wird ein Tier, - meist handelt es sich um eine Ratte -, geopfert und an dem daraus gewonnenen Gewebe kann über 8 Stunden lang gearbeitet werden. In der Grundlagenforschung hat diese Methode bereits zu einer Reduktion der Versuche am lebenden, anaesthesierten Tier geführt. Zahlreiche Hirnforscher verzichten deshalb heute schon weitgehend auf derartige Versuche. Für spezielle Fragestellungen sind diese jedoch immer noch notwendig. Ein vollständiger Ersatz der Versuche am lebenden, narkotisierten Tier durch in vitro Verfahren ist zur Zeit nicht möglich.

Der präparative Teil des Versuchs sei nur ganz summarisch dargestellt. Das Versuchstier wird in Narkose dekapitiert. Möglichst schnell wird das Gehirn herauspräpariert und die beiden unter der Hirnrinde lokalisierten Hippocampi freiseziert. Mittels einer mechanisch geführten Rasierklinge werden etwa 0.3 bis 0.4 mm dicke Gewebsschnitte hergestellt. Diese werden in einer Perfusionskammer auf einem feinen Netz deponiert und von einer Nährlösung umspült. Die etwa 3 x 7 mm grossen Schnitte präsentieren sich dem Experimentator wie auf Abbildung 1 dargestellt.

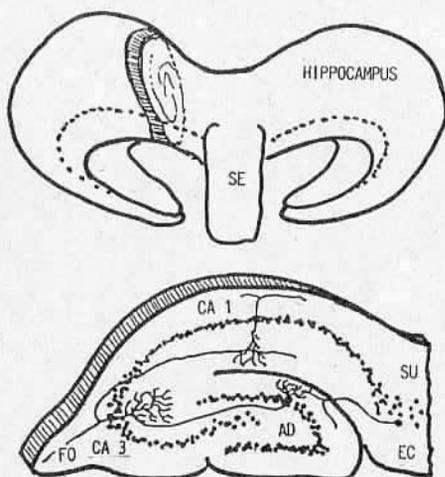


Abbildung 1: Der paarige Hippocampus, aus einem Rattenhirn herauspräpariert. Ein Schnitt ist eingezeichnet und unten vergrössert dargestellt. Die Zellschichten und Faserverbindungen können direkt mit einem Mikroskop am lebenden Präparat beobachtet und mit Mikrogeräten stimuliert werden. Ebenso kann die elektrische Aktivität registriert werden. SE: Septum ; CA: hippocampusregionen (auch Cornua Ammonis genannt) ; AD: area dentata ; FO: Fornix ; SU: Subiculum ; EC: Entorhinaler Cortex.

Die ausgeprägt lamelläre Strukturierung des Hippocampus erstreckt sich entlang seiner ganzen Longitudinalachse. Koronalschnitte, wie sie hier verwendet werden, beinhalten daher alle Zellelemente dieser Hirnstruktur in ihrer normalen Verschaltung. Nach einer ca 1-stündigen Erholungsphase kann mit dem eigentlichen Experimentieren begonnen werden. Platziert man eine mit Kochsalzlösung gefüllte feine Glaselektrode (Spitzendurchmesser ca $1 \mu\text{m}$) in die Hauptzellschicht, so registriert man spontane Aktionspotentiale einzelner Pyramidalzellen, oder auch gelegentlich gruppiert auf



treten die Potentiale (komplexe Entladungen). Experimentell kann nun ein epileptischer "Anfall" evoziert werden. Generell gilt, dass sämtliche Krampfgifte, welche am Ganztier einen epileptischen Anfall auszulösen vermögen, auch am isolierten Hirnschnitt *in vitro* epilepsieartige Erscheinungen hervorrufen. Zusätzlich, und dies ist für die Erforschung epileptischer Basismechanismen besonders interessant, kann auch durch selektive Veränderung der Zusammensetzung des Perfusionsmediums epilepsieartige Aktivität induziert werden. Aus Untersuchungen am epileptischen Herd *in vivo* ist bekannt, dass sich der Ca^{2+} -Gehalt vor und während des Krampfes stark senkt und jener von K^+ erhöht. Derartige Veränderungen können am Schnitt *in vitro* simuliert werden. Die Möglichkeit epilepsieartige Aktivität durch Veränderungen des ionalen Milieus zu induzieren, wird erst seit kurzem studiert. Wir haben gezeigt, dass durch Reduktion des Kalziumspiegels und bei gleichzeitiger Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration im Perfusionsmedium epilepsieartige Aktivität induziert werden kann (2). Auch Blockierung der K^+ -Verfügbarkeit durch K^+ -Kanalblocker, wie etwa 4-Aminopyridin, führt nach kurzer Zeit zum gleichen Resultat. Auf welchem Wege man auch die Epilepsie auslöst, die Hippocampusschnitte zeigen eine über Stunden andauernde epilepsieartige Aktivität welche nun bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber Antiepileptika untersucht werden kann. Ferner können Basismechanismen studiert werden, die mit dem Phänomen der Epilepsie verknüpft sind. Solche Untersuchungen haben in den letzten paar Jahren ganz erheblich zu einem vertieften Verständnis der "epileptischen" Zellprozesse geführt, die mittels Ganztierversuchen wahrscheinlich nicht so schnell eruiert worden wären. Abbildung 2 gibt einen schematischen Ueberblick über jene zellulären Faktoren, die aus elektrophysiologischer Sicht am epileptischen Geschehen beteiligt sind. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Pyramidenzellschicht des Hippocampus. Epileptogen wirken, wie bereits erwähnt, chemische Veränderungen, die die Wirkung hemmender Zwischenneurone abschwächen. In diesem Sinne wirken die Neurotoxine Bicucullin

und Pikrotoxin oder das Antibiotikum Penicillin (das glücklicherweise nicht aus der Blutbahn ins Gehirn gelangt). Ein wesentliches Charakteristikum der Epilepsie ist die Synchronisation der einzelnen Zellelemente. Diese Kopplung geschieht sowohl über synaptischen Kontakt wie auch in Abwesenheit synaptischer Verbindungen etwa wenn der Ca^{2+} -Gehalt im Medium gesenkt wird, durch elektrische Feldeffekte (ephaptische Uebertragung) und Kaliumionen. Die ausgeprägte Anfälligkeit des Hippocampus für epileptische Anfälle ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass die Zellen und insbesondere ihre Axone und Dendriten sehr dicht gebündelt angeordnet sind. Diese Situation begünstigt die Ausbreitung von Erregungswellen.

Angriffspunkte der Epilepsieentstehung

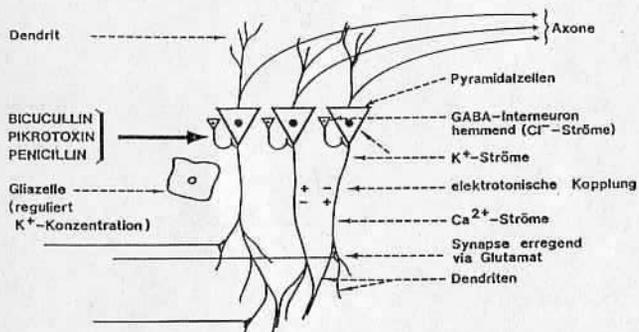


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Pyramidalzellschicht des Hippocampus. Im Falle der durch GABA-Blocker ausgelösten Epilepsie (Bicucullin, Pikrotoxin, Penicillin) wird die hemmende Wirkung der GABA-Interneurone ausgeschaltet. Diese Enthemmung führt in der Folge zu einer ausgeprägten Hyperaktivität der Pyramidalzellen. Die elektroneuronische Kopplung zwischen benachbarten Zellen spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der für die Epilepsie typischen Synchronisation der Zellaktivität. Bei der Entstehung rhythmisch auftretender langdauernder Zellentladungen sind die K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle involviert. Eine nicht unwichtige, noch genau zu bestimmende Funktion spielen die Gliazellen, welche via Regulation der extrazellulären K^+ -Konzentration die Erregbarkeit des Gewebes massgeblich beeinflussen.

Zusätzlich zur Synchronisation zeichnen sich epileptische Zellen durch langandauernde, sogenannte paroxysmale Depolarisationen aus.

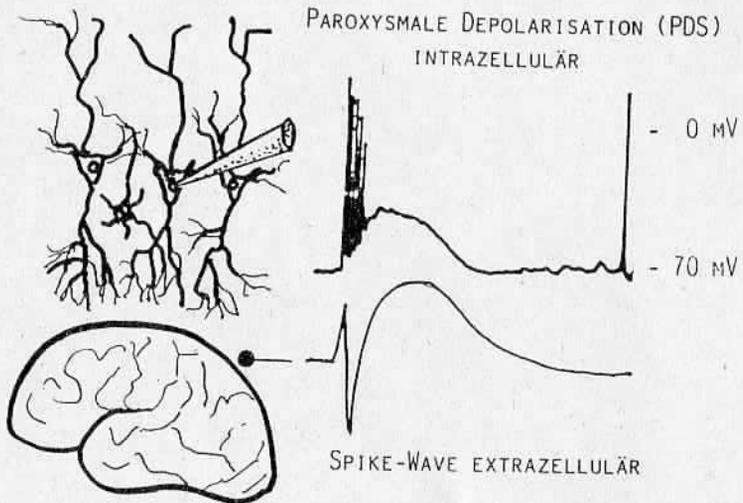


Abbildung 3: Intrazelluläre Ableitung einer PDS von einer hippocampalen Pyramidenzellen im Schnittpräparat und das dazu gehörige charakteristische Spike-Wave-Muster im EEG. Länge der Ableitung: 0,4 sec; das EEG (unten) ist schematisch angegeben, etwa 1000 mal mehr verstärkt als die intrazelluläre Ableitung (oben).

Zelleigene, intrinsische und durch Zwischenneurone vermittelte Hemmechanismen beenden nach jeder Aktivierung die Entladung der Zelle. Diese Hemmungen beruhen auf einer ganzen Reihe von Strömen, die in den Zellmembranen aktiviert werden. Es handelt sich etwa um verschiedene spannungsabhängige Kaliumströme, Ca^{2+} -aktivierbare K^+ -Ströme und um Cl^- -Ströme. Der Mechanismus der zu dieser Depolarisation führt, ist noch nicht definitiv abgeklärt.



Es scheint aber, dass das Gleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Prozessen gestört ist ; wahrscheinlich sind je nach Epilepsietyp unterschiedliche Hemmechanismen reduziert. Untersuchungen am Hippocampuschnitt werden uns zweifellos in den kommenden Jahren über diese wichtigen zellpathologischen Prozesse der Epilepsie wertvolle Auskünfte geben. Dank der methodologischen Verfeinerung die die Schnitttechnik erbracht hat, konnten kürzlich interessante Befunde an den Dendriten der Pyramidalzellen erhoben werden. Mittels feinsten Glaselektroden wurden intrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen an Dendriten durchgeführt und zwar an Schnitten, die durch Penicillinexposition epileptisch verändert waren. Die Dendriten zeigten ein durch repetitive Zellentladungen charakterisiertes Aktivitätsmuster (burst firing). Diese Befunde dokumentieren, dass dendritische Membranmechanismen bei der Epilepsie eine wichtige, noch genau abzuklärende Rolle spielen.

Neben den rein theoretischen Erkenntnissen, die durch derartige Studien ermöglicht wurden, stellt sich die wichtige Frage nach der praktischen Verwendbarkeit und dem daraus zu erwartenden medizinisch-therapeutischen Gewinn. Exakte Prognosen sind schwierig. Erfolg und Fortschritt werden in entscheidender Weise davon abhängen, welche neuen Erkenntnisse in den kommenden Jahren anfallen werden. Experimentell induzierte Epilepsien sprechen auf zahlreiche therapeutisch etablierte Antiepileptika an. Die in vitro Krampfanfälle werden durch letztere unterdrückt. Es ist sehr wohl denkbar, dass diese Versuchsanordnung auch zu Screening-Zwecken verwendet werden kann. Es sind aber noch einige Fragen abzuklären, bevor man den Versuch vorbehaltlos für diesen Zweck einsetzen kann. Vorallem gilt es sorgfältig abzuklären, welche der verschiedenen Krampfmodelle sich am besten dafür eignen, also, ob beispielsweise die Epilepsie am besten durch Veränderung des Mediums oder durch Zugabe eines Neurotoxins ausgelöst wird, und ob bestimmte Modelle für spezifische Epilepsieformen verwendbar sind. Im Moment ist die Frage offen, ob sich Medikamente zur Behandlung von Epilepsien des Typ "Grand



Mal" von jenen, die zur Behandlung von "Petit Mal" Anfällen verwendet werden, differenzieren lassen. In unseren eigenen Versuchen an Schnitten, die durch Penicillinexposition epileptisch verändert wurden, geht hervor, dass eine Reihe klinisch verwendeter Antiepileptika in diesem Modell aktiv sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 :

Substanz	Aktive Schwellenkonzentration im Penicillinmodell
Carbamazepin	8 μM
Phenobarbital	100 μM
Diazepam	20 μM
Valproat	1 mM
Ethosuximid	1 mM (schwach wirksam)

Die Vorteile gegenüber konventionellen screening Tests sind folgende :

1. kontrolliertes und veränderbares Testmilieu
2. bekannte Substanzkonzentration am Wirkort
3. direkte Erfassung des epileptischen Prozesses
4. kein Versuch am Lebenden Tier
5. wiederholte Messungen am gleichen Gewebe
6. weniger unkontrollierte Faktoren.

Allerdings ergeben sich auch ein paar Nachteile. Ein Hauptproblem einiger der heute verwendeten Antiepileptika besteht darin, dass sie im therapeutischen Dosenbereich sedierend sind.

Dieser gravierende Seiteneffekt lässt sich aber am konventionellen Ganztierexperiment oft schon im voraus erkennen, nicht dagegen am Schnittmodell. Ein weiteres Problem entsteht dadurch, dass die am Ganztier vorhandene Blut-Hirnschranke, die das Eintreten bestimmter Verbindungen ins Hirn verhindert oder wenigstens beschränkt, im Schnittmodell nicht vorhanden ist. Dieser Sachverhalt ist unter Umständen auch als Vorteil zu werten, nämlich insofern, als dadurch aktive Substanztypen gefunden werden, die man am lebenden Tier verpassen würde. Die eben angestellten Überlegungen zeigen, dass auf Versuche am Tier im Rahmen der Entwicklung von Antiepileptika nicht verzichtet werden kann.

Die meisten der heute verwendeten *in vitro* und *in vivo* Versuche zum Testen von Antiepileptika haben ausgesprochenen Modellcharakter. Die epileptogenen Faktoren der humanen Epilepsie sind noch nicht erschöpfend erforscht. Erst wenn diese genügend bekannt sind, wird man in der Lage sein, optimale Versuchsbedingungen festzulegen. Bei der Abklärung dieser wichtigen Frage wiederum nehmen *in vitro* Untersuchungen mit Gewebsschnitten aus humanem Biopsiematerial eine zentrale Stellung an. An solchen Schnitten ist bereits gezeigt worden, dass sich Zellen im epileptischen Herd des menschlichen Neokortex durch starke Gruppenentladungen (burst firing) und langdauernde Depolarisationen auszeichnen, wie dies oben für verschiedene Epilepsien *in vitro* am Rattenhippocampus gezeigt worden ist (3). Diese vorläufigen Ergebnisse der *in vitro* Versuche am tierischen Gewebe haben den Weg bereitet zu einem brauchbaren Modell für eine weit verbreitete und oft schwer zu behandelnde Krankheit.



LITERATUR

- (1) ANDERSEN, P., BLISS, T.V.P. & SKREDE, K.K. (1971) : Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research* 13, 222-238.
- (2) HAAS, H.L. & JEFFERYS, J.G.R. (1984) : Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices. *J. Physiol.* 354, 185-201.
- (3) PRINCE, D.A. & WONG, R.K.S. (1981) : Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Research* 210, 323-333.

„ETWAS AUFWENDIGER
SIND DIESE IN VITRO - TESTS
NATÜRLICH SCHON.“

