

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. A. Baethmann

**Die Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Azidose von
Gliazellen -
Bedeutung von Anionen und Kalzium**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Alexander Ringel
München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Baethmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Konnerth

Mitberichtersteller: Prof. Dr. J. Herms

Prof. Dr. G. Hamann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Priv. Doz. Dr. N. Plesnila

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

14.10.2004

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

A) Einleitung	7
1. Epidemiologie ischämisch/traumatischer Hirnschäden	7
2. Pathophysiologie, Sekundärschaden, Penumbra	8
3. Mediatoren des Sekundärschadens – die Gewebeazidose	10
4. Hirnödem/Zellschwellung	11
5. Mechanismen der Azidose-induzierten Zellschwellung	13
6. Sekundärschaden und Kalziumionen	14
7. Zielsetzung dieser Studie	16
B) Material und Methoden	17
1. Zellkultur	17
1.1 C6 Gliomzellen	17
1.2 Zellkultivierung	17
1.3 Subkultivierung	18
1.4 Zellernte für den Versuch	18
1.5 Färbung von saurem Gliafaserprotein - GFAP	19
2. Zellsuspension	21
2.1 Suspensionskammer	21
2.2 Kontrollparameter	23
2.2.1 Messung des pH im Medium (pH _e)	23
2.2.2 Messung von pO ₂ , pCO ₂ und der Bikarbonatkonzentration im Medium, Berechnung der intrazellulären Bikarbonatkonzentration	23
3. Bestimmung der Zellzahl	24
4. Zellvitalität	24
5. Osmolarität	24
6. Durchflusszytometrie des Zellvolumens	25
6.1 Messprinzip	25
6.2 Messsystem und Durchführung der Volumenbestimmung	27
7. Durchflusszytometrie des intrazellulären pH	28
7.1 Messprinzip	28
7.2 Beladung von Zellen mit BCECF	29
7.3 Aufbau der Messsystems und Durchführung der Messung	30
7.4 Kalibrierung	31
8. Versuchsablauf	36
9. Versuchsgruppen	38
9.1 Kontrollversuche	38
9.2 Versuche zur Bedeutung von Anionentransportprozessen	38
9.2.1 Chlorid-freies Medium	38
9.2.2 Bikarbonat/CO ₂ -freies Medium	39
9.2.3 DIDS	39
9.2.4 Niflummat	40
9.2.5 Bumetanid	40
9.2.6 Furosemid	41
9.2.7 NPPB	41
9.2.8 Probenecid	42
9.3 Einfluss von intra- und extrazellulären Kalziumionen	42
10. Datenauswertung, -darstellung und Statistik	44

C) Ergebnisse	45
1. Kontrollversuche	45
2. Wirkung der Azidoseexposition auf das Zellvolumen und den intrazellulären pH	46
3. Bedeutung von Anionen für die Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Azidose	48
3.1 Chlorid-freies Medium	49
3.2 HCO ₃ ⁻ /CO ₂ -freie Versuchsbedingungen	51
3.3 DIDS	53
3.4 Niflummat	55
3.5 Bumetanid	57
3.6 Furosemid	57
3.7 NPPB	60
3.8 Probenecid	63
4. Bedeutung von Kalziumionen	64
4.1 Kalzium-freies Medium pHe 7,4	64
4.2 Kalzium-freies Medium pHe 6,2	66
4.3 Intrazelluläre Kalziumchelierung	66
4.4 Intrazelluläre Kalziumchelierung und Kalzium-freies Medium	70
D) Diskussion	72
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	72
2. Methodendiskussion	73
2.1 Das <i>in vitro</i> Modell	73
2.2 C6 Gliomzellen als Modellzellen	74
2.3 Messung des Zellvolumens	77
2.4 Methode der fluorimetrischen pH _i -Messung	78
3. Die Milchsäureazidose als Mediator des zerebralen Sekundärschadens	80
4. Zellschwellung durch Milchsäureazidose – Mechanismen	84
4.1 Bisheriges Konzept der Azidose-induzierten Zellschwellung	84
4.2 Kontrollversuche – Azidoseschwellung und pH _i	86
4.3 Versuche zu Anionentransportern und -kanälen	88
4.3.1 Anionentransporter und Chlorid-Kanäle	88
4.3.1.1 pH-regulatorische Anionentransporter	88
4.3.1.2 Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransport	90
4.3.1.3 Zell-Volumen-sensitive Chlorid-Kanäle	91
4.3.2 Die Inhibition von pH-regulatorischen Anionentransportern	92
4.3.3 Die Inhibition des Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransports	95
4.3.4 Die Inhibition von Chlorid-Kanälen	97
4.4 Versuche zur Bedeutung von Kalziumionen	99
4.4.1 Kalziumhomöostase und ihre Störung durch Azidose	99
4.4.2 Die Bedeutung von Kalziumionen für die Regulation des Zellvolumens	100
4.4.3 Die Azidose-induzierte Schwellung in Kalzium-freiem Medium bzw. unter Applikation des Kalzium-Chelators BAPTA-AM	101

E) Zusammenfassung	102
F) Literaturverzeichnis	105
G) Danksagung	124
H) Veröffentlichungen	125
I) Lebenslauf	126

A) Einleitung

1. Epidemiologie ischämisch/traumatischer Hirnschäden

In einer 1998 publizierten epidemiologischen Studie wurde die altersstandardisierte jährliche Inzidenz für Erst-Schlaganfälle in der Stadt Erlangen auf 1,74 pro 1000 Einwohner beziffert (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Die Gliederung der pathologischen Subtypen zeigte ein Überwiegen von ischämischen Infarkten bei 78,5 % der Patienten, gefolgt von intrazerebralen Blutungen (13,6 %), spontanen Subarachnoidalblutungen (3,4 %) während 4,5 % nicht klassifizierbar waren. In der Annahme, dass diese Angaben für die Bundesrepublik Deutschland (Bevölkerung von 82 Mio) repräsentativ sind, erleiden ca. 112.000 Menschen pro Jahr erstmals einen ischämischen Hirninfarkt. Unter Einbeziehung von wiederholten Schlaganfällen erleiden etwa 350.000 Menschen pro Jahr einen Hirninfarkt. Auch wenn es zwischen 1970 und 1985 zum deutlichen Rückgang der Schlaganfall-Mortalität gekommen ist (Bonita et al., 1990; Thom, 1993), beträgt die 28-Tage-Letalität derzeit immerhin 11,5 %. d.h. jährlich versterben 12.880 Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen an ihrem ersten ischämischen Hirninfarkt. Der Schlaganfall rangiert hinter malignen Neoplasien und kardialen Erkrankungen auf Platz drei der Todesursachenstatistik. Überlebende Patienten haben wegen ihrer verbleibenden neurologischen Defizite eine mehr oder weniger eingeschränkte Lebensqualität. Jeder zweite Patient ist arbeitsunfähig (Poeck, 1990) und benötigt eine kostenaufwendige Pflege, nur wenige Patienten erreichen eine vollständige Erholung.

Nicht weniger bedeutend ist das Schädel-Hirn-Trauma. In der Altersgruppe der unter 45jährigen sind Schädel-Hirn-Traumen die häufigste Todesursache (Jennett, 1996). Ein Drittel der an einem Trauma verstorbenen Patienten haben ein Schädel-Hirn-Trauma als führende Todes-Ursache (Jennett, 1992). 50 % der fatal verlaufenden Schädel-Hirntraumen haben einen therapierefraktären intrazerebralen Druckanstieg wegen eines Hirnödems (Miller et al., 1977). 90 % der verstorbenen Patienten haben ischämische Nekrosen des Gehirns (Graham et al., 1989b). Neben ihrer hohen Mortalität sind Schädel-Hirn-Verletzungen die führende Ursache von lebenslangen Behinderungen durch Unfälle, sie sind ca. 40 mal häufiger für diese verantwortlich als traumatische Rückenmarksschädigungen.

Diese Zahlen belegen eindrucksvoll die individuelle als auch gesellschaftliche Bedeutung des Schlaganfalls und des Schädel-Hirntraumas – damit die Notwendigkeit besserer Behandlungsstrategien. Neben präventiven Maßnahmen muss die Verbesserung des Outcome im Mittelpunkt der Anstrengungen liegen. Das Ziel ist, nicht nur die Mortalität zu senken

sondern auch das Ausmaß der Folgeschäden zu verringern, um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und eine gesellschaftliche und berufliche Reintegration auf hohem Niveau zu ermöglichen.

2. Pathophysiologie, Sekundärschaden, Penumbra

Die neuropathologischen Folgen des ischämischen Hirninfarkts und des Schädel-Hirn-Traumas können - vereinfacht - als Primär- und Sekundärschaden des Gehirns charakterisiert werden. Der primäre Hirnschaden beim schweren Schädel-Hirn-Trauma ist der im Augenblick des Unfalls entstehende irreversible Gewebeverlust. Hierzu gehören Parenchymquetschungen, Kontusionen und der diffuse Axonschaden. Der Primärschaden ist irreversibel, ergo therapeutischen Interventionen nicht zugänglich. Bemühungen einer besser wirksamen Therapie beziehen sich deshalb auf die Hemmung der Mechanismen des Sekundärschadens. Der Begriff 'Sekundärschaden' subsummiert die neuropathologischen Folgen der pathophysiologischen Prozesse, die durch den Primärschaden ausgelöst werden und nachfolgend (Stunden, Tage) den irreversiblen Parenchymschaden des Gehirns vergrößern (Baethmann, Kempfski, 1992). Hierzu gehört u.a. die 'Reifung' des ischämischen Infarkts, d.h. die endgültige Ausdehnung der ischämischen Pannekrose nach einem Insult oder bei Kontusionen durch ein Schädel-Hirn-Trauma die Vergrößerung der traumatischen Läsion durch das sekundäre Nekrosewachstum. Auch der verzögerte Untergang von selektiv vulnerablen Neuronen nach globaler Ischämie ist eine Manifestation des sekundären Hirnschadens. Sekundär ischämische Schäden des Gehirns können bei fast 90 % aller an einem Schädel-Hirn-Trauma verstorbenen Patienten gefunden werden (Graham et al., 1989a).

Der 1975 von Reilly veröffentlichte Artikel: „Patients with head injury who talk and die“ illustriert eindrucksvoll die klinische Bedeutung des Sekundärschadens durch eine Hirnverletzung (Reilly et al., 1975). Die Autoren beschreiben Patienten, die unmittelbar nach einem Schädel-Hirn-Trauma auch bei der Klinikeinlieferung noch bei Bewusstsein waren und sprechen konnten, im weiteren Verlauf allerdings rasch eintrübten und verstarben. In vielen experimentellen und klinischen Studien ist die Vergrößerung des Hirnschadens durch sekundäre Mechanismen nach einer zerebralen Ischämie oder einem Schädel-Hirn-Trauma dargestellt und quantifiziert worden (Baird et al., 1997; Heiss et al., 1992; Eriskat et al., 1994; Stein et al., 1993; Reilly et al., 1975).

Von exemplarischer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die 'Penumbra', eine anschauliche Beschreibung der noch vitalen Randzone einer ischämischen Nekrose, die auf Astrup, Symon und Lassen zurückgeht (Astrup et al., 1977; Astrup et al., 1981). Neben dem ischämischen Infarkt selbst, der durch die dramatisch verminderte Durchblutung untergegangenes Gewebes repräsentiert, befindet sich vitales Gewebe, dessen Funktion erloschen ist, wenngleich die Struktur erhalten geblieben ist. In diesem Gewebe, das in Analogie zum Halbschatten einer Mondfinsternis als 'Penumbra' bezeichnet wird, ist die Durchblutung nicht unter den Schwellenwert der Infarzierung abgesunken. Allerdings kann auch die Penumbra im weiteren Verlauf durch die Mechanismen des sekundären Hirnschadens (z.B. weitere Durchblutungsabnahme, exzitotoxische Mediatoren u.a.m.) untergehen und damit den ischämischen Infarkt vergrößern. Im Gegensatz zum Hirninfarkt ist beim Schädel-Hirn-Trauma eine 'Penumbra' nicht klar definiert. Wegen der häufig disseminierten Verteilung von irreversiblen Parenchymnekrosen kann eine 'Penumbra' kaum abgegrenzt werden. Gleichwohl könnte das an eine traumatische Kontusion angrenzende Parenchym 'Penumbra'-ähnliche Eigenschaften haben

Die durch bekannte wie unbekannte Mechanismen des sekundären Hirnschadens gefährdete 'Penumbra' könnte durch wirksame Neuroprotektion vor dem Untergang prinzipiell bewahrt werden. Grundlage dieser Neuroprotektion ist jedoch die Kenntnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen des Sekundärschadens. Die Identifizierung dieser Mechanismen - auch auf zellulärer und molekularer Ebene - ist seit Jahren Schwerpunkt der Forschung.

3. Mediatoren des Sekundärschadens – Die Gewebeazidose

Eine Reihe wichtiger Faktoren und Mechanismen des sekundären Hirnschadens beim Schlaganfall und Schädel-Hirn-Trauma sind bereits bekannt. Neben den exzitotoxischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat (Van Harreveld, Fifkova, 1971; Baethmann, 1989), den freien ungesättigten Fettsäuren, z.B. Arachidonsäure (Chan, Fishman, 1978), freien Radikalen (Chan, 1996), der erhöhten interstitiellen Kaliumkonzentration (Kimmelberg, Ransom, 1986), elektrophysiologischen Veränderungen z.B. der Periinfarkt-Depolarisation (Hossmann, 1996), dem intrazellulären Kalzium-Overload (Kristian, Siesjo, 1998b) oder den aktiven Peptiden des Kallikrein-Kinin-Systems (Wahl et al., 1988; Unterberg et al., 1986), hat die Gewebezidose eine wichtige Funktion als Mediator des sekundären Hirnschadens (Siesjo, 1988).

Bei der zerebralen Ischämie kommt es durch Aktivierung der anaeroben Glykolyse und hydrolytischen Spaltung von ATP im Hirngewebe zur Akkumulation von Milchsäure mit Absinken des pH (Siesjo, 1988; Siesjo et al., 1996). Das Ausmaß der resultierenden Gewebezidose wird u.a. vom Glukosespiegel im Blut beeinflusst, ein Zusammenhang der u.a. von Nakai und Mitarbeitern autoradiographisch deutlich gemacht werden konnte (Nakai et al., 1988). Während unter normoglykämischen Bedingungen der pH im ischämischen Gewebe auf 6,5-6,0 sinken kann (Siesjo, 1988; Nedergaard et al., 1991b; Nakai et al., 1988), verstärkt ein erhöhter Glukosespiegel die Azidose nachhaltig durch vermehrte Milchsäurebildung. Unter solchen Bedingungen kann der interstitielle pH unter 6,0 fallen (Nedergaard et al., 1991b; Nakai et al., 1988). Unter hypoglykämischen Bedingungen hingegen kann die Entwicklung einer Gewebezidose durch Ischämie ausbleiben (Nedergaard et al., 1991b). Weiterhin ist beobachtet worden, dass ein erhöhter Glukosespiegel im Blut beim Schlaganfall zur Vergrößerung des ischämischen Infarkts mit Zunahme der Mortalität führen kann (Siesjo, 1988; Nedergaard, 1987; Pulsinelli et al., 1982b; Kalimo et al., 1981). Die Injektion von Milchsäure in Hirngewebe induziert *per se* eine Parenchymnekrose (Kraig et al., 1987; Petito et al., 1987). Ähnliche Folgen hat die experimentelle Hyperkapnie bei der zerebralen Ischämie mit respiratorischer Erniedrigung des Gewebe-pH im Gehirn (Katsura et al., 1994), als Indiz für die pathophysiologische Funktion einer Azidose *per se* – unabhängig davon, ob eine Milchsäure- oder CO₂-Akkumulation zugrunde liegt. In klinischen Untersuchungen konnten diese experimentell erhobenen Befunde teilweise bestätigt werden (Weir et al., 1997; Wass, Lanier, 1996).

Von der zerebralen Ischämie abgesehen können auch ein schweres Schädel-Hirn-Trauma, ein epileptischer Anfall oder eine fulminante Meningitis eine Hirngewebsazidose hervorrufen, die unter diesen Bedingungen ebenfalls den Hirnschaden verstärkt (Siesjo, 1988; Marmarou, 1992; Tombaugh, Sapolsky, 1993).

Obwohl die schädigende Wirkung einer Laktazidose unumstritten ist, sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen keineswegs endgültig geklärt. Neben der Produktion von freien Radikalen (Siesjo et al., 1985; Siesjo et al., 1996) wird die Ausbildung eines Hirnödems als ein zentraler Mechanismus angesehen (Pulsinelli et al., 1982a; Berger, Hakim, 1986; Morimoto et al., 1993). Für letzteres spricht, dass eine Pufferung mit Thromethamin unter experimentellen und klinischen Bedingungen das Hirnödem therapeutisch beeinflusst (Yoshida, Marmarou, 1991; Rosner, Becker, 1984; Muizelaar et al., 1991). Eine klinisch erfolgreiche Therapie des Azidose-induzierten Hirnödems setzt jedoch weitere Kenntnisse der pathophysiologischen Grundlagen auf zellulärer und molekularer Ebene voraus.

4. Hirnödem - Zellschwellung

Das Hirnödem spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung des zerebralen Sekundärschadens bei der Ischämie und beim Schädel-Hirn-Trauma. Es ist die häufigste zum Tode führende Komplikation in der Frühphase (1 Woche) nach einem Schlaganfall (Hacke et al., 1996; Ropper, Shafran, 1984). Auch beim schweren Schädel-Hirn-Trauma mit fatalem Ausgang liegt in 50% der Fälle ein therapierefraktäres Hirnödem zugrunde (Miller et al., 1977). Das Hirnödem ist als Anstieg des zerebralen Wassergehaltes definiert, der zur Zunahme der Gewebemasse, d.h. des Hirnvolumens führt (Pappius, 1974). Das Gehirn ist bei einer Größenausdehnung durch die Meningen und das knöcherne Kraniaum begrenzt. Deshalb führt eine Hirnschwellung, sobald die intrakraniellen Reserveräume 'verbraucht' sind, zur Zunahme des intrakraniellen Drucks und ggf. zur Herniationen des Gehirns mit letalem Ausgang (Plum, Posner, 1980).

1905 hat der Psychiater M. Reichhardt auf makroskopischen Unterschieden der Schnittflächen des Gehirns bei der Sektion basierend zwei unterschiedliche Formen des Hirnödems beschrieben. Er sprach von einer 'Hirnschwellung', wenn beim vergrößerten Gehirn die Schnittflächen 'trocken' waren und von einem 'Hirnödem', wenn Flüssigkeit aus den Schnittflächen austrat (Reichhardt, 1905).

1967 führte Igor Klatzo, auf der Grundlage neuropathologisch spezifischer Merkmale, die heute allgemein anerkannte Terminologie des 'vasogenen' und 'zytotoxischen' Hirnödems ein (Klatzo, 1967).

Der zentrale Mechanismus des primär vasogenen Hirnödems ist die Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke. Unter normalen Bedingungen ist die von 'tight junctions' des Gefäßendothels gebildete Schranke für polare, lipophobe (hydrophile) Substanzen und Makromoleküle wie z.B. Proteine undurchlässig, so dass diese aus dem Intravasalraum nicht in das Interstitium des Gehirns übertreten können. Beim vasogenen Hirnödem (z.B. durch Trauma) kommt es zur Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke, die Barriere-Funktion geht verloren und höhermolekulare Plasmabestandteile treten in den Interzellulärraum des Gehirns ein. Dadurch kommt es dort zum Anstieg des osmotischen und onkotischen Drucks – damit zur Flüssigkeitsretention im Gehirn. Diese Form findet man auch als perifokales Hirnödem bei raumfordernden Prozessen, z.B. Tumoren oder Abszessen, bei hypertensiven Krisen oder beim massiven ischämischen Infarkt (Baethmann, 1978). Das vasogene Hirnödem tritt selten isoliert auf, häufig kommt es bei den o.g. Prozessen auch zur Schwellung von Zellen des Hirnparenchyms, dem zytotoxischen Hirnödem.

Im Gegensatz zur interstitiellen Flüssigkeitsaufnahme durch die permeable Blut-Hirn-Schranke beim vasogenen Ödem, ist die Blut-Hirn-Schranke beim primär zytotoxischen Ödem intakt. Es kommt hier zur Expansion des Zellvolumens auf Kosten des schrumpfenden Extrazellulärraums. Von der zytotoxischen Zellschwellung sind hauptsächlich Astrozyten, Myelinscheiden oder Dendriten betroffen. Diese Ödemform wird bevorzugt in der Frühphase der fokalen zerebralen Ischämie gefunden oder bei schweren Stoffwechsellentgleisungen, z.B. im Leberkoma. *Per definitionem* ist eine Verlagerung von Flüssigkeit aus dem Extra- in den Intrazellulärraum allerdings noch kein Hirnödem, solange es nicht zu einer Netto-Zunahme des Hirnvolumens gekommen ist. Die zum zytotoxischen Hirnödem führende Schädigung erfolgt vielmehr durch das Versagen zellulärer Funktionen, z.B. der Clearance von Neurotransmittern und Kaliumionen aus dem Interstitium mit Verkleinerung der extrazellulären Diffusionsräume. Bei der globalen oder fokalen Ischämie kommt es in der Reperusionsphase zur zytotoxischen Zellschwellung bei Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranken Funktion, weil die Konzentration osmotischer aktiver Solute im ischämischen Parenchym während der Ischämiephase angestiegen ist. Dies führt bei Wiederkehr der Durchblutung zur Netto-Flüssigkeitsaufnahme somit definitionsgemäß zum Hirnödem ggf. mit einer intrakraniellen Drucksteigerung (Hossmann, 1989).

Unter *in vitro* Bedingungen sind verschiedene Mediatoren der astrozytären Zellschwellung untersucht und charakterisiert worden. Neben der exzitotoxischen Aminosäure Glutamat (Schneider, 1998), der erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration (Walz, Hertz, 1983; Kimelberg, Ransom, 1986; Kempfski et al., 1992) oder Arachidonsäure (Staub et al., 1994b) hat die Azidose eine wichtige Mediatorfunktion bei der zytotoxischen Zellschwellung (Staub et al., 1990).

5. Mechanismen der Azidose-induzierten Zellschwellung

In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass Glia- und Nervenzellen durch eine ausgeprägte Azidose abhängig von Dosis und Dauer der Exposition absterben (Goldman et al., 1989; Staub et al., 1990; Giffard et al., 1990; Norenberg et al., 1987; Nedergaard et al., 1991a). Subletale Azidosegrade induzieren eine Zunahme des Zellvolumens d.h. eine zytotoxische Zellschwellung (Jakubovicz et al., 1987; Kempfski et al., 1988; Staub et al., 1990; Staub et al., 1993a). Die Zellschwellung von astrozytären Zellen beginnt bereits bei einem extrazellulären pH-Wert unterhalb 6,8 und ist dosisabhängig. Gleichzeitig mit der Zellvolumenzunahme wird ein Absinken des intrazellulären pH (pH_i) beobachtet, dessen Ausmaß ebenfalls vom Schweregrad der Azidose abhängt (Mellergard, Siesjo, 1991; Mellergard et al., 1994; Plesnila et al., 1999). Es wird angenommen, dass die Azidose zur Störung der Ionenhomöostase führt und pH-regulatorische Membrantransportprozesse als Mechanismus der Zellschwellung aktiviert (Kempfski et al., 1988).

Ein wichtiges Konzept geht von der Aktivierung des Na^+/H^+ -Antiporters durch die intrazelluläre Azidose aus, der in 1:1 Stöchiometrie Natrium-Ionen aus dem Interstitium gegen intrazelluläre Protonen (H^+ -Ionen) in die Zelle transportiert. Der Ionenaustausch ist elektrisch neutral, folgt entlang dem Natrium-Konzentrationsgradienten und führt zur Akkumulation von Na^+ -Ionen in der Zelle. Daraus resultiert eine Zunahme osmotischer Solute in der Zelle. Der dadurch bewirkte Wassereinstrom ist verantwortlich für die Volumenzunahme. Durch den Na^+/H^+ -Antiport-Inhibitor Amilorid oder eine Elimination von Natriumionen aus dem Medium kann dieser Mechanismus der Zellschwellung gehemmt werden (Jakubovicz, Klip, 1989; Kempfski et al., 1988; Staub et al., 1990). Ein weiterer, vermutlich an der Azidose-induzierten Gliazellschwellung beteiligter pH-regulatorischer Ionenaustauscher ist der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter. Dafür spricht, dass dessen Inhibition durch das Stilbenderivat SITS die Azidose-induzierte Zellschwellung abschwächt, was eine Aktivierung

des Antiporters nahelegt, der durch die Akkumulation von Chlorid-Ionen in der Zelle zur Volumenzunahme beitragen könnte (Kempski et al., 1988). Die Mitwirkung dieses Mechanismus ist allerdings umstritten. In verschiedenen Untersuchungen konnte auch eine Inhibition des Antiporters durch eine intrazelluläre Azidose gefunden werden (Mellergard et al., 1993; Shrode, Putnam, 1994).

6. Sekundärschaden und Kalziumionen

Das zelluläre Ca^{2+} -Overload hat zentrale Bedeutung als Mechanismus der irreversiblen Zellschädigung bei der zerebralen Ischämie, dem Schädel-Hirn-Trauma oder anderen Insulten (Kristian, Siesjo, 1998a; Lynch, Dawson, 1994).

Unter physiologischen Bedingungen haben Kalziumionen eine entscheidende Funktion als 'second messenger' der Signaltransduktion, damit der Regulation vieler zellulärer Prozesse. Die Erhöhung der unter Ruhebedingungen sehr niedrigen zellulären Kalziumkonzentration kann u.a. durch die Aktivierung einer Vielzahl von Kinasen zur Phosphorylierung von Proteinen führen und damit zu deren Aktivitätsänderung (Clapham, 1995). Um die Funktion von Kalziumionen für die Signaltransduktion zu gewährleisten, wird die extra- und intrazelluläre Kalziumkonzentrationen unter normalen Bedingungen in engen Grenzen konstant gehalten. Gegenüber der extrazellulären Konzentration freier Kalziumionen von ca. 1,2 mM herrscht im Zytosol eine ca. 10^4 -fach niedrigere Konzentration von ungefähr 100 nM.

Bei der zerebralen Ischämie oder dem Schädel-Hirn-Trauma kommt es zur massiven Störung der Kalziumhomöostase. Im ischämischen Parenchym wird ein zelluläres Ca^{2+} -Overload mit Absinken der interstitiellen Kalziumkonzentration gefunden (Siesjo, 1992). Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration beruht auf dem Einstrom von Kalziumionen durch Spannungs- bzw. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sowie auf der Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum. Die exzitotoxische Wirkung von Glutamat auf Nervenzellen nach Bindung an NMDA-Rezeptoren ist mit einem Kalziumeinstrom verbunden. Wenngleich die Mechanismen der irreversiblen Schädigung von Nervenzellen durch Kalziumionen gut untersucht sind, ist ihre Bedeutung für die zytotoxische Zellschwellung nicht aufgeklärt.

Hinweise könnten sich ggf. von der Funktion von Kalziumionen für die Volumenregulation von Gliazellen ergeben. In einer Reihe von Untersuchungen ist gezeigt worden, dass die spontane Erholung des Zellvolumens von hypoton suspendierten Astrozyten

kalziumabhängig ist (O'Connor, Kimelberg, 1993). Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer kalziumvermittelten Aktivierung von Kalium- und Chloridkanälen mit Ausstrom dieser Ionen als Mechanismus der Zellvolumenerholung. Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration z.B. durch das Kalzium-Ionophor Ionomycin oder die Suspension von Zellen in kalziumfreiem Medium können das Zellvolumen verändern, als weiterer Hinweis für die Funktion von Kalziumionen für die Volumenhomöostase (unpublizierte Ergebnisse von F. Staub; Olson et al., 1990). Dennoch ist es bisher nicht klar, ob bei der zerebralen Ischämie auftretende Störungen der Kalziumhomöostase an der zytotoxischen Zellschwellung beteiligt sind.

Die Wirkung der extrazellulären Azidose auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration verschiedener Zelltypen kann unterschiedlich sein. Es wird beides, ein Anstieg als auch ein Absinken der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet. Gleichwohl trägt die Azidose zur Störung der Kalziumhomöostase bei als einer der vielen die Zellvolumenkontrolle beeinträchtigenden Vorgänge, die zur Zellschwellung führen. Es ist deshalb naheliegend, dass Regulationsstörungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Azidose an der Zellschwellung beteiligt sind.

7. Zielsetzung der Experimente

In den vorliegenden Untersuchungen sollten auf zellulärer Ebene, *in vitro*, weiterführende Experimente über die Mechanismen der Azidose-induzierten Gliazellschwellung durchgeführt werden.

Im Mittelpunkt standen folgende Fragestellungen:

- (1) Funktion von Anionen-Transportern und -Kanälen für die Laktazidose-induzierte Gliazellschwellung und die Regulation des intrazellulären pH.
- (2) Funktion von extrazellulären Kalzium-Ionen bzw. der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern für die Gliazellschwellung durch Laktazidose. Einfluss von Kalziumionen auf die Regulation des intrazellulären pH unter Milchsäureexposition.

Diese Fragen wurden durch Untersuchungen mit suspendierten Gliazellen beantwortet. Die abhängigen Variablen Zellvolumen und pH_i wurden durchflusszytometrisch unter Zuhilfenahme der Fluorimetrie bestimmt.

Es wurde erwartet, dass die daraus hervorgehenden Befunde zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen der Laktazidose-induzierten Zellschwellung beitragen – auch als Grundlage für die Entwicklung spezifischer und besser wirksamer Therapiemethoden gegen das ischämische und traumatische Hirnödem mit Anstieg des intrakraniellen Druck.

B) Material und Methoden

1. Zellkultur

1.1 C6 Gliomzellen

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden C6 Gliomzellen verwendet, eine als Modellzellen für Astrozyten etablierte Linie. Die Zellen stammen von durch N-Nitrosomethylharnstoff induzierten Gliomen der Ratte. Aus diesen Tumoren ist die Zelllinie C6, aufgrund der hohen Expression des für das Gehirn von Vertebraten spezifischen S-100 Proteins, isoliert und als permanente Zelllinie etabliert worden (Benda et al., 1968). Die Gliomzellen wurden von American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen (Batch F-12612). Sie wurden über mehrere Generationen kultiviert, Subpopulationen der Zellen wurden bei -196 °C in DMSO-haltigem Medium eingefroren. Bei Bedarf wurden Zellpopulationen aufgetaut und für laufende Versuche über mehrere Generationen kultiviert. Auf diese Weise erreichte der Generationsgrad der Zellen nicht mehr als 70 bis 90 Zellteilungen. C6 Gliomzellen mit niedrigerem Generationsalter haben eine hohe Aktivität von zyklischer Nukleotidphosphorylase (CNP), ein oligodendrozytäres Markerenzym. Mit höherer Passage nimmt die CNP Aktivität ab, während die Aktivität von Glutamin-Synthetase als Indiz der astrozytären Differenzierung und Reifung zunimmt (Parker et al., 1980). Die Transdifferenzierung der Zellen machte es notwendig, Zellen mit ähnlichem Generationsalter zu verwenden.

1.2 Zellkultivierung

C6 Gliomzellen wurden als Monolayer in Kunststoff-Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Falcon, Plymouth, Großbritannien) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Seromed, Biochrom KG, Berlin) gezüchtet. Dem Kulturmedium wurde 10 % hitzeinaktiviertes Kälberserum (Boehringer Mannheim, Mannheim), 100 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugegeben. Der pH des Mediums wurde durch NaHCO₃ unter Titration mit CO₂ auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität des Kulturmediums von 300 mosmol/l wurde mit einem Osmometer geprüft (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) und wenn erforderlich mit NaCl korrigiert. Die Zellkulturen wurden in einem Heraeus Brutschrank (B5060 EK-002) bei 37 °C in einem Gemisch aus H₂O-gesättigter Raumluft und

5 % CO₂ bebrütet. 24 Stunden nach Anlegen der Kultur erreichte der Zell-Monolayer Konfluenz von ca. 90 %.

Eine Kontamination der Kultur durch Mykoplasmen wurde mit einem Mykoplasma Testsystem von Boehringer Mannheim (Mykoplasmen-Kit, Boehringer Mannheim) geprüft.

1.3 Subkultivierung

Mit Erreichen von 90 % Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Die adhärenen Zellkulturen wurden zunächst mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein) gewaschen und anschließend durch einminütige Inkubation mit 1 ml Trypsinlösung (0,05 % Trypsin/0,02 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Sigma, München) von der Kulturschale abgelöst. Zur Inaktivierung von Trypsin wurden die Zellen anschließend mit serumhaltigem Medium von der Schale abgewaschen und suspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1000 U/min 5 min zentrifugiert, das Zellsediment wurde mit frischem serumhaltigen Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl in der Suspension wurde wie unten beschrieben mit einem Neubauer-Hämocytometer bestimmt. Danach wurden je 3 x 10⁶ Zellen/Schale mit 8 ml Medium in eine Petrischale ausgesät und kultiviert. Aufgrund der kurzen Generationszeit von C6 Glioma können die Zellen täglich subkultiviert werden.

1.4 Zellernte für den Versuch

Vor dem Versuch wurde die Subkultivierung der Zellen für einen Tag ausgesetzt, um 100 %ige Konfluenz und damit eine hohe Zellausbeute zu erreichen. Die Zellernte erfolgte unmittelbar vor dem Versuch durch Trypsinierung der Kultur nach dem beschriebenen Vorgehen. Nach Ablösung von der Schale wurden die Zellen zur Inaktivierung von Trypsin mit serumhaltigem Medium suspendiert. Zur anschließenden Entfernung des Serums wurde die Zellen zweimal in serumfreiem Medium resuspendiert und bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Im Serum vorhandene Esterasen würden den Einsatz membranpermeabler Fluorochrome behindern. Davon abgesehen würde die hohe Proteinkonzentration im Medium die unten beschriebene Inkubationskammer für die Zellsuspension, insbesondere den Oxygenatorschlauch kontaminieren. Nach den hier beschriebenen Waschungen wurden die Zellen in 14 ml Versuchmedium resuspendiert. Um Zellaggregate zu entfernen, wurde die Suspension zweimal durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 100 µm (Reichert

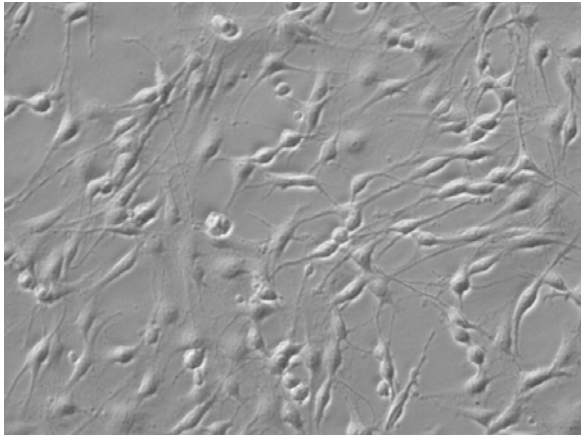
Chemietechnik, Heidelberg) filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension in die unten beschriebene Inkubationskammer eingebracht.

Für einen Versuch wurden 3-4 Kulturschalen geerntet. Die Zellzahl in der Suspension wurde auf $3-5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

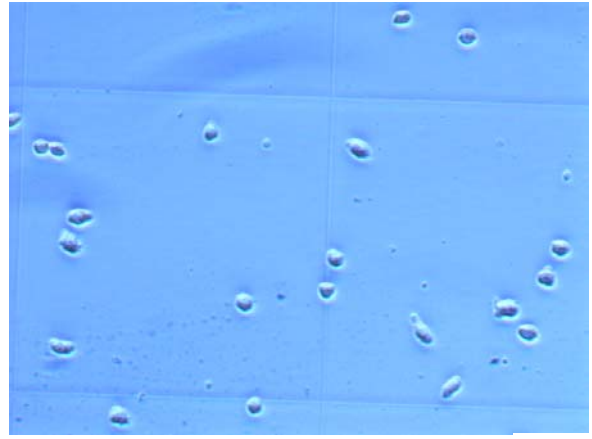
1.5 Färbung von saurem Gliafaserprotein

GFAP (glial fibrillary acidic protein) ist ein Astrozyten-spezifisches Intermediärfilament (Eng et al., 1971), das auch von C6-Gliomzellen exprimiert wird. Die immunzytochemische Färbung von GFAP ermöglicht somit die Erkennung von Kontaminationen der Zellkultur mit GFAP-negativen Zellen.

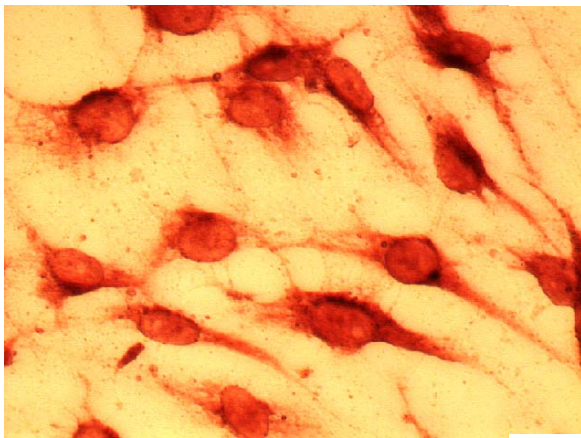
Zur Färbung wurden C6-Gliomzellen ($2,8 \times 10^4$ Zellen/cm²) für 48 h auf einer 4-Loch-Objektträgerplatte (TC Chamber Slides, Nunc Lab-Tek, Wiesbaden) kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in PIPES-Puffer (Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)) (Sigma, München) mit 100 μ M MgCl₂ und 0,1 M EDTA für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde 0,1 % Triton X-100 (Sigma, München) zugefügt. Unspezifische Bindungsstellen des Zweitantikörpers wurden durch 1 %iges Kaninchenserum (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) blockiert. Zur Hemmung von Peroxidasen wurden die Zellen anschließend in 2 %iger H₂O₂-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der primäre polyklonale Anti-GFAP-Antikörper (Rinderantikörper, Verdünnung 1:500, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach einstündiger Inkubation mit dem primären Antikörper, wurde der biotynilierte sekundäre Antikörper (Kaninchen, Verdünnung 1:100, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) wiederum für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Abschließend wurden die fixierten Zellen mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin zur Anfärbung des gebundenen Zweitantikörpers inkubiert. Die Färbung wurde mit einem inversen Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) beurteilt und fotografisch dokumentiert. In Abb. 2.1C ist GFAP als rotbraune Anfärbung sichtbar.



(A)



(B)



(C)

Abb. 2.1: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von C6 Gliomzellen

- A: Differentielles Interferenzkontrastbild (DIC) von in der Kulturschale adhärenenten C6 Gliomzellen.
- B: DIC-Bild von suspendierten C6 Gliomzellen in Trypanblau-Lösung in einem Neubauer-Hämocytometer. Im Gegensatz zu adhärenenten Zellen haben suspendierte Zellen eine runde Zellkontur. Die Zellen im Gesichtsfeld sind Trypanblau-negativ, also vital.
- C: GFAP-positive C6 Gliomzellen. GFAP ist als rotbraun gefärbtes Filament erkennbar.

2 Zellsuspension

2.1 Suspensionskammer

Die Versuche wurden mit suspendierten, nicht aggregierten Zellen durchgeführt. Um kontrollierte Bedingungen für die Suspension zu gewährleisten, wurde eine von Kempfski entwickelte Inkubationskammer verwendet (Abb. 2.2) (Kempfski et al., 1982; Kempfski et al., 1983).

Die Plexiglas-Kammer hat ein Volumen von 17 ml. Zur Temperaturkonstanz der Suspension ist die Kammer auf eine Wärmeaustauschplatte mit thermostatgesteuertem Wasserbad montiert. Ein Teflon-Magnetrührer in der Kammer verhindert die Sedimentation der Zellen. Durch die Kammer verläuft ein semipermeabler Silikonschlauch für die blasenfreie Begasung des Mediums nach dem Prinzip eines Membranoxygenators. Der Oxygenator wurde mit einem Gemisch von Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid durchströmt, der pO_2 in der Suspension wurde damit auf >100 mmHg eingestellt. Durch Öffnungen in der Kammerwand waren Messelektroden zur Überwachung des pH und der Temperatur eingebracht. Eine weitere Öffnung stand zur Entnahme von Proben bzw. der Injektion von Pharmaka zur Verfügung (Abb. 2.2).

Mit diesem Versuchsaufbau wurden die Gliazellen über Stunden unter Aufrechterhaltung von physiologischen Bedingungen suspendiert, ebenso konnten damit pathophysiologische Veränderungen gezielt induziert werden.

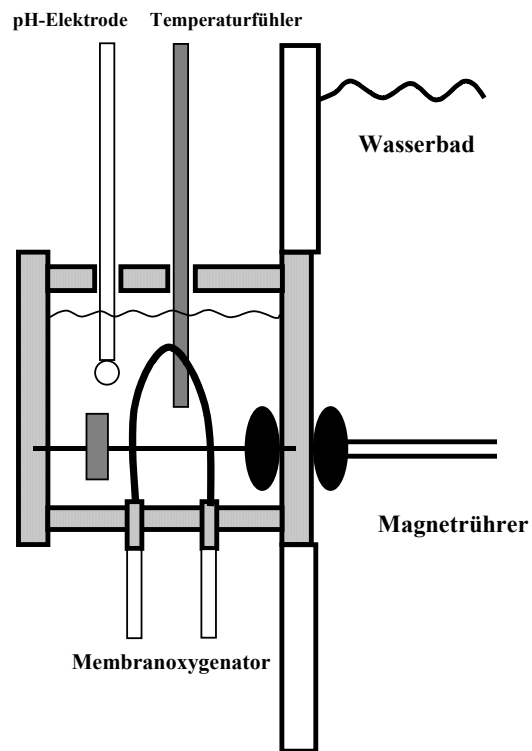


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Suspensionskammer

Die schematische Darstellung der Kammer zeigt eine seitliche Ansicht. Die Versuchskammer ist zur Temperierung an ein Wasserbad montiert. Die Begasung des Suspensionsmediums erfolgte mit einem gaspermeablen Schlauch als Membranoxygenator. Durch Bohrungen der oberen Kammerwand wurden Elektroden zur Kontrolle des Medium-pH und der Temperatur eingeführt.

2.2 Kontrollparameter

2.2.1 Messung des pH im Medium (pH_e)

Der pH wurde mit einer an ein pH-Meter (Delta 350, Mettler Toledo, Gießen) angeschlossenen Elektrode (Inlab 420, Mettler Toledo, Gießen) gemessen. Nach Kalibrierung bei pH 4,0; 7,0 und 10,0, wurde die Elektrode in die Suspensionskammer eingeführt. Der pH im Medium wurde damit kontinuierlich gemessen und durch einen Schreiber während des Versuchs aufgezeichnet. In der Kontrollphase wurde der pH im Medium durch Anpassung der CO₂-Begasung auf 7,35 bis 7,45 eingestellt.

2.2.2 Messung von pO₂, pCO₂ und der Bikarbonatkonzentration im Medium, Berechnung der intrazellulären Bikarbonatkonzentration

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂) und die Bikarbonatkonzentration der Suspension wurde mit einem Blutgasanalysator (ABL 300, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Das Gerät ist mit Elektroden zur Messung von pH, pO₂ und pCO₂ ausgestattet. Aus den pH- und pCO₂-Werten wird mit Hilfe gespeicherter Nomogramme die Bikarbonatkonzentration errechnet. Zur Messung wurden 100 µl-Aliquots der Kammer entnommen. Anhand des gefundenen pO₂ wurde die O₂-Begasung des Mediums auf einen pO₂-Zielwert von >100 mmHg angepasst.

Aus der gemessenen Bikarbonatkonzentration im Medium, dem extra- und intrazellulären pH wurde nach Formel [2.1] die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration errechnet (Kaila et al., 1990).

$$[HCO_3^-]_i = 10^{(pH_i - pH_e)} \times [HCO_3^-]_e$$

Formel 2.1: [HCO₃⁻]_i: intrazelluläre Bikarbonatkonzentration; pH_i: intrazellulärer pH; pH_e: extrazellulärer pH; [HCO₃⁻]_e: extrazelluläre Bikarbonatkonzentration

3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung wurde ein Neubauer Hämozytometer verwendet. Von zwei Proben der Zellsuspension wurden jeweils 2 x 16 Felder mit einem inversen Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) ausgezählt, der Mittelwert gebildet und daraus die Zellzahl/ml errechnet.

4. Zellvitalität

Vor dem Einbringen der Suspension in die Inkubationskammer wurde die Vitalität der C6 Gliomzellen durch Ausschluss von Trypanblau bestimmt (Paul, 1975). Der saure Farbstoff Trypanblau kann die Plasmamembran intakter Zellen nicht penetrieren: vitale Zellen werden nicht angefärbt. Bei geschädigten Zellen hingegen ist die Plasmamembran für den Farbstoff permeabel, das Zytosol färbt sich blau an.

Zu 100 µl-Aliquots der Zellsuspension wurde das gleiche Volumen einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung (Sigma, München) zugegeben. Nach Inkubation von 3 min wurden mit einem inversen Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) 100 Zellen im Neubauer Hämozytometer ausgezählt. Die Zahl der nicht gefärbten Zellen ergab die Vitalität in Prozent der Zellpopulation. Die auf diesem Wege ermittelte Zellvitalität vor dem Versuch war stets >93 %.

5. Osmolarität

Die Osmolarität der für die Kultivierung und Suspension verwendeten Medien wurde durch Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) geprüft. Vor der Messung wurde das Messgerät mit destilliertem Wasser und einer Standardlösung (Gonotec, Berlin, 300 mosmol) kalibriert. Alle verwendeten Medien bzw. Lösungen wurden auf eine Osmolarität von 300 mosmol eingestellt.

6. Durchflusszytometrie des Zellvolumens

6.1 Messprinzip

Die Messung des Zellvolumens von C6 Gliomzellen erfolgte durchflusszytometrisch nach einem von W.H. Coulter patentierten Prinzip (Coulter, 1953), das in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt ist. Dabei stehen zwei mit einer Elektrolytlösung gefüllte Kammern durch eine Öffnung - der Messapertur - mit 100 μm Durchmesser miteinander in Verbindung. Zu Beginn der Messung wird die Zellsuspension in eine der beiden Kammern gefüllt. Durch einen konstanten Unterdruck werden die Zellen durch die Messapertur in die anfänglich zellfreie Kammer gesaugt. Durch die Messapertur fließt ein zwischen zwei Elektroden konstant gehaltener Gleichstrom I von 45 μA . Beim Durchtritt einer Zelle durch die Messöffnung kommt es zum Anstieg des elektrischen Widerstandes (ΔR), weil der Messstrom die Zellen nicht oder nur geringgradig passieren kann. Dem Ohm'schen Gesetz folgend führt die Zunahme des elektrischen Widerstands bei konstantem Stromfluss zu einem dem Widerstandsanstieg proportionalen Spannungsimpuls (Formel 2.2).

$$\Delta U = I \cdot R$$

Formel 2.2: Elektr. Spannungsimpuls bei Durchtritt einer Zelle durch die Messapertur

Der Spannungsimpuls ΔU ist seinerseits direkt dem Zellvolumen proportional und kann deshalb als Parameter des Zellvolumens herangezogen werden. Mittels einer von Grover modifizierten Maxwell'schen Gleichung (Grover et al., 1969) wird das Zellvolumen quantitativ ermittelt (Formel 2.3).

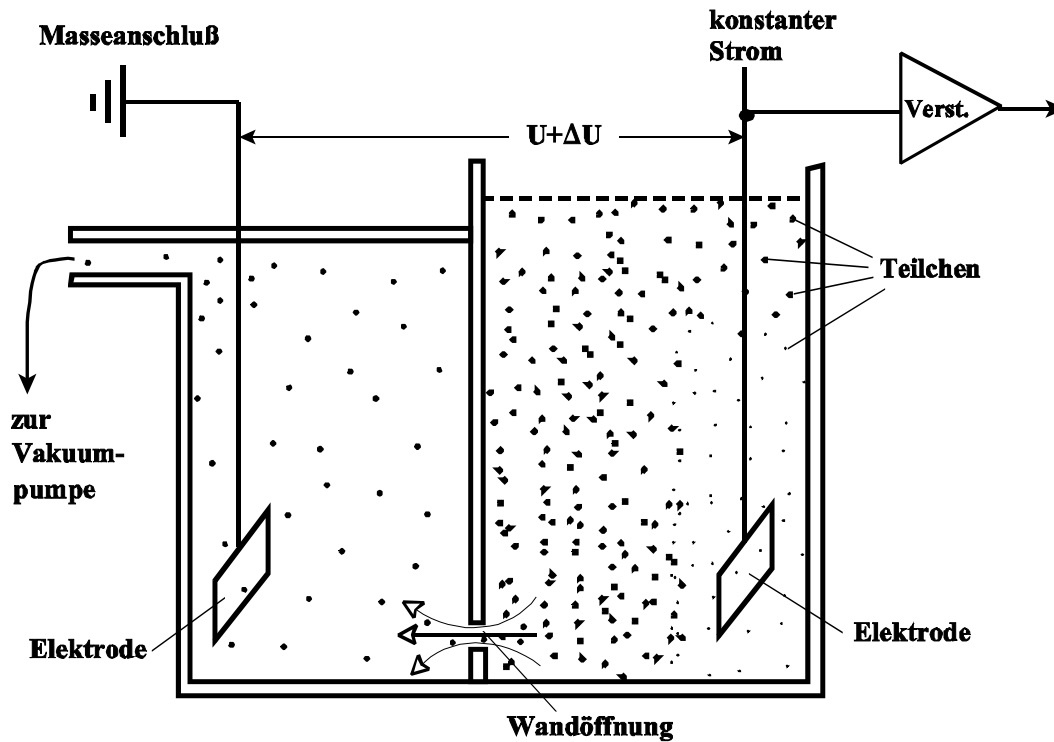


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Partikelvolumenmessung nach Coulter

Zwei mit einer Elektrolytlösung gefüllte Kammern sind durch eine Messöffnung definierter Geometrie miteinander verbunden. Zwischen den eingebrachten Elektroden fließt ein konstanter elektrischer Gleichstrom von 45 μA . Bei Durchtritt eines elektrisch nicht (oder gering) leitenden Partikels durch die Messöffnung steigt der elektrische Widerstand zwischen beiden Elektroden vorübergehend an. Gemäß dem Ohm'schen Gesetz führt die Änderung des Widerstandes bei Aufrechterhaltung eines konstanten Stromflusses zu einer die Widerstandszunahme kompensierenden Spannungszunahme. Dieser Spannungsimpuls ist proportional zum Volumen des durch die Messöffnung tretenden Partikels.

$$v = \frac{q^2 \cdot f_k}{\rho \cdot I \cdot F} \cdot \Delta U$$

v = Zellvolumen

q = Fläche der Messapertur

f_k = Korrekturfaktor für die Messlochgeometrie

ρ = spezifischer elektrischer Widerstand des Mediums

I = elektrischer Stromfluss durch das Messloch

F = geometrischer Formfaktor (Verhältnis Länge/Durchmesser) und elektr. Leitfähigkeit der Zelle

ΔU = Amplitude des Spannungspulses

Formel 2.3: Berechnung des Zellvolumens modif. nach der Maxwell'schen Gleichung

Unter Verwendung einer von Grover und Mitarbeitern (1969) entwickelten Gleichung wird das Zellvolumen aus dem Coulter-Messsignal errechnet.

6.2 Meßsystem und Durchführung der Volumenbestimmung

Das Meßsystem "Metrizell" wurde von V. Kachel, Max-Planck-Institut für Biochemie entwickelt (Kachel, 1976). Gegenüber konventionellen Coulter-Geräten ist dieses System mit einer "hydrodynamischen Fokussierung" des Partikelstroms ausgestattet. Mit dieser Technik werden die Zellen in die Zentralachse der Messapertur fokussiert, sie sind bei deren Passage von einem partikelfreien Hüllstrom umgeben. Dadurch wird die Qualität des elektrischen Spannungsimpulses durch Wegfall peripher passierender Partikel erheblich verbessert, damit die Präzision der Volumenmessung, so dass Unterschiede des Zellvolumens von nur 2 % erfasst werden. Die Eichung erfolgt (a) elektronisch durch einen internen Spannungsimpuls und (b) durch Latexbeads definierter Größe, mit Durchmessern von 5, 10 oder 15 μm (Dynospheres, monosized polymer-particles, Paesel GmbH & Co, Frankfurt).

Das Durchflusszytometer ist zur Aufzeichnung der Messimpulse über ein Interface mit einem IBM-kompatiblen AT 80486-Computer verbunden. Die Messdaten wurden mit einem von Kachel entwickelten Computerprogramm aufgezeichnet und gespeichert. Off-Line werden die auf diese Weise erfassten Daten als Histogramm mit einer Auflösung von 256 Kanälen dargestellt und analysiert (Abb. 2.4). Unter der Voraussetzung, dass nur Einzelzellen die Messapertur passieren, würde das arithmetische Mittel der Histogramme das Zellvolumen am besten repräsentieren. Allerdings kommt es in jeder Zellsuspension zur Bildung von Zellaggregaten, wodurch das Histogramm hin zu einem größeren Volumen verschoben wird. Aus diesem Grunde ist es notwendig, den Bereich des Histogramms einzuschränken. Zur Ermittlung des mittleren Zellvolumens wurde daher der Mittelwert der 10 Kanäle berechnet, die die höchste Zellzahl beinhalten. Zur Durchführung einer Volumenbestimmung wurden zum gewünschten Zeitpunkt 100 μl -Aliquots der Suspensionkammer entnommen und das Volumen von je $20\text{-}40 \times 10^4$ Zellen mit einer Flussdichte von 1.500-2.500 Zellen pro Sekunde bestimmt.

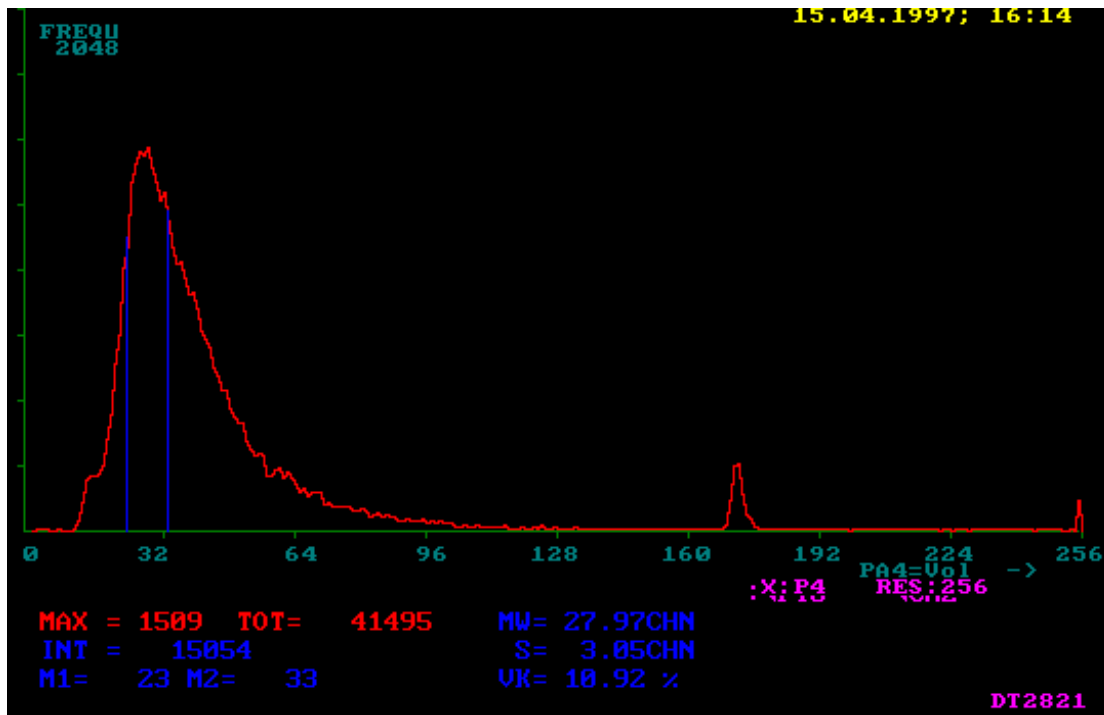


Abb. 2.4: Zellvolumenhistogramm

Die Volumendaten werden als 1-Parameter-Histogramm mit einer Auflösung von 256 Kanälen dargestellt. Auf der Abszisse ist die Höhe der digitalisierten Spannungsimpulses, auf der Ordinate die Häufigkeit aufgetragen. Der Gipfel bei Kanal 175 entsteht durch den elektronischen Eichimpuls.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert aus den 10 Kanälen mit der größten Häufigkeit von Ereignissen gebildet. Hier durch zwei vertikale Balken dargestellt.

7. Durchflusszytometrie des intrazellulären pH

7.1 Messprinzip

Zur Bestimmung des intrazellulären pH (pH_i) haben wir den pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF verwendet. Dieser Farbstoff verändert in Abhängigkeit seines Dissoziationsgrades, d.h. pH-abhängig, sein Exzitations- und Emissionsspektrum und kann daher zur pH-Messung herangezogen werden. BCECF wird typischerweise als 2-Wellenlängen-Exzitationsindikator angewandt. Allerdings ist für den Einsatz des Farbstoffs in der Durchflusszytometrie auch die Exzitation in einem Wellenlängenbereich und Detektion der emittierten Fluoreszenz in zwei Wellenlängenbereichen möglich. Bei Anregung $< 500 \text{ nm}$ hat BCECF das in Abbildung 2.6 dargestellte Emissionsspektrum. Bei 532 nm (F1) ist die Emissionsintensität stark pH-abhängig, während im Wellenlängenbereich bei 630 nm (F2) die

pH-Abhängigkeit der Emission wesentlich geringer ist, d.h. es kommt pH-abhängig zur Veränderung des Emissionsspektrums. Bildet man den Quotienten der Emissionen F1 und F2, erhält man die pH-abhängige Fluoreszenzintensität bei gleichzeitiger Korrektur des Messfehlers durch Ausbleichen oder Verlust von Farbstoff aus der Zelle bzw. Veränderungen der Beleuchtungsstärke. Diese Meßmethode hat besondere Bedeutung, wenn der intrazelluläre pH über einen längeren Zeitraum gemessen werden soll. Die gemessenen F1- und F2-Werte können graphisch als Gerade gegeneinander aufgetragen werden. Die Steigung der Geraden repräsentiert das Verhältnis von F1 zu F2, sie ist eine Funktion von pH_i , deren Variablen durch Kalibrierung ermittelt werden.

7.2 Inkubation der Zellen mit BCECF

Zur Gewährleistung der Passage des pH-Indikators durch die Zellmembran wird dieser als lipophiler Acetoxymethylester (BCECF-AM) in einer Endkonzentration von 10 μM aus einer 1mM Stammlösung mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) der Zellsuspension zugegeben. Das farblose BCECF-Acetoxymethylester-Derivat wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolytisch gespalten. Dadurch werden 4 negative Ladungen exponiert, der Farbstoff ist nunmehr hydrophil. Dadurch kann er die Zellmembran nicht mehr passieren sondern akkumuliert im Zytosol (Tsien, 1981). Zwanzig Minuten nach Farbstoffinkubation wurden die Zellen gewaschen, um überschüssigen Farbstoff im Suspensionsmedium zu entfernen, und in frischem Versuchsmedium resuspendiert.

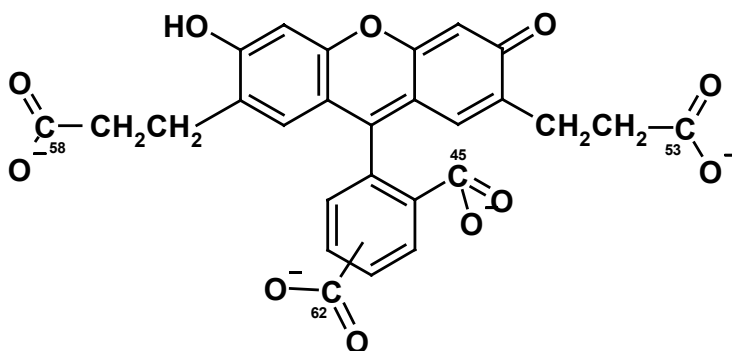


ABB. 2.5:
Strukturformel von BCECF

7.3 Aufbau des Meßsystems und Durchführung der Messung

Die Exzitation der mit Farbstoff beladenen Zellen und die Registrierung der Fluoreszenzemission erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers FLUVO II. Dieses Gerät wurde ebenfalls von Kachel, Max Planck Institut für Biochemie entwickelt. FLUVO II ermöglicht die simultane Analyse von drei Parametern, z.B. des Zellvolumens nach dem oben beschriebenen Coulter Prinzip und von zwei weiteren unabhängigen Fluoreszenzsignalen. Auch hier ist das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung realisiert.

Beim Eintritt der Zelle in die Coulteröffnung (Durchmesser 120 μm) wird der intrazelluläre pH-Indikator mit einer HBO 100 W/2 Quecksilberdampfampe (Osram, München) angeregt. Durch Einkoppelung eines 500 nm Kurzpass-Filters in den Anregungsstrahlengang hat das Anregungslicht eine Wellenlänge < 500 nm. Das vom Farbstoff emittierte Fluoreszenzlicht wird über verschiedene Spiegel, Lang- und Bandpassfilter an zwei Photomultiplier weitergeleitet (Abb. 2.7). Vom ersten Photomultiplier wird die Fluoreszenzemission zwischen 522 und 542 nm (F1) dem zweiten Photomultiplier von 620 bis 640 nm (F2) registriert. Das Lichtsignal wird von den Photomultipliern verstärkt und in einen Spannungsimpuls umgewandelt. Der Spannungsimpuls wird durch einen A/D-Wandler digitalisiert und von einem IBM-kompatiblen 80486-Computer aufgezeichnet.

Für die Messung wurde eine 100 μl -Probe der Zellkammer entnommen und in das Durchflusszytometer injiziert. Die Messung erfolgte bei einem Partikelflux von 1500-2500 Zellen/s. Pro Messzeitpunkt wurden $20-40 \times 10^4$ Zellen analysiert.

Nach Abschluss der Messung wurden die Einzelwerte von F1 und F2 graphisch gegeneinander aufgetragen. Mit dem von J. Peters, Institut für Chirurgische Forschung entwickelten Computerprogramm 'PADD' wurde eine iterative Geradenanpassungen an die resultierende Punktwolke vorgenommen. Die Steigung dieser Geraden ist eine Funktion des intrazellulären pH. Der pH_i wurde nach Eichung des Systems aus der Steigung der Geraden errechnet .

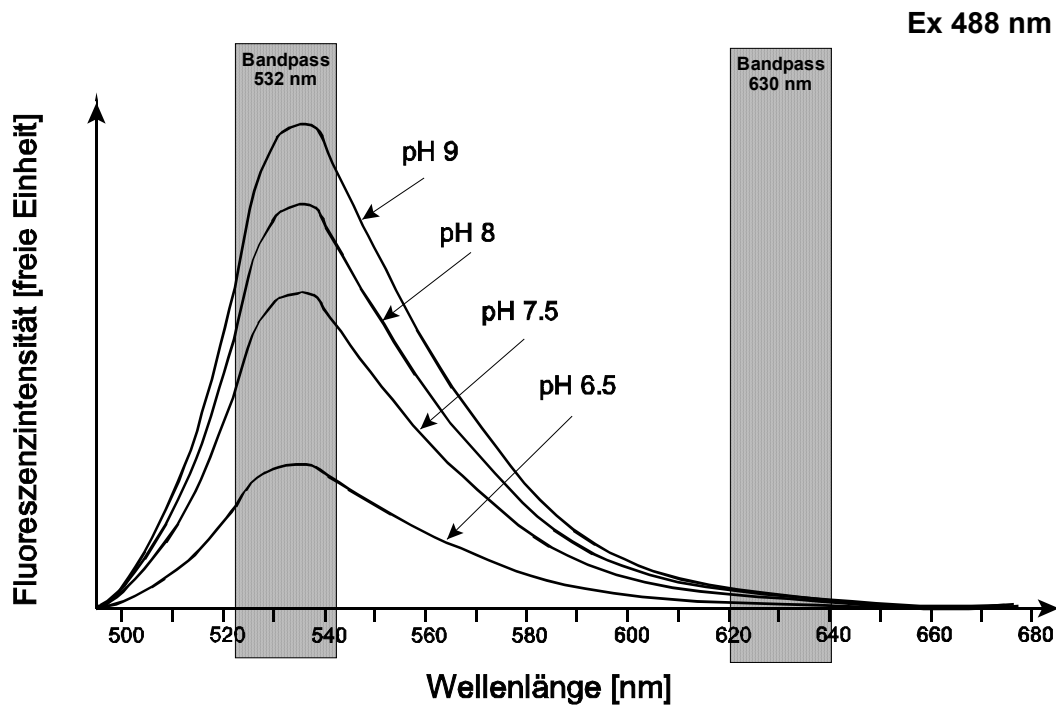


Abb. 2.6: Emissionsspektrum von BCECF

Der intrazelluläre pH von C6 Gliomzellen wird durch Emission des Fluorochroms BCECF nach dem Prinzip der Quotienten-Messung erfasst. Der Farbstoff wird mit Licht < 500 nm im Durchflusszytometer FLUVO II angeregt. Die Fluoreszenzemission wird in zwei Wellenlängenbereichen gemessen. Die Fluoreszenzemission zwischen 522 und 542 nm (F1) hat eine deutliche pH-Abhängigkeit. Mit zunehmendem pH kommt es auch zur Zunahme der Fluoreszenzintensität. Demgegenüber ist die Intensität der Emission zwischen 620 und 640 nm (F2) nur gering pH-abhängig. Bildet man den Quotienten der Emissionen F1 und F2, erhält man ein pH-abhängiges Fluoreszenzsignal, das gegenüber möglichen Verlusten des Farbstoffs aus der Zelle unempfindlich ist.

7.4 Kalibrierung

Vor jedem Versuch wurde die pH_i -Messung kalibriert. Dazu wurden der Suspension farbstoffbeladener Zellen, acht Aliquots à 300 μl entnommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in gepufferter kaliumreicher (120 mM) Lösung bei einem pH zwischen pH 5,0 und pH 8,5 resuspendiert. Durch 10-minütige Inkubation mit dem K^+/H^+ -Ionophor Nigericin (Abb. 2.8) in einer Konzentration von 10 μM wurde pH_i an pH_e angeglichen. pH_e wurde mit einer pH-Elektrode, die zellulären Fluoreszenzemissionen bei F1 und F2 mit FLUVO II gemessen. Wie beschrieben wurde F1 gegen F2 aufgetragen zur Ermittlung der Steigung der Regressionsgeraden (Abb. 2.9). Mit Hilfe des Computerprogramms SigmaPlot 2.0 (Jandel

Scientific, Erkrath) wurde die für jeden pH-Wert ermittelte Steigung gegen den jeweiligen pH des Mediums aufgetragen (Abb. 2.10). Anhand der Gleichung 2.4

$$pH_i = (B \times 10^{(A-X)} + C) / (1 + 10^{(A-X)}) \quad \text{Formel 2.4: Kurvenanpassung}$$

in der X dem errechneten Quotienten der Emissionen F1/F2 entspricht, wurde eine Regressionskurve an die erhaltenen Messwerte angepasst. Mit der dadurch ermittelten Funktion wurde der intrazelluläre pH aus den Quotienten F1/F2 quantitativ bestimmt.

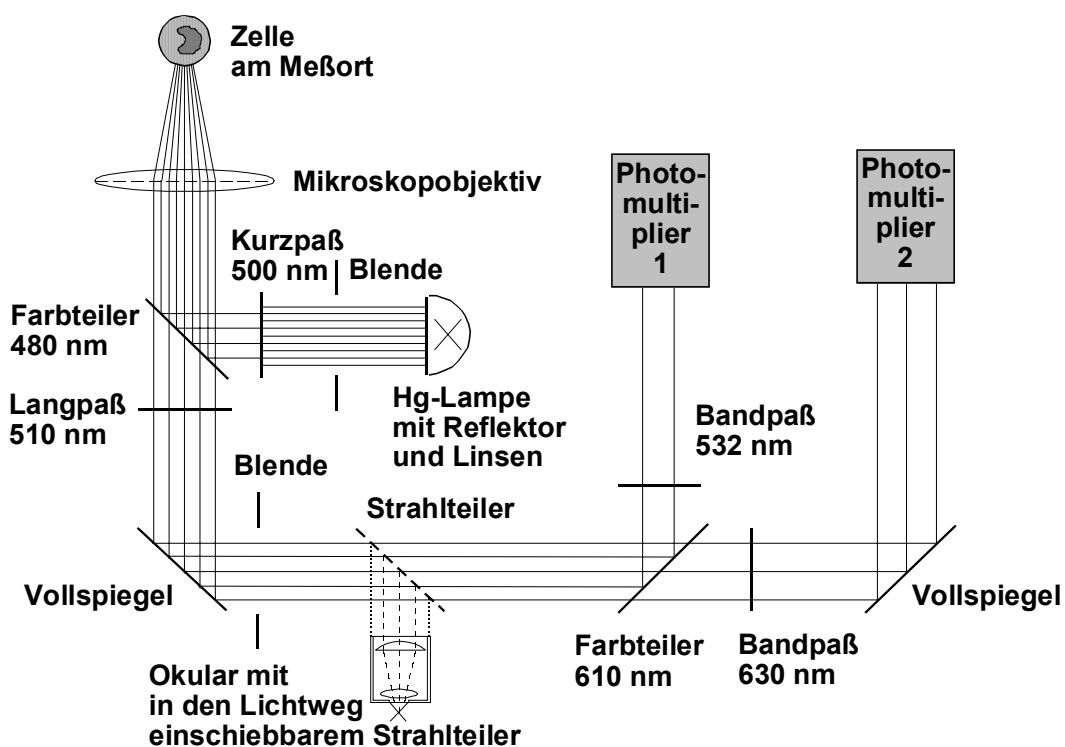


Abb. 2.7: Lichtweg im Durchflusszytometer FLUVO II

Mit BCECF beladene Zellen werden nach Durchtritt durch die Coulter-Öffnung durch das Licht einer Quecksilberdampfampe über ein Mikroskopobjektiv angeregt. Die vom angeregten Farbstoff emittierte Fluoreszenz tritt ebenfalls durch das Objektiv und wird nach Passage verschiedener Filter den Photomultipliern 1 und 2 zugeführt. Die Emissionslicht wird in elektronische Signale umgewandelt und mit einem Computer weiterverarbeitet. Zur Prüfung des Lichtwegs kann bei Störungen ein Okular eingeschoben werden.

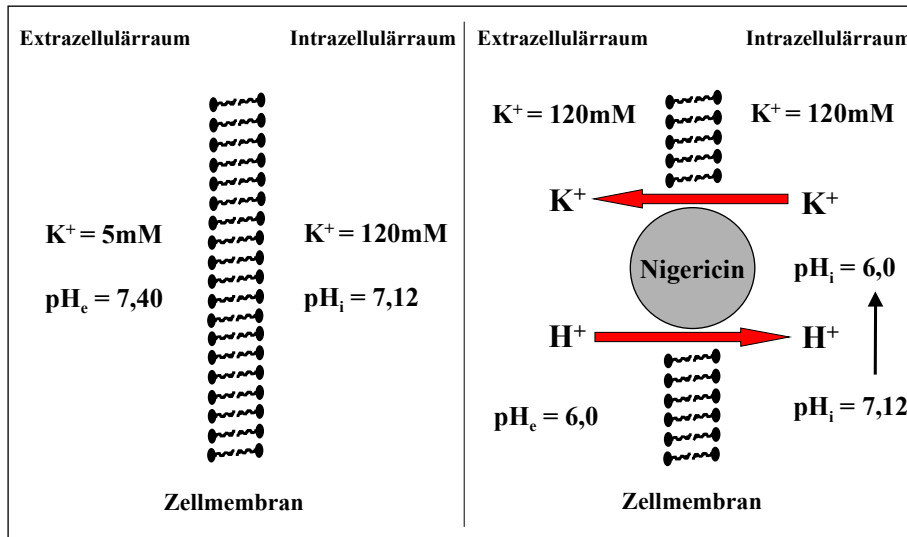


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Nigericin

Die linke Seite der Abbildung zeigt die physiologische Konzentrationsverteilung von K^+ -Ionen im Intra- und Extrazellulärraum sowie den normalen intra- und extrazellulären pH. Die rechte Bildhälfte zeigt die Bedingungen nach Suspension der Zellen in Eichpuffern mit hoher Kaliumkonzentration nach Zugabe von Nigericin. Durch das K^+/H^+ -Ionophor Nigericin kommt es zum passiven Ausgleich der H^+ -Konzentrationen zwischen Intra- und Extrazellulärraum.

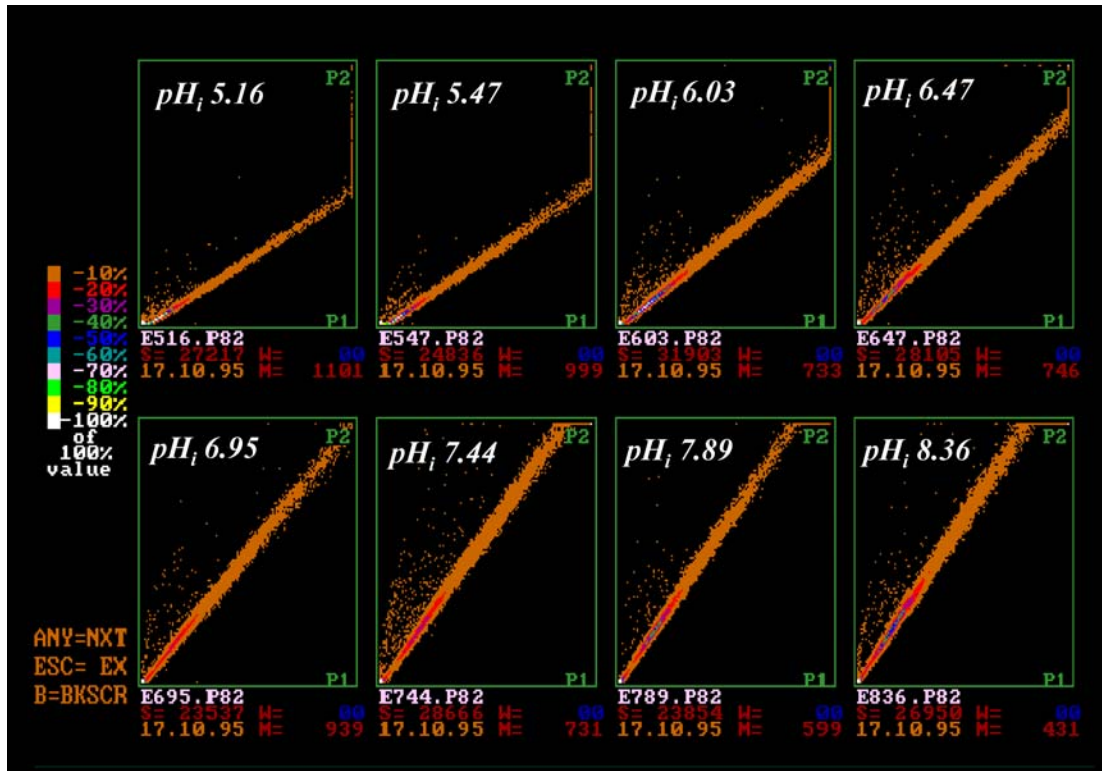


Abb. 2.9: Eichung der pH_i -Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF

Zur Eichung der pH_i -Messung werden der Suspension farbstoffbeladene Zellen (8 Aliquots) entnommen und zentrifugiert. Die Zellpellets werden in Puffern von pH 5,0 bis pH 8,5 resuspendiert. Durch Zugabe des K^+/H^+ -Ionophors Nigericin wird der intrazelluläre pH dem extrazellulären angeglichen. Der extrazelluläre pH wird mit einer pH-Elektrode bestimmt, die BCECF-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie. In der Abbildung sind die Emissionsfluoreszenzen F1 und F2 bei den angegebenen pH-Werten graphisch gegeneinander aufgetragen. Die Steigung der resultierenden Funktion entspricht dem intrazellulären pH.

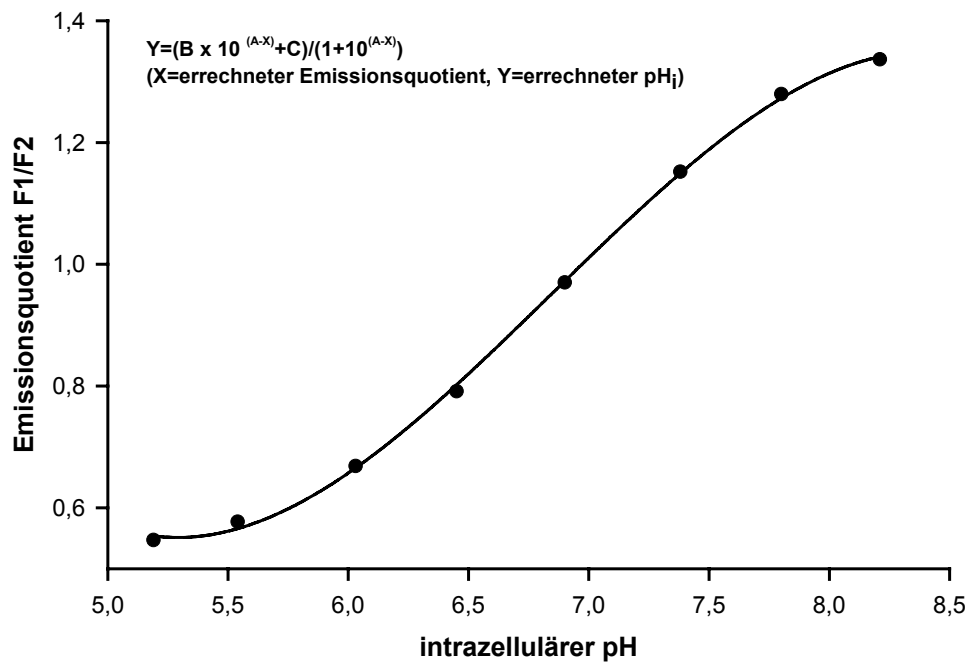


Abb. 2.10: Eichkurve für die pH_i-Messung mit BCECF

Wie beschrieben werden zur Kalibrierung der pH_i-Messung mit BCECF acht Zellaliquots mit Puffern zwischen pH 5,0 und pH 8,5 inkubiert. Durch Zugabe von 10 µM Nigericin wird der intrazelluläre dem extrazellulären pH angeglichen. Anschließend werden die Emissionsquotienten der acht Proben bestimmt und gegen den extrazellulären pH aufgetragen.

8. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2.11 schematisch dargestellt.

C6 Gliomzellen wurden unmittelbar vor dem Versuch geerntet, in serumfreiem Medium suspendiert und in die Versuchskammer eingebracht. Der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer wurde auf >100 mm Hg, der Medium-pH des Bikarbonat-haltigen Mediums wurde durch Regulation der CO_2 -Zufuhr auf pH 7,4, die Temperatur des Mediums wurde auf 37°C eingestellt. Nach Stabilisierung der Ausgangsbedingungen wurde BCECF-AM in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ zugegeben. Die Zellen wurden 20 min mit dem Fluorochrom inkubiert. Danach wurde die Suspension der Kammer entnommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit frischem serumfreiem Medium resuspendiert, um den Farbstoff aus dem Medium zu entfernen. Die resuspendierten Zellen wurden danach erneut in die Kammer eingebracht.

In den folgenden 30 min wurden Zellvolumen und intrazellulärer pH regelmäßig bestimmt. Versuche ohne Stabilisierung des Zellvolumens innerhalb von 20 min wurden abgebrochen. Nach Erreichen eines stabilen Zellvolumens folgte die Kontrollphase mit Ermittlung der Ausgangswerte von Zellvolumen und pH_i in Intervallen von 5 Minuten.

Für die Azidoseversuche wurde der extrazelluläre pH nach der Kontrollphase durch isotone Milchsäure (300 mosmol) auf pH 6,2 abgesenkt. Zur Aufrechterhaltung der Azidose über 60 min wurde der pCO_2 auf über 100 mmHg angehoben. Allerdings war diese Maßnahme nicht ausreichend, weil CO_2 durch die Öffnungen der Kammer entweichen konnte, was mit einem Ansteigen des pH_e einherging. Zur Kompensation musste der Suspension deshalb wiederholt Milchsäure zugegeben werden. In der Azidosephase wurden das Zellvolumen und der pH_i zu festgelegten Zeitpunkten wiederholt gemessen. Nach Abschluss der 60minütigen Azidosephase wurde der Medium-pH durch Titration mit 1 N Natronlauge auf 7,4 neutralisiert. Zellvolumen und pH_i wurden für weitere 30 min wiederholt bestimmt. In Versuchen ohne Azidose wurde der pH_e für die gesamte Versuchsdauer zwischen 7,35 und 7,45 konstant gehalten. Das Zellvolumen und der pH_i wurden simultan gemessen.

Auch eine Kontrolle von pO_2 , pCO_2 und der Bikarbonatkonzentration im Medium wurde in allen Versuchen in regelmäßigen Abständen über den gesamten Versuchszeitraum vorgenommen.

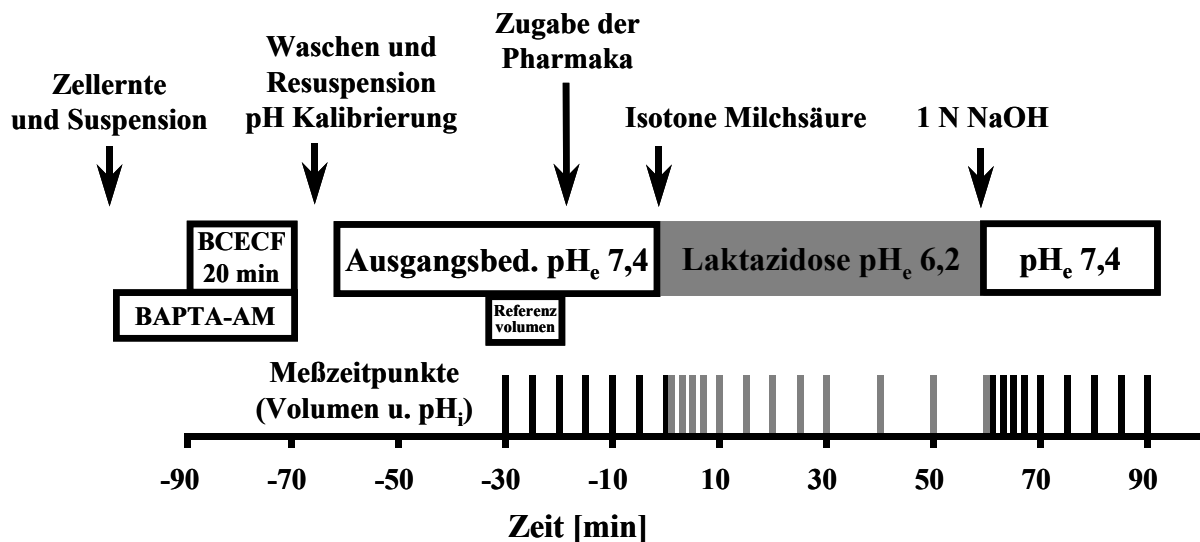


Abb. 2.11: Protokoll zur Untersuchung der Azidose-induzierten Gliazellschwellung und intrazellulären Azidose

Nach Suspension der Zellen in der Versuchskammer erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom BCECF. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Nach einer Kontrollphase folgt die 60 minütige Azidoseexposition mit Absenken des pH_e auf 6,2. Abschließend wurde der pH_e im Medium mit Natronlauge auf 7,4 neutralisiert. Das Zellvolumen und der pH_i wurden über den gesamten Versuch in regelmäßigen Abständen bestimmt.

9. Versuchsgruppen

9.1 Kontrollversuche

Zur Prüfung der Stabilität des Zellvolumens und des pH_i nach Suspension der Zellen in der Kammer wurden diese Parameter in einer eigenen Versuchsgruppe unter Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen bestimmt.

In einer weiteren, auch als 'Kontrollgruppe' bezeichneten Versuchsreihe wurde das Medium nach Suspension von Zellen durch Milchsäure nach dem oben beschriebenen Protokoll für 60 min auf pH 6,2 angesäuert ohne sonstige Veränderungen. Pharmaka bzw. Kanalinhhibitoren wurden nicht zugegeben.

9.2 Versuche zur Bedeutung von Anionentransportprozessen

Die Bedeutung von Anionen für die Azidose-induzierte Zellschwellung und intrazelluläre Ansäuerung wurde mit Hilfe verschiedener Ionentransportinhibitoren und durch Suspension der Zellen in Chlorid- bzw. Bikarbonat-freiem Medium analysiert. Die Inhibitoren wurden jeweils 15 min vor Induktion der Azidose der Suspension zugegeben, um eine Eigenwirkung dieser Pharmaka beurteilen zu können. Für die Versuche mit anionenfreiem Medium wurden Zellen nach der Ernte mit entsprechendem Medium suspensiert und dreimal in diesem gewaschen um Chlorid- bzw. Bikarbonat-freie Bedingungen im Extrazellulärraum zu gewährleisten.

9.2.1 Chlorid-freies Medium

Zur Herstellung von Chlorid-freiem Medium wurde das Anion in isomolarer Konzentration durch Glukonat ersetzt. Aufgrund der Molekülgröße von Glukonat (196,2 g/mol) i. Vgl. zu Chlorid (35,5 g/mol), kann das substituierte Ion von Chlorid-Transportern der Zellmembran nicht befördert werden. Davon abgesehen kann Glukonat keine Cl⁻-Ionenkanäle der Zellmembran passieren. Somit kann Glukonat nicht zum Ionenaustausch durch die Zellmembran beitragen.

Glukonat hat Kalzium-chelierende Eigenschaften (Abercrombie et al., 1983). Deshalb musste die Kalziumkonzentration des Mediums durch zusätzliche Zugabe von Kalziumsulfat

(Sigma, München) auf das physiologische Niveau eingestellt werden. Die Medium-Osmolarität wurde mit Natrium-Glukonat auf 300 mosmol eingestellt.

9.2.2 Bikarbonat/CO₂-freies Medium

In den Versuchen mit Bikarbonat/CO₂-freiem Medium wurde als Puffer HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure; E. Merck, Darmstadt) anstelle von Natriumbikarbonat (NaHCO₃) in einer Konzentration von 15 mM eingesetzt.

9.2.3 DIDS

DIDS (4,4'-Diisothiozyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure; Sigma, München) ist ein äußerst potenter Chlorid-Antiport-Inhibitor (Cabantchik, Greger, 1992) mit einem Molekulargewicht von 498,5 g/mol. Lyophilisiertes DIDS-Pulver wurde in DMSO in einer Konzentration von 50 mM suspendiert. Die Stammlösung wurde in 1:100 Verdünnung der Zellsuspension zugegeben für eine Endkonzentration von 0,5 mM. Durch kovalente irreversible Bindung von DIDS an die extrazelluläre Chlorid-Bindungsstelle des Antiporters wird der Austausch von Cl⁻-Ionen gehemmt (Cabantchik, Greger, 1992; Falke, Chan, 1986a). Abgesehen von dem Na⁺-abhängigen und Na⁺-unabhängigen Cl⁻/HCO₃⁻-Antiporter hemmt DIDS auch den elektrogenen

Na⁺-HCO₃⁻-Kotransport und blockiert Cl⁻-Kanäle (Shrode, Putnam, 1994; Deitmer, 1991).

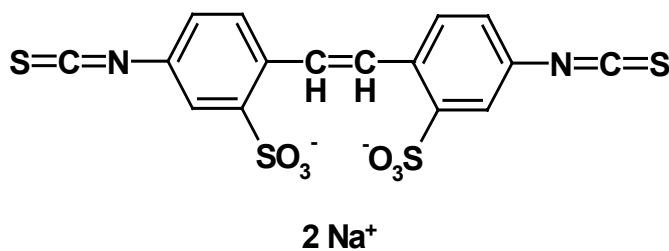


Abb. 2.13:
Strukturformel von DIDS

9.2.4 Niflummat

2-(3-(Trifluoromethyl)-anilin)nikotinsäure (Niflummat) hat ein Molekulargewicht von 282,2 g/mol. Das Agens als lyophilisiertes Pulver wurde in Versuchsmedium gelöst. Der Suspensionskammer wurde das Pharmakon in einer Endkonzentration von 0,6 mM zugegeben. Niflummat hat aufgrund seiner Prostaglandin-inhibitorischen Wirkung antiinflammatorische Eigenschaften. Darüber hinaus hat Niflummat eine Funktion als Translokationsinhibitor von Cl⁻-Austauschtransportern – als Erklärung seiner Verwendung in den vorliegenden Untersuchungen (Falke, Chan, 1986b). Niflummat bindet nicht, wie DIDS, an die Ionenbindungsstelle der Chlorid-Transporter, sondern hemmt durch Bindung an das Membranprotein die Translokation der Ionenbindungsstelle von intra- nach extrazellulär, dadurch den Transport von Cl⁻-Ionen (Falke, Chan, 1986b).

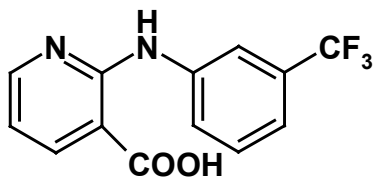


Abb. 2.14:
Strukturformel von Niflummat

9.2.5 Bumetanid

Bumetanid (3-(Aminosulfonyl)-5-(butylamino)-4-phenoxybenzonsäure; Sigma, München) ist ein Schleifendiuretikum vom Sulfonamid-Typ mit einem Molekulargewicht von 364,4 g/mol. Es hemmt den Na⁺-K⁺-Cl⁻-Kotransport mit hoher Spezifität (Cabantchik, Greger, 1992). Der Inhibitor wurde als lyophilisiertes Pulver in 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) und 80 % DMEM-Medium in einer Konzentration von 10 mM gelöst. Der Zellsuspension wurde Bumetanid mit einer wirksamen Endkonzentration von 0,1 mM zugefügt.

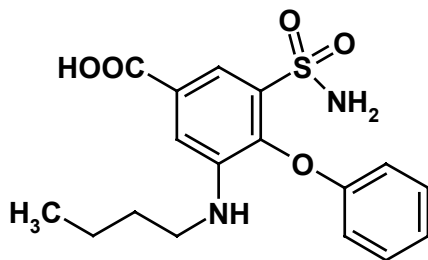


Abb. 2.15:
Strukturformel von Bumetanid

9.2.6 Furosemid

Wie Bumetanid gehört Furosemid (5-(Aminosulfonyl)-4-chloro-2-((2-furanyl-methyl)amino)-benzonsäure; Sigma, München) zu den Schleifendiuretika vom Sulfonamid-Typ. Furosemid hat ein Molekulargewicht von 330,7 g/mol. Die Reinsubstanz wurde in DMEM-Versuchsmedium in einer Konzentration von 100 mM gelöst. Für den Versuch wurde Furosemid in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Wie Bumetanid hemmt Furosemid den Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransport, hat allerdings darüber hinaus eine inhibitorische Wirkung auf den Na^+ -abhängigen und Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter.

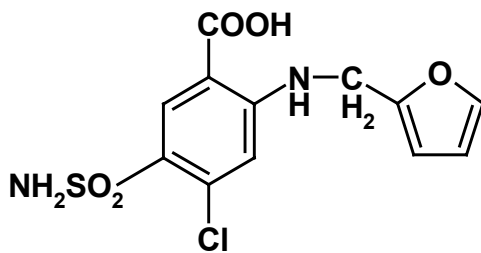


Abb 2.16:
Strukturformel von Furosemid

9.2.7 NPPB

NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzonsäure; Calbiochem/Novabiochem, Bad Soden) ist ein Arylaminobenzoat mit einem Molekulargewicht von 300,3 g/mol. Neben seiner Wirkung als Cyclooxygenase-Inhibitor ist NPPB ein potenter Hemmstoff von Chlorid-Kanälen (Cabantchik, Greger, 1992). Für die Versuche wurde NPPB in DMEM-Versuchsmedium gelöst und der Suspensionskammer in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben.

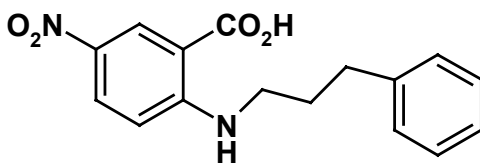


Abb: 2.17:
Stukturformel von NPPB

9.2.8 Probenecid

Probenecid (p-(Dipropylsulfamoyl)benzonsäure; Sigma, München) ist ein Inhibitor des zellulären Transports von organischen Säuren d.h. von organischen Anionen. Das Pharmakon hat ein Molekulargewicht von 285,4 g/mol. In den vorliegenden Versuchen wurde Probenecid in einer Endkonzentration von 2 mM der Suspension zugegeben.

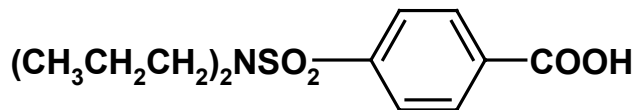


Abb. 2.18:
Strukturformel von Probenecid

9.3 Versuche zum Einfluss von intra- und extrazellulären Kalziumionen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Ionen auf die Azidose-induzierte Schwellung von Gliazellen untersucht. Dazu wurden Versuche nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei die Zellen in Kalzium-freiem Medium suspendiert bzw. mit einem intrazellulären Kalziumchelator oder der Kombination beider inkubiert wurden.

Um eine sichere Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen im Suspensionsmedium zu gewährleisten, wurde ein Ca^{2+} -freies Medium verwendet unter Zugabe des Kalziumchelators 1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetra-acetat (BAPTA; Sigma, München) (Tsien, 1980) in einer Endkonzentration von 0,5 mM.

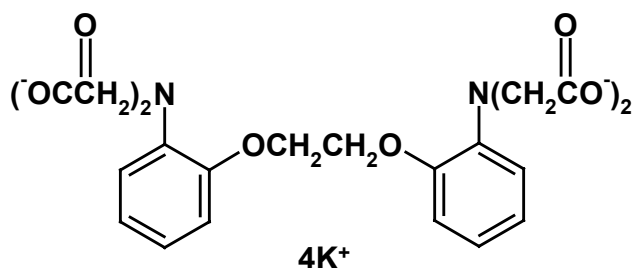


Abb. 2.19:
Strukturformel von BAPTA

Der Kalziumchelator mit einem Molekulargewicht von 628,8 g/mol hat pK_{as} -Werte von 5,47 und 6,36. Gegenüber herkömmlichen Chelatoren wie EDTA und EGTA ist BAPTA als

Ca²⁺-Chelator wesentlich geringer pH-abhängig und deshalb für Azidoseexperimente geeignet. Die Osmolarität des Kalzium-freien Mediums wurde mit NaCl auf 300 mosmol eingestellt.

Für die intrazelluläre Anwendung des Ca²⁺-Chelators wurde das Acetoxymethylester-Derivat von BAPTA (BAPTA-AM, Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) dem Medium in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben. Der BAPTA-Ester kann analog zu BCECF-AM, als lipophiles Molekül die Zellmembran passieren. Die Substanz wird intrazellulär hydrolytisch gespalten, das entstandene freie BAPTA-Molekül ist hydrophil und kann deshalb die Zelle nicht verlassen. Der Ester mit einem Molekulargewicht von 764,7 g/mol wurde in DMSO gelöst. Die 30-minütige Inkubation der Zellen mit BAPTA-AM erfolgte zur gleichen Zeit wie die Inkubation mit BCECF-AM. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, das Pellet mit frischem DMEM-Versuchsmedium resuspendiert.

In vier verschiedenen Versuchsgruppen wurde der Einfluss der Kalzium-freien Suspension bei pH 7,4 und pH 6,2, der Einfluss des intrazellulären Chelators BAPTA-AM während einer extrazellulären Azidose von pH 6,2 und die Kombination des intrazellulären Chelators mit der Suspension in Kalzium-freiem Medium bei pH 6,2 untersucht. Die Zellen wurden in den jeweiligen Gruppen von Beginn des Versuches an in Kalzium-freiem Medium suspendiert, bzw. vor der Kontrollphase mit dem intrazellulären Chelator inkubiert.

10. Datenauswertung, -darstellung und Statistik

Nach Abschluss eines Versuchs wurden das Zellvolumen bzw. der pH_i mit Hilfe eines Standard-Tabellenkalkulationsprogramms (Excel 97, Microsoft) aus den Rohdaten errechnet. Das jeweilige Zellvolumen wurde auf den dazugehörenden Ausgangswert normiert und in '% des Ausgangswertes' dargestellt. Referenz war der Mittelwert der ersten drei Messungen des Zellvolumens unter normalen Bedingungen. Die pH_i -Ergebnisse sind als Absolutwerte dargestellt.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogramms SigmaPlot Version 4.0 (Jandel Scientific, Erkrath) und einer Digital Personal Workstation Pentium Pro 200 (Compaq, Dornach) graphisch dargestellt. Alle weiteren Abbildungen wurden unter Verwendung der Computerprogramme Microsoft-Powerpoint (Microsoft, Unterschleißheim) und Corel Presentations (Corel, Hallbergmoos) erstellt.

Die Anzahl der Experimente pro Versuchsgruppe bzw. Versuchszeitpunkt ist in den Abbildungen angegeben (n). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die deskriptive wie auch die induktive statistische Analyse wurde mit dem Computerprogramm SigmaStat Version 2.0 (Jandel Scientific, Erkrath) durchgeführt. Es wurden Varianzanalysen für unverbundene, nicht-parametrische Stichproben verwendet. Innerhalb einer Versuchsgruppe wurde mit dem Friedman Test (Repeated Measures ANOVA on Ranks) auf globale Signifikanz getestet. Bei signifikanten Unterschieden, wurden die Ergebnisse der verschiedenen Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe mit dem Dunnett's post hoc Test analysiert. Zum Vergleich der Befunde von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ($p < 0,05$) wurde die Nullhypothese abgelehnt und die Unterschiede zwischen den Messungen wurden als statistisch signifikant bewertet.

C) Ergebnisse

1. Kontrollversuche

Zunächst wurde geprüft, ob es während der gesamten Versuchsdauer unter Kontrollbedingungen zu Veränderungen des Zellvolumens und des intrazellulären pH (pH_i) von C6 Gliomzellen gekommen war. Für diese Kontrolle blieben die relevanten physiologischen Größen (pH , pO_2 , Temperatur) des Mediums für 2,5 h im Normbereich.

Abb. 3.1 zeigt den Verlauf von Zellvolumen und pH_i (geschlossene Kreise). Im oberen Diagramm ist das Zellvolumen in Prozent des Ausgangswerts auf der Ordinate dargestellt, die Zeit in Minuten auf der Abszisse. Der Balken im unteren Bereich des Diagramms gibt den pH im Medium (pH_e) der jeweiligen Versuchsphase an. Im unteren Diagramm ist der Verlauf von pH_i für eine Dauer von 120 min abgebildet. Im Balken im unteren Diagramm ist der jeweilige pH des Mediums angegeben. Die gefüllten Kreise symbolisieren den Mittelwert von vier Versuchen unter Konstanthaltung der o.g. Versuchsparameter (Medium-pH, Temperatur, Elektrolytkonzentration, Gaspartialdrucke). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Diese Art der Darstellung ist in den nachfolgenden Abbildungen beibehalten.

Unter Kontrollbedingungen mit Suspension von C6 Gliomzellen in Bikarbonat-gepuffertem Medium bei pH_e 7,4 wurde ein mittleres Volumen von $518.1 \pm 62.8 \mu\text{m}^3$ gefunden. Das aus dem Mittelwert der ersten drei Messungen ermittelte Zellvolumen wurde für die weiteren Messungen als Referenz (d.h. 100%) herangezogen. Das im Verlauf des Versuches gefundene Zellvolumen ist somit in Prozent dieses Ausgangswertes dargestellt; in allen weiteren Versuchsgruppe wurde ebenso verfahren.

Während der Inkubation der Zellen in der Suspensionskammer unter konstanten Versuchsbedingungen mit $\text{pH}_e \sim 7,4$, $\text{pO}_2 > 100$ mmHg und einer Temperatur von 37°C , kam es innerhalb von 120 min zu einer geringfügigen Abnahme des Zellvolumens. Gegen Ende des Experiments war das Zellvolumen auf $96,5 \pm 1,6$ % des Ausgangswerts abgesunken. Der Unterschied gegenüber den zu Beginn gefundenen Zellvolumen ist jedoch statistisch nicht signifikant ($n=4$) (Abb. 3.1).

Der parallel gemessene pH_i war initial $7,08 \pm 0,06$ und schwankte über den Beobachtungszeitraum zwischen einem Minimum von $7,08 \pm 0,01$ und einem Maximum von $7,13 \pm 0,02$. Die zutage tretenden Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($n=4$) (Abb. 3.1).

2. Wirkung der Azidoseexposition auf das Zellvolumen und den intrazellulären pH

Nach einer Kontrollphase von 30 min wurde in dieser Versuchsgruppe der Medium-pH durch isotone Milchsäure auf 6,2 gesenkt (Abb. 3.1, offene Dreiecke). Bereits zum ersten Messzeitpunkt, eine Minute nach Ansäuerung des Mediums, hatte das Zellvolumen auf $107,4 \pm 0,7$ % des Ausgangswertes zugenommen ($p < 0,05$). Im anschließenden Beobachtungszeitraum der Laktazidose nahm das Zellvolumen weiter zu, erreichte nach 30 min $120,9 \pm 1,5$ %, sowie ein Maximum von $125,1 \pm 2,5$ % nach 60 min.

Nach 60 min wurde der Medium-pH mit 1 N NaOH auf 7,4 neutralisiert. In den folgenden 30 min kam es unter physiologischem pH_e zu einer kontinuierlichen Erholung des Zellvolumens. Das normale Zellvolumen vor Azidose-Induktion wurde in diesem Zeitraum (30 min) jedoch nicht erreicht. Das Volumen blieb mit $105,4 \pm 1,8$ % des Ausgangswerts signifikant erhöht.

Durch das Ansäuern des Mediums wurde eine intrazelluläre Azidose erzeugt. Ausgehend von einem pH_i von $7,13 \pm 0,04$ bis $7,16 \pm 0,04$ unter Kontrollbedingungen, fiel dieser Parameter bereits innerhalb einer Minute nach Ansäuern des Mediums auf einen Wert von $6,32 \pm 0,03$ ($p \leq 0,05$ vs. Ausgangswert und pH_i der Kontrollgruppe bei pH 7,4; $n=9$). Während der Azidoseexposition von 60 Minuten Dauer blieb der pH_i auf diesem Niveau stabil, signifikante Schwankungen wurden nicht beobachtet.

Mit Neutralisierung von pH_e kehrte auch pH_i auf seinen Ausgangswert zurück. Bereits 1 min nach Zugabe von NaOH zum sauren Medium war der pH_i der suspendierten Gliazellen wieder normal.

Zur näheren Charakterisierung der Veränderungen des zellulären Säure-Base-Haushaltes durch die Azidose wurde die extrazelluläre Bikarbonatkonzentration gemessen und die resultierende intrazelluläre Konzentration berechnet.

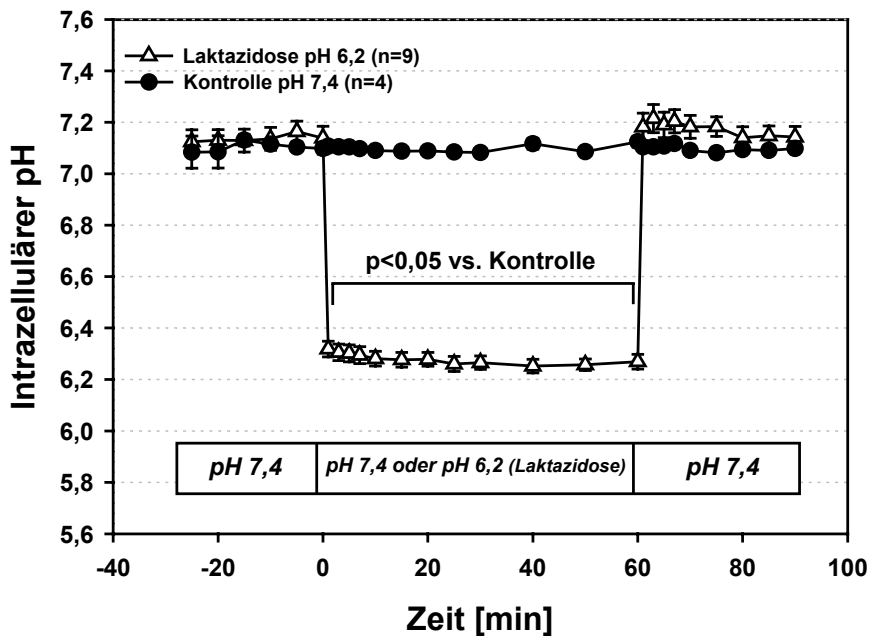
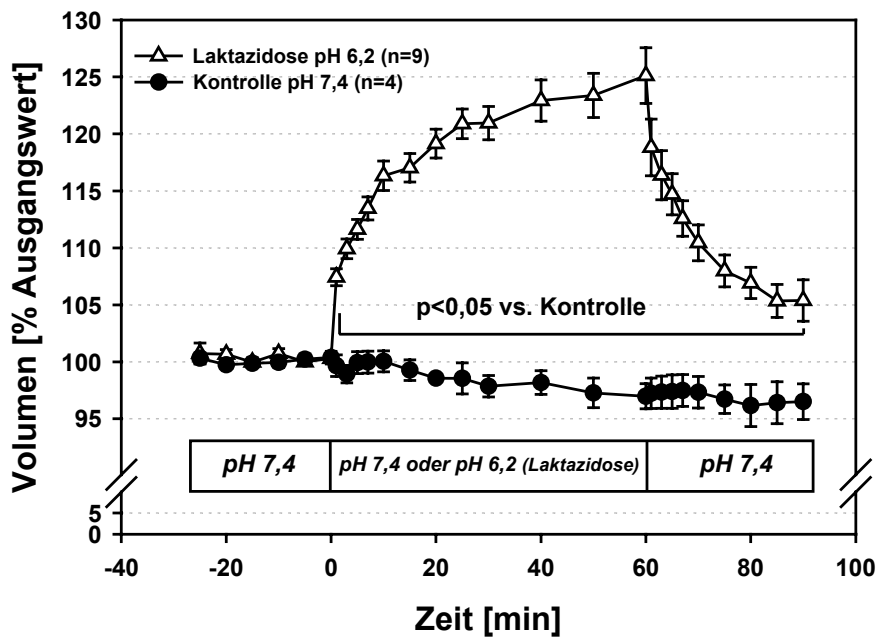


Abb. 3.1: Verlauf von Zellvolumen und pH_i von C6 Gliomzellen nach Ansäuern des Mediums auf pH 6,2

Für die Kontrollversuche wurden die suspendierten Zellen bei einem pH_e von 7,4 über 120 min inkubiert (geschlossene Kreise). In der anderen Gruppe wurde nach einer Kontrollphase von 30 min isotone Milchsäure dem Medium zugegeben zum Ansäuern auf pH 6,2. Das obere Diagramm zeigt den Verlauf des Zellvolumens; im unteren Diagramm ist der Verlauf von pH_i dargestellt. Im Beobachtungszeitraum von 120 min kam es in den Kontrollversuchen (pH_e 7,4) zu einer geringfügigen Abnahme des Zellvolumens, während der Verlauf von pH_i keine Änderungen zeigte. Durch Ansäuern des Mediums auf pH 6,2 (offene Dreiecke) wurde eine ausgeprägte Schwellung der suspendierten Gliazellen induziert – das Zellvolumen vergrößerte sich auf über 120 %, gleichzeitig fiel der pH_i . Nach Neutralisierung des Mediums kam es zur partiellen Erholung des Zellvolumens während der pH_i auf seinen Ausgangswert zurückkehrte.

	KONTROLLE (pH_e 6,2)		0,5 mM DIDS (pH_e 6,2)	
	<i>Ausgangsbed.</i>	<i>30 min Azidose</i>	<i>Ausgangsbed.</i>	<i>30 min Azidose</i>
pH_e	7,33 ± 0,05	6,29 ± 0,08	7,37 ± 0,05	6,25 ± 0,06
pH_i	7,13 ± 0,11	6,27 ± 0,07	7,11 ± 0,11	6,41 ± 0,10
[HCO₃⁻]_e	21,8 ± 1,7	6,0 ± 1,5	22,7 ± 0,44	5,9 ± 1,7
[HCO₃⁻]_i	13,7	5,7	12,5	8,5

Tab. 3.1: Extra- und intrazellulärer pH sowie die gemessene extra- und berechnete intrazelluläre Bikarbonatkonzentration [mM]

Aus den im Medium gemessenen Bikarbonatkonzentrationen wurde nach Formel 2.1 die intrazelluläre Konzentration berechnet. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM. Im linken Anteil der Tabelle sind die Werte für Kontrollversuche ohne Applikation eines Transportinhibitors aufgetragen, im rechten Anteil für Versuche mit Applikation des Cl⁻/HCO₃⁻-Antiport-Inhibitors DIDS (siehe 3.3).

Von einer extrazellulären Bikarbonatkonzentration von 21,8 ± 1,7 mM unter Kontrollbedingungen ausgehend kam es durch die Ansäuerung des Mediums auf pH 6,2 zu einem Abfall der Bikarbonatkonzentration auf nicht mehr als 6,0 ± 1,5 mM. Aus diesem Wert und unter Berücksichtigung von pH_e und pH_i wurde die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration errechnet. Unter Kontrollbedingungen wurde eine Konzentration von 13,7 mM errechnet, nach Ansäuern eine Konzentration von 5,7 mM (Tab. 3.1).

Die der beobachteten Azidose-induzierten Zellschwellung und intrazellulären Azidose zugrundeliegenden Mechanismen wurden in den nachfolgenden Versuchen untersucht.

3. Bedeutung von Anionen für die Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Azidose

In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit Veränderungen bestimmter Anionen im Medium (d.h. im Extrazellularraum) zur Azidose-induzierten Zellschwellung und dem Absinken von pH_i beitragen. Zunächst wurden Versuche mit Chlorid- bzw. Bikarbonat-freiem Medium durchgeführt, um den Einfluss von Chlorid bzw. Bikarbonat auf die Zellschwellung und die intrazelluläre Azidose zu untersuchen. Zur Charakterisierung von u.U.

beteiligten Membrantransportprozessen wurden anschließend verschiedene Anionentransport-Inhibitoren eingesetzt.

Für die Versuche unter Chlorid- bzw. Bikarbonat-freien Bedingungen wurden C6 Gliomzellen sofort nach Ernte aus der Kultur in entsprechenden Medien suspendiert. Inhibitoren des Anionentransports wurden nach einer Kontrollphase von 15 min, d.h. 15 min vor Azidose dem Medium zugegeben. Dadurch war eine Aussage über die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren bzw. Versuchsbedingungen auf das Zellvolumen und pH_i unter Kontrollbedingungen möglich.

3.1 Chlorid-freies Medium

Nach Suspension von C6 Gliomzellen in Chlorid-freiem Medium allein traten signifikante Veränderungen des Zellvolumens nicht auf (Abb. 3.2). Hingegen war das Ausmaß der Zellschwellung nach Ansäuerung des Mediums signifikant verringert. Während die initiale Zellschwellung eine Minute nach Azidosebeginn noch der Azidose-induzierten Zellschwellung in Gegenwart von Chlorid entsprach, war die weitere Volumenzunahme deutlich geringer ausgeprägt. 60 min nach Ansäuern erreichte die Schwellung ein Maximum von nur $116,2 \pm 2,1$ % des Ausgangswerts ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; $n=5$). Die Azidose-induzierte Zellschwellung in Chlorid-freiem Medium war damit um 35 % geringer ausgeprägt als in normalem Chlorid-haltigen Medium. Wie in den Vergleichsversuchen erholten sich die suspendierten Gliazellen in Chlorid-freiem Medium nach Neutralisierung des Mediums. Innerhalb 1 min schrumpfte das Zellvolumen auf $107,1 \pm 2,1$ % des Ausgangswerts und blieb danach nahezu unverändert auf diesem Niveau.

Der deutlichen Abschwächung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch Chlorid-freies Medium ungeachtet, war der Einfluss auf die zelluläre Ansäuerung geringer ausgeprägt. Bereits bei neutralem pH im Medium führte die Suspension der Zellen in Chlorid-freiem Medium zu einer geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Ansäuerung der Zellen (Abb. 3.2). Mit Ansäuerung des Mediums fiel pH_i weiter ab auf den Wert, der auch in Gegenwart von Chlorid im Medium erreicht wurde. Im weiteren Verlauf der Azidoseexposition stieg pH_i allerdings geringfügig an mit Äquilibration auf einem signifikant höheren Niveau als bei den

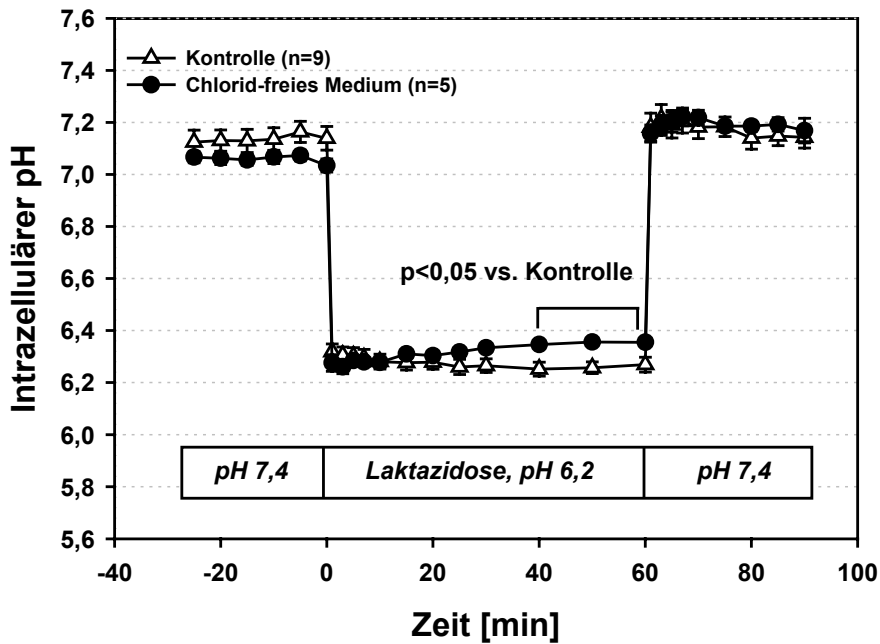
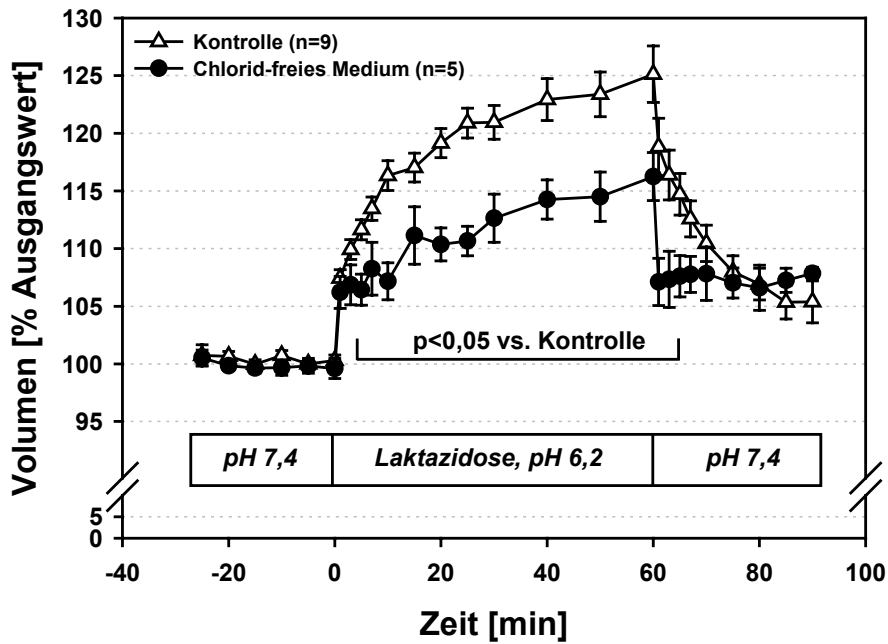


Abb. 3.2: Einfluss der Chlorid-freien Suspension von C6-Gliomzellen auf die Azidose-induzierte Schwellung und die intrazelluläre Ansäuerung

Das Volumen der Zellen der Kontrollgruppe mit Suspension in Chlorid-haltigem Medium ist durch offene Dreiecke symbolisiert, das Zellvolumen der Versuchsgruppe mit Suspension in Chlorid-freiem Medium durch geschlossene Kreise. Durch Suspension der Zellen in Chlorid-freiem Medium wurde die Azidose-induzierte Schwellung deutlich abgeschwächt, während nur eine geringe Wirkung auf die Erholung des Zellvolumens nach Beendigung der Azidose beobachtet wurde. pH_i war in der Versuchsgruppe mit Chlorid-freiem Medium bereits unter Kontrollbedingungen mäßig, jedoch nicht signifikant abgesunken, während die intrazelluläre Azidose nach Ansäuern hingegen abgeschwächt wurde.

Zellen der Kontrollgruppe. Nach Neutralisierung des Medium-pH kehrte pH_i ebenfalls auf den Ausgangswert vor Azidoseinduktion zurück. Der weitere Verlauf entsprach dem der Kontrollgruppe mit Chlorid-haltigem Medium (Abb. 3.2).

3.2 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -freie Versuchsbedingungen

Die Suspension von Gliazellen in HEPES-gepuffertem Medium, d.h. in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium *per se* rief keine signifikanten Veränderungen des Zellvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor. Nach Induktion der Laktazidose (pH_e 6,2) kam es nur initial zu einer moderaten Schwellung mit einem Maximum von $105,9 \pm 2,0$ % nach 15 min. Nach Erreichen dieses Werts wurde im weiteren Verlauf der Azidoseexposition wieder eine Schrumpfung des Zellvolumens beobachtet. Gegen Ende der Azidosephase hatte das Volumen der in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium suspendierten Zellen seinen Ausgangswert bereits wieder erreicht. Nach Neutralisierung des Mediums fiel das Zellvolumen sogar unter seinen Ausgangswert vor Azidose ab. Fünfundzwanzig Minuten danach wurde ein Minimum der Zellgröße von $93,9 \pm 2,6$ % beobachtet (Abb. 3.3).

Der Konstanz des Zellvolumens entsprechend hatte die Suspension von Gliazellen in HEPES-gepuffertem Medium auch keinen Einfluss auf pH_i unter Ausgangsbedingungen. Die Ansäuerung des Mediums auf 6,2 hingegen rief einen deutlich geringeren Abfall von pH_i hervor als in den Versuchen unter Kontrollbedingungen. Die intrazelluläre Azidose mit pH $6,49 \pm 0,03$ bis $6,41 \pm 0,04$ war signifikant geringer ausgeprägt als bei Suspension der Zellen mit Bikarbonat/ CO_2 -gepuffertem Medium ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=5$). In der Azidosephase kam es zu keinen signifikanten Schwankungen von pH_i . Auch unter diesen Versuchsbedingungen kehrte pH_i mit Neutralisierung des Mediums auf den Ausgangswert zurück, ohne dass ein unterschiedlicher Schweregrad der intrazellulären Ansäuerung gegenüber den Zellen der Kontrollgruppe mit Suspension in Bikarbonat/ CO_2 -gepuffertem Medium bestand.

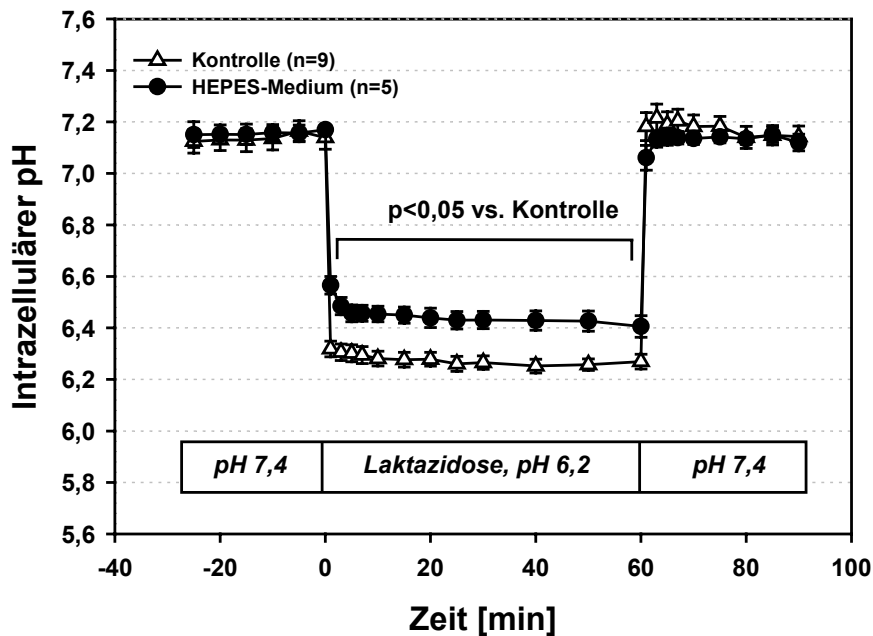
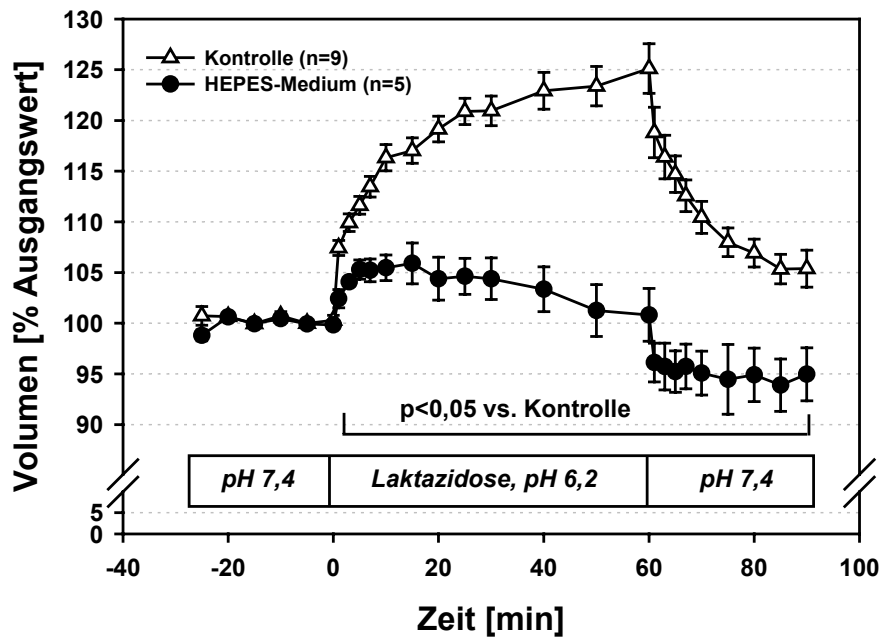


Abb. 3.3: Volumen und pH_i von C6 Gliomzellen nach Suspension in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium

Die Suspension von C6 Gliomzellen in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium hatte keinen Einfluss auf das Zellvolumen und pH_i unter Ausgangsbedingungen bei neutralem pH. Die Azidose-induzierte Zellschwellung wurde jedoch deutlich abgeschwächt. Schon in der Azidosephase konnte als spontaner Trend eine Erholung des Zellvolumens beobachtet werden. Auch die intrazelluläre Azidose war gegenüber der Azidose von Gliazellen der Kontrollgruppe mit Exposition in Bikarbonat/ CO_2 -haltigem Medium deutlich geringer ausgeprägt.

Mit Neutralisierung des Medium-pH in dieser Versuchsgruppe kam es zu einer weiteren Schrumpfung des Zellvolumens während sich pH_i erholte.

3.3 DIDS

In dieser Versuchsgruppe wurde 15 min vor Azidoseinduktion der Anionentransportinhibitor DIDS in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, ohne dass dadurch das Volumen von suspendierten Gliazellen unter Ausgangsbedingungen verändert wurde. Die Azidose-induzierte Zellschwellung hingegen war im Vergleich zur Zellschwellung in der Kontrollgruppe deutlich abgeschwächt ($p < 0,05$). Nach Vorbehandlung mit DIDS wurde ein Maximum der Zellschwellung von nur $109,1 \pm 1,0$ % des Ausgangswertes gefunden, bei den Zellen der Kontrollgruppe dagegen von $125,1 \pm 2,5$ %. Dies entspricht einer Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung um 64 %. Mit Neutralisierung des Medium-pH schrumpfte das Zellvolumen prompt in den Bereich seines Ausgangswertes, während die Erholung des Zellvolumens in der Kontrollgruppe (ohne DIDS) verzögert und unvollständig war (Abb. 3.4). In Gegenwart von DIDS schrumpfte das Zellvolumen bereits eine Minute nach Beendigung der Azidose auf $101,8 \pm 0,8$ % des Ausgangswertes. Auch im weiteren Verlauf war das Volumen der mit DIDS behandelten Zellen bis zum Versuchsende signifikant kleiner im Vergleich mit dem Zellvolumen der Kontrollgruppe ohne DIDS ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=5$ bzw. 9) (Abb. 3.4).

Während die Inkubation mit DIDS keinen Einfluss auf das Zellvolumen unter Ausgangsbedingungen bei pH 7,4 hatte, wurde bereits bei der ersten Messung von pH_i , 5 Minuten nach Applikation des Inhibitors, ein deutliches Absinken dieses Parameters gefunden ($p < 0,05$ vs. Ausgangswert, $n=5$). Der intrazelluläre pH blieb auch weiter in dieser Versuchsgruppe bis zur Azidose-Induktion erniedrigt. Durch die Zugabe von Milchsäure (pH_e 6,2) kam es zwar erwartungsgemäß zur deutlichen intrazellulären Ansäuerung, wenngleich die zelluläre Azidose in Gegenwart von DIDS signifikant schwächer ausgeprägt war. Der Unterschied von pH_i zwischen beiden Versuchsgruppen erreichte 10 min nach Beginn der Azidoseexposition ein Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ ($n=5$ bzw. 9). Mit Beendigung der Laktazidose durch Neutralisierung des Mediums kehrte pH_i auch bei den mit DIDS-behandelten Gliazellen auf den Ausgangswert zurück (Abb. 3.4).

Die Analyse der intra- und extrazellulären Bikarbonatkonzentration in dieser Versuchsgruppe macht eine dem pH_i entsprechende Veränderung der intrazellulären Konzentration deutlich (Tab. 3.1). Analog zur Kontrollgruppe war in den Versuchen mit DIDS 30 min nach Beginn der Laktazidose die extrazelluläre Bikarbonatkonzentration von $22,7 \pm 0,4$ mM auf $5,9 \pm 1,7$ mM abgefallen. Durch Vorbehandlung mit DIDS war die

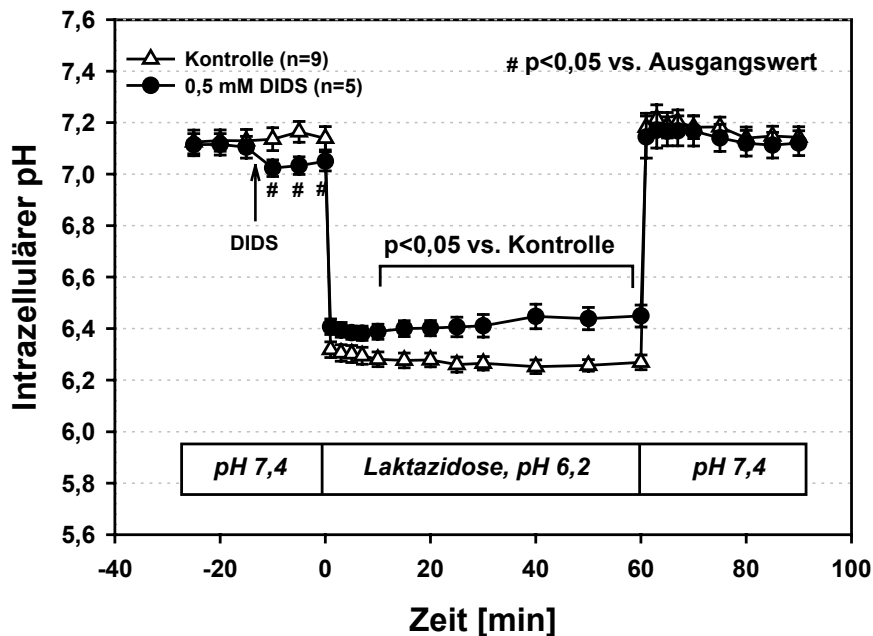
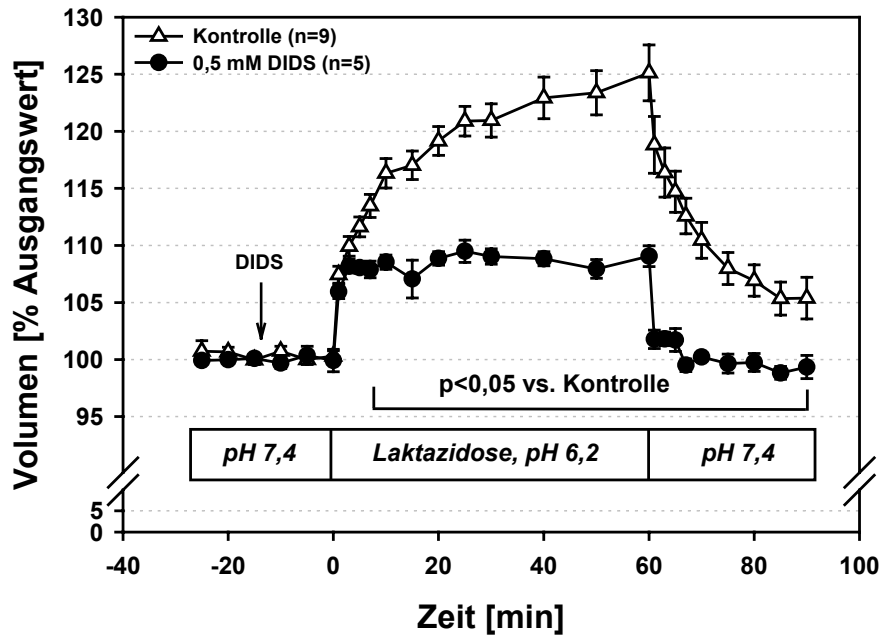


Abb. 3.4: Verlauf der Zellschwellung und der intrazellulären Azidose während Milchsäureexposition von C6 Gliomzellen nach Vorbehandlung mit DIDS

Bereits unter Ausgangsbedingungen kam es nach Zugabe von DIDS zum Absinken von pH_i , wohingegen das Zellvolumen unbeeinflusst blieb. Die Azidose-induzierte Zellschwellung wurde durch die Vorbehandlung mit DIDS stark abgeschwächt ebenso die intrazelluläre Azidose. Die Neutralisierung des Mediums nach 60 minütiger Azidose war im Gegensatz zu den Kontrollversuchen von einer sofortigen und vollständigen Erholung des Zellvolumens und des intrazellulären pH begleitet.

Der Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes aus 5 bzw. 9 Versuchen sind in der Grafik dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch horizontale Balken markiert.

Abnahme der intrazellulären Bikarbonatkonzentration in der Azidosephase allerdings geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Von einer intrazellulären Konzentration von 12,5 mM ausgehend kam es nach 30 min bei pH_e 6,2 zu einer Abnahme auf 8,5 mM (Tab. 3.1).

3.4 Niflummat

Niflummat (0,6 mM) führte bereits unter Ausgangsbedingungen – vor Azidoseexposition – zu einer moderaten jedoch nicht signifikanten Vergrößerung des Zellvolumens, d.h. auf $102,0 \pm 1,6$ % des Ausgangswerts. Durch Ansäuerung des Mediums auf pH 6,2 kam es - wie in den anderen Versuchen – innerhalb einer Minute zu einer raschen Schwellungsreaktion auf $109,2 \pm 1,4$ %, den Zellen der Kontrollgruppe ohne Niflummat entsprechend. Diese Vergrößerung des Zellvolumens nach Niflummat-Vorbehandlung entsprach dem Maximum, zu einer weiteren Zunahme des Zellvolumens kam es nicht. Das Ausmaß der Schwellung war 5 min nach Azidose-Induktion unter Niflummat signifikant geringer als in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt. Nach 60 min war das Zellvolumen sogar auf $108,4 \pm 1,1$ % geschrumpft, einer Abschwächung der Schwellung von 66 % gegenüber der Kontrollgruppe entsprechend. Die Neutralisierung des Versuchsmediums bewirkte allerdings eine nur geringe Volumenerholung, d.h. auf $104,9 \pm 1,1$ % nach einer Minute. Im weiteren Verlauf (29 min) blieb das Zellvolumen auf diesem Niveau. Gleichwohl war unter Niflummat die Erholung des Zellvolumens (bis 10 min nach Neutralisierung) vollständiger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Erst mit längerer Erholung nach der Neutralisierung ging dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen verloren.

Die eindrucksvolle Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch Niflummat hatte allerdings ihren Preis. Wie aus Abb. 3.5 hervorgeht kam es zu einer beträchtlichen Verstärkung der intrazellulären Ansäuerung der Gliazellen. Bereits 5 min nach Zugabe von Niflummat unter Kontrollbedingungen bei pH_e 7,4 wurde ein signifikanter Abfall von pH_i gemessen. Von pH_i $7,11 \pm 0,02$ vor Applikation des Pharmakons ausgehend fiel dieser Parameter 5 min nach Applikation noch vor Ansäuern des Mediums auf $6,87 \pm 0,03$. Die nachfolgende Ansäuerung auf pH 6,2 ging mit einem weiteren Absinken von pH_i unterhalb des pH_i der Kontrollgruppe einher. Die stärker ausgeprägte intrazelluläre Azidose mit Minimum von $6,07 \pm 0,16$ blieb in der 60 min Azidosephase des Mediums konstant. Auch

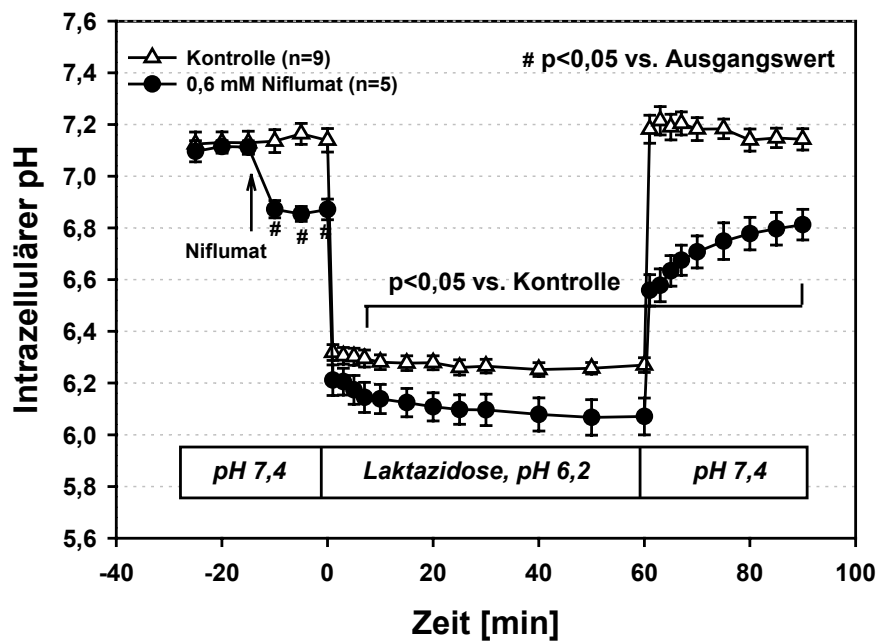
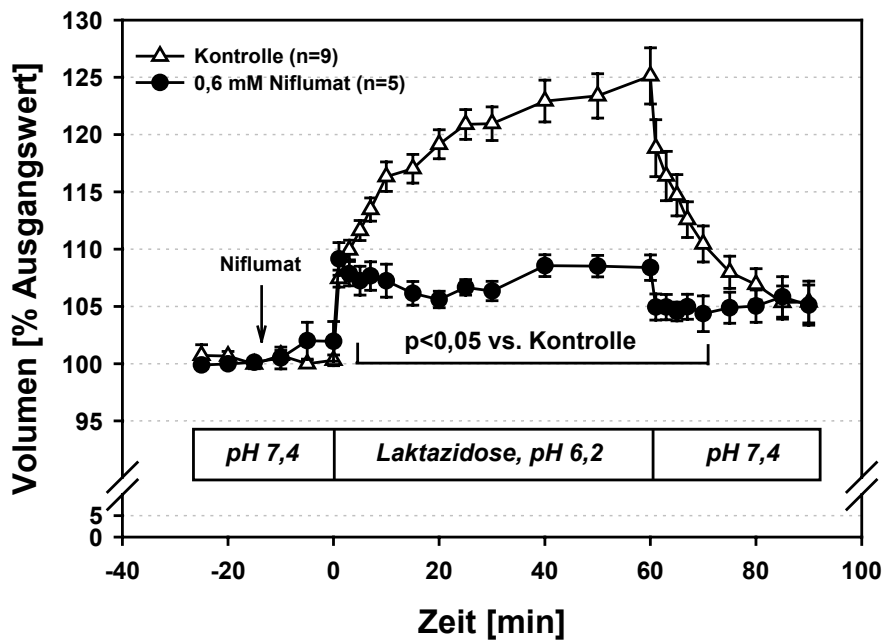


Abb. 3.5: Wirkung von Niflumate auf die Azidose-induzierte Schwellung und i.z. Ansäuerung von suspendierten Gliomzellen

Fünfzehn Minuten vor Ansäuern des Mediums wurde Niflumate in einer Endkonzentration von 0,6 mM zugegeben. Bereits 5 min danach kam es zu einem signifikanten Absinken von pH_i . Während die Zellschwellung nach Ansäuern durch Niflumate signifikant abgeschwächt wurde, war die intrazelluläre Azidose stärker ausgeprägt als in den Experimenten ohne Niflumate. Das Zellvolumen erholte sich in dieser Gruppe innerhalb von 30 min nach Neutralisierung des Mediums, pH_i blieb hingegen weiterhin deutlich unterhalb des Ausgangs- bzw. Kontrollwerts.

nach Neutralisieren des Mediums kehrte pH_i nicht in den Kontrollbereich zurück sondern blieb signifikant erniedrigt ($\text{pH } 6,81 \pm 0,06$ vs. $7,14 \pm 0,04$, Niflummat vs. Kontrolle nach 30 min Neutralisierung, $p < 0,05$, $n=5$ bzw. 9).

3.5 Bumetanid

Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransport-Inhibitor Bumetanid hatte ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Azidose-induzierte Zellschwellung ohne das Zellvolumen unter Kontrollbedingungen bei pH_i 7,4 zu verändern. Die Zellschwellung durch Milchsäure war bereits nach 3 min signifikant geringer als die Zellschwellung in der Kontrollgruppe ohne Bumetanid. Das Maximum der Schwellung erreichte in dieser Gruppe nur $112,8 \pm 1,8$ % im Vergleich zum Maximum von $125,1 \pm 2,5$ % der Zellen der Kontrollgruppe ohne Inhibitor ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=5$ bzw. 9). Dies entspricht einer Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch Bumetanid von 52 %. Mit Neutralisierung kam es wie in den Kontrollversuchen zur Erholung des Zellvolumens. Nach 25 min wurden $101,4 \pm 0,8$ % des Ausgangswerts gefunden - einer fast vollständigen Normalisierung im Gegensatz zu den Zellen der Kontrollgruppe entsprechend (Abb. 3.6).

Der Verlauf von pH_i der mit Bumetanid behandelten Zellen entsprach dem der Kontrollen über den gesamten Versuchszeitraum, d.h. Bumetanid hatte weder einen Einfluss auf pH_i unter Kontrollbedingungen noch während Laktazidose. Der intrazelluläre pH fiel in der Azidosephase auf den gleichen Wert wie bei den Zellen der Kontrollgruppe ohne Bumetanid. Auch nach Neutralisierung des Mediums wurden keine pH_i -Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen beobachtet (Abb. 3.6).

3.6 Furosemid

Wie Bumetanid hatte das Diuretikum Furosemid keinen Einfluss auf das Zellvolumen unter physiologischen Bedingungen. Andererseits wurde auch hier die Zellschwellung durch Milchsäureexposition abgeschwächt. Das Maximum der Zellschwellung war bereits nach 40 min bei $112,6 \pm 0,7$ % im Vergleich zu $122,9 \pm 5,5$ % der Kontrollen ohne Furosemid

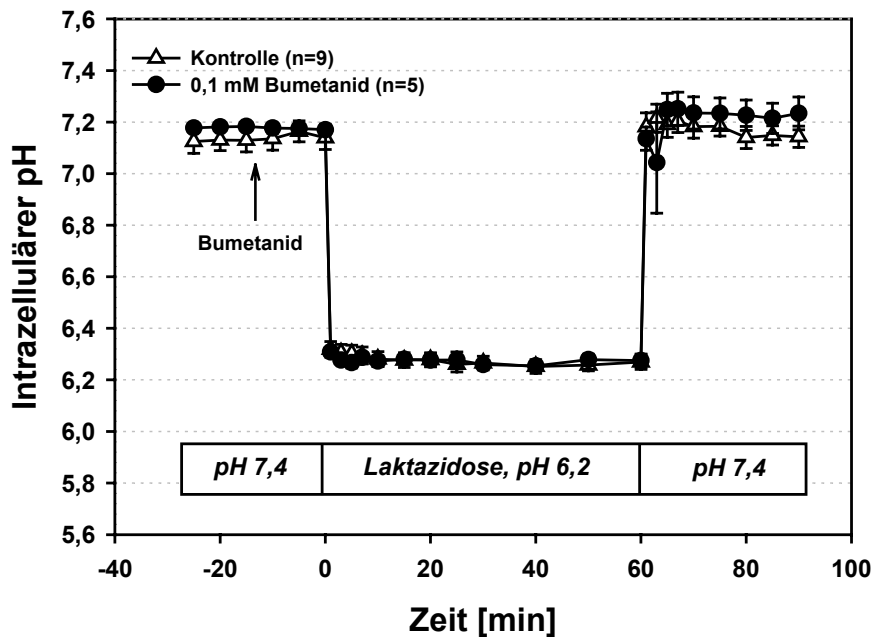
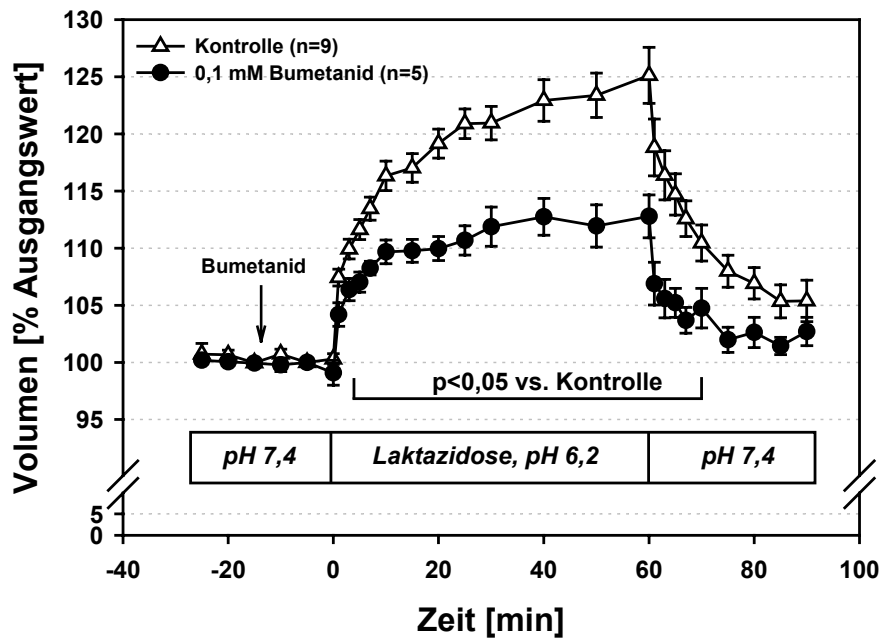


Abb. 3.6: Zellvolumen und pH_i von suspendierten C6 Gliomzellen während Milchsäureazidose (pH 6,2) – mit und ohne 0,1 mM Bumetanid

Bumetanid hatte in einer Endkonzentration von 0,1 mM weder einen Einfluss auf das Zellvolumen noch auf pH_i unter Ausgangsbedingungen. Die Azidose-induzierte Zellschwellung war allerdings bereits 3 min nach Ansäuern des Mediums deutlich abgeschwächt. Nach Neutralisierung nahmen die Zellvolumina in der Kontroll- wie auch in der Bumetanid-Gruppe wieder ab. Fünfzehn Minuten nach Neutralisierung wurde kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen gefunden. Der intrazelluläre pH der mit Bumetanid behandelten Zellen entsprach im Versuchsverlauf also während, sowie vor und nach der Azidosephase dem Wert der Kontrollgruppe ohne Bumetanid.

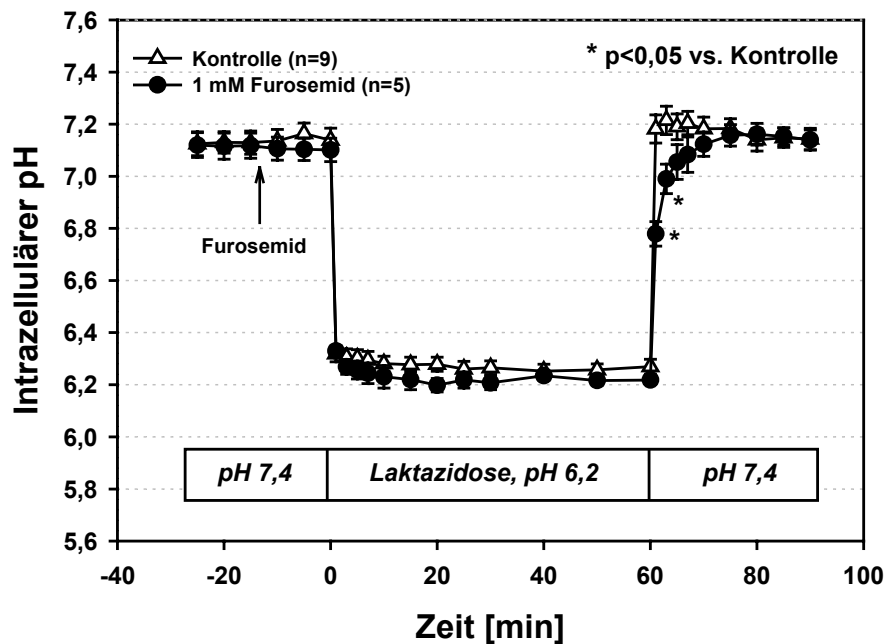
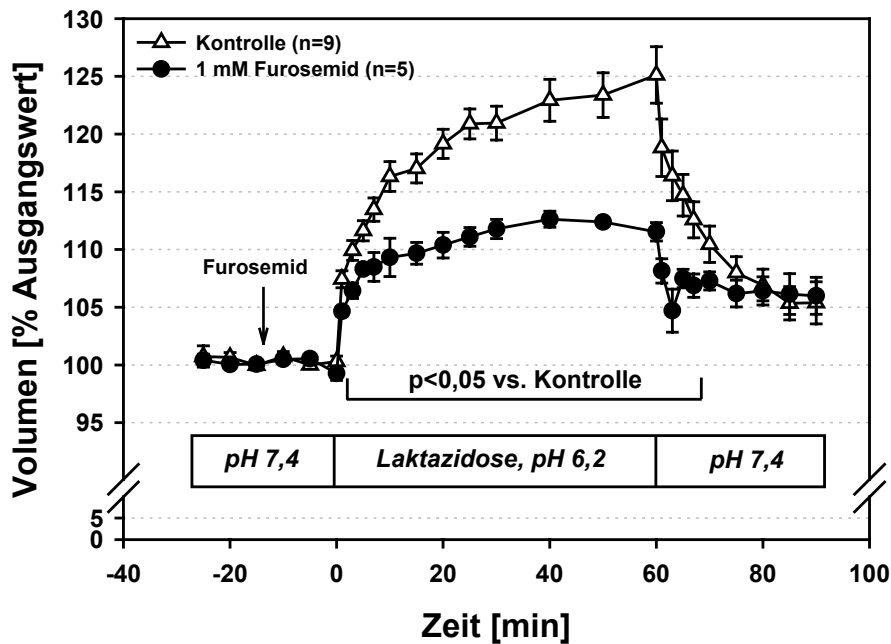


Abb. 3.7: Wirkung von Furosemid (1 mM) auf die Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Ansäuerung von C6 Gliomzellen durch Milchsäureexposition (pH_e 6,2)

Furosemid führte unter Ausgangsbedingungen weder zu einer Veränderung des Zellvolumens noch von pH_i . Die Azidose-induzierte Schwellung war jedoch bereits 1 min nach Ansäuern des Mediums signifikant gehemmt. Nach Neutralisieren des Mediums kam es in dieser Versuchsgruppe weiterhin zu einer deutlich rascheren Erholung des Zellvolumens. Auf der anderen Seite wurde der Verlauf von pH_i durch Furosemid wenig beeinflusst, allenfalls war dessen Erholung nach Neutralisierung etwas verzögert.

erreicht. Danach stabilisierte sich das Zellvolumen über den weiteren Verlauf der Azidose, nach 60 min wurde ein Wert von $111,5 \pm 0,8$ % des Ausgangsvolumens gemessen. Mit Neutralisierung des Mediums kam es in den Versuchen mit Furosemid im Vergleich zu den Kontrollen zur schnelleren Erholung des Zellvolumens, wenngleich der Ausgangswert vor Azidose nicht erreicht wurde. Fünfzehn Minuten nach Neutralisierung war das Zellvolumen in der Furosemid-Versuchsgruppe im Bereich des Zellvolumens der Kontrollgruppe. Nach 30 min wurde in dieser Gruppe ein Volumen von $105,9 \pm 1,6$ % des Ausgangswertes beobachtet (Abb. 3.7).

Wie Bumetanid hatte auch Furosemid keinen Einfluss auf den intrazellulären pH unter Kontrollbedingungen bzw. das Ausmaß der intrazellulären Azidose nach Zugabe von Milchsäure. Immerhin war die Erholung von pH_i nach Neutralisierung des Mediums signifikant verzögert. Eine Minute nach Neutralisierung war pH_i in der Furosemid-Gruppe erst wieder auf $6,78 \pm 0,05$ angestiegen, nach 3 min nur auf $6,99 \pm 0,06$, gegenüber einem pH_i von $7,18 \pm 0,05$ bzw. $7,21 \pm 0,05$ bei den Zellen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; $n = 5$ bzw. 9) (Abb. 3.7).

3.7 NPPB

NPPB ist ein potenter Inhibitor von Anionenkanälen. Es hatte eine deutliche Wirkung auf die Azidose-induzierte Zellschwellung als auch auf die intrazelluläre Ansäuerung unter Milchsäureexposition. Gleichwohl blieb das Zellvolumen nach Zugabe von NPPB unter Kontrollbedingungen unverändert, während der intrazelluläre pH von $7,06 \pm 0,07$ auf $6,97 \pm 0,06$ abfiel. Bereits 3 min nach Ansäuerung mit Milchsäure war die inhibitorische Wirkung von NPPB auf die Zellschwellung erkennbar. In dieser Gruppe wurde (50 min nach Ansäuern) ein Maximum der Zellschwellung von nur $110,3 \pm 1,0$ % des Ausgangswerts im Vergleich zu $123,4 \pm 1,9$ %, dem Maximum in der Kontrollgruppe erreicht, einer Hemmung der Zellschwellung von 56 % entsprechend. Nach Neutralisierung des Medium-pH kam es auch in der NPPB-Versuchsgruppe zur Erholung des Zellvolumens – von einem geringeren Grad der Zellschwellung ausgehend. Innerhalb einer Minute schrumpfte das Zellvolumen von $110,3 \pm 1,2$ % auf $106,4 \pm 1,6$ % des Ausgangswerts, interessanterweise, ohne sich danach weiter zu erholen (Abb. 3.8).

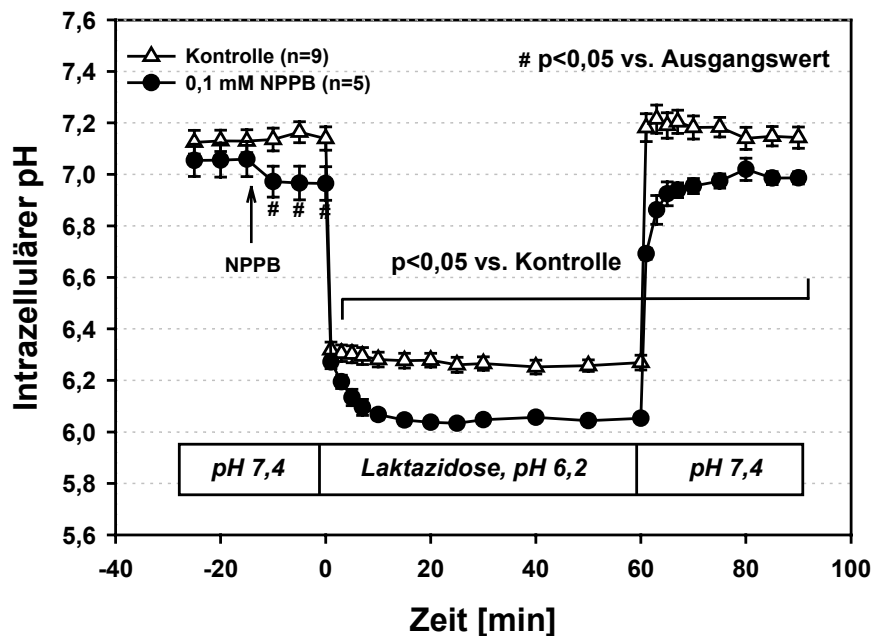
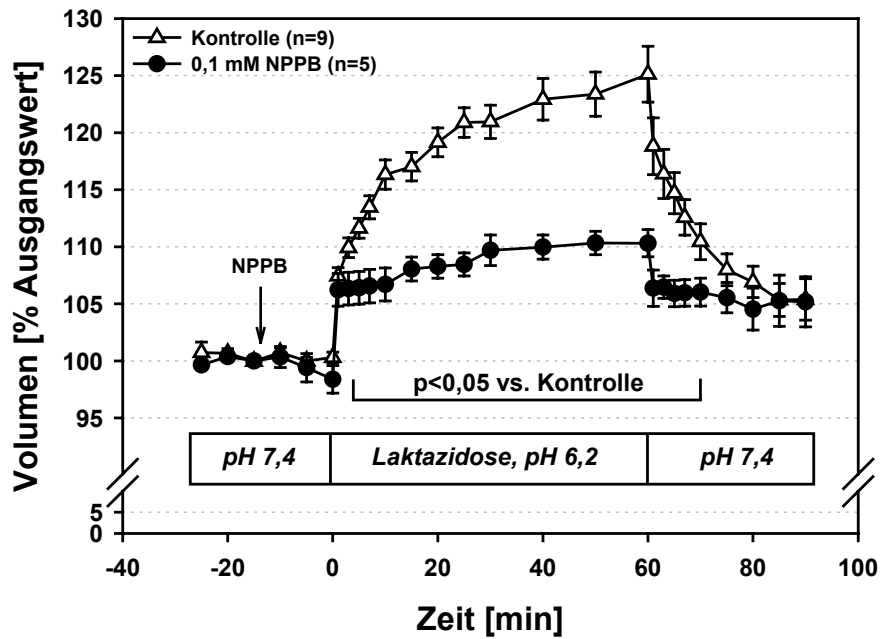


Abb. 3.8: Hemmung der Azidose-induzierten Schwellung von C6 Gliomzellen durch NPPB bei Verstärkung der intrazellulären Ansäuerung

Bereits unter Ausgangsbedingungen kam es durch Zugabe von NPPB zum Absinken von pH_i , während das Zellvolumen nicht beeinflusst wurde. Die Azidose-induzierte Zellschwellung wurde durch das Pharmakon eindrucksvoll gehemmt, die intrazelluläre Azidose war dagegen wesentlich ausgeprägter als bei den Zellen der Kontrollgruppe. Nach Neutralisierung kam es zur Erholung des Zellvolumens, wenngleich der Ausgangswert vor Azidose nicht erreicht wurde. Auch die Erholung des intrazellulären pH blieb im Gegensatz zur Kontrollgruppe unvollständig.

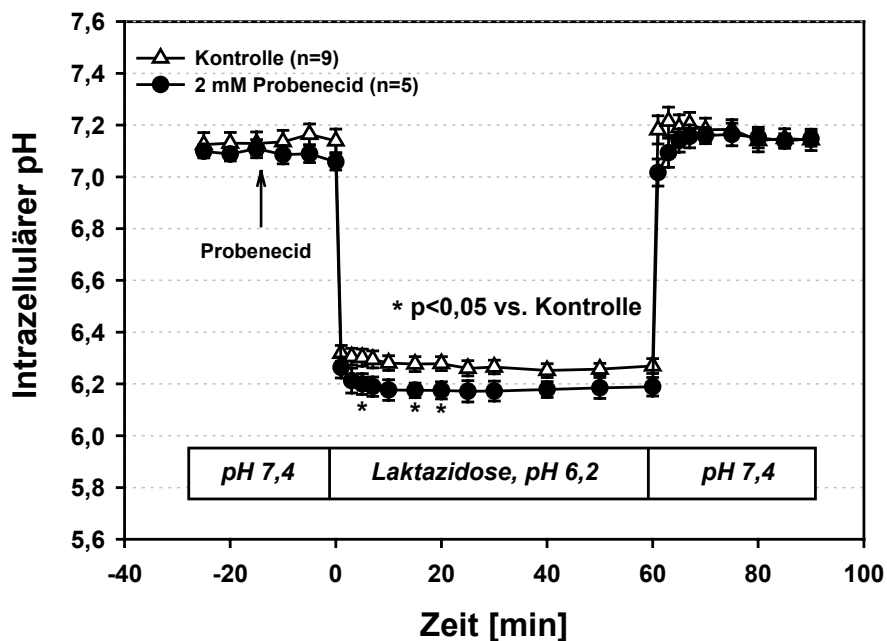
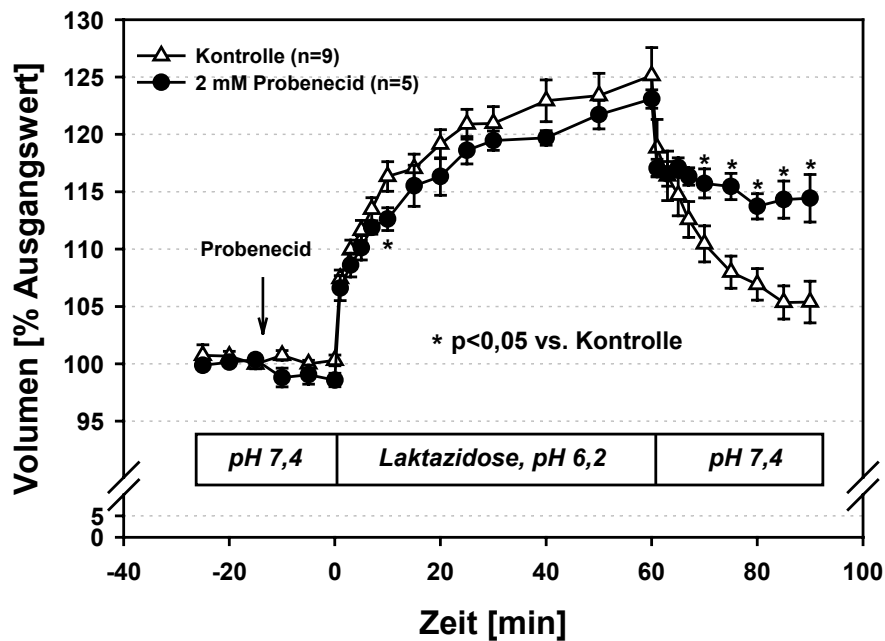


Abb. 3.9: Azidose-induzierte Schwellung und intrazelluläre Azidose von C6 Gliomzellen in Gegenwart von Probenecid (2 mM)

Probenecid führte unter Ausgangsbedingungen bei pH 7,4 zur leichten, wenn auch nicht signifikanten Zellschrumpfung und Abnahme von pH_i . Die Azidose-induzierte Schwellung wurde hingegen nur wenig beeinflusst. Immerhin war 10 min nach Azidoseinduktion die Zellschwellung signifikant geringer ausgeprägt. Auf der anderen Seite war pH_i zu Beginn der Laktazidose nach Vorbehandlung mit Probenecid stärker abgesunken. Weiterhin war die Erholung des Zellvolumens nach Neutralisierung des Mediums deutlich gehemmt. Beim Verlauf von pH_i hingegen wurde nach Neutralisierung kein Unterschied zur Kontrollgruppe gefunden.

Neben der eindrucksvollen Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung hatte NPPB auch Folgen für den Verlauf von pH_i . Bereits 5 min nach Applikation unter Ausgangsbedingungen kam es zu einer signifikanten Abnahme von pH_i ($p < 0,05$). Drei Minuten nach Beginn der Laktazidose war pH_i sogar signifikant unter den intrazellulären pH der Kontrollgruppe abgefallen. Die in Gegenwart von NPPB stärkere Ausprägung der intrazellulären Ansäuerung blieb bis zum Ende der Azidosephase bestehen. Unter NPPB wurde ein Maximum von pH_i bei $6,03 \pm 0,01$ 25 min nach Milchsäurezugabe gefunden, im Vergleich zum pH_i von $6,26 \pm 0,03$ bei den Zellen der Kontrollgruppe ohne NPPB. Nach Neutralisierung des Mediums kehrte pH_i nicht mehr auf das Niveau der Zellen der Kontrollgruppe zurück, sondern blieb signifikant erniedrigt (Abb. 3.8).

3.8 Probenecid

Im Gegensatz zur ausgeprägten Wirksamkeit der oben genannten Inhibitoren anorganischer Anionenkanäle auf Zellvolumen und ggf. pH_i bei der Azidose-induzierten Zellschwellung, hatte Probenecid als Inhibitor organischer Anionenkanäle kaum eine Wirkung unter diesen Bedingungen. Nach Applikation von Probenecid kam es in der Kontrollphase bei neutralem pH im Medium zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Zellschrumpfung. Nach Ansäuern wurde in den Versuchen mit Probenecid eine Zellschwellung beobachtet, die im Verlauf und Ausmaß von Schwellung der Zellen der Kontrollgruppe entsprach. Das Zellvolumen erreichte nach 60 min eine Maximum von $123,1 \pm 0,8$ % im Vergleich zu $125,1 \pm 2,5$ % in der Kontrollgruppe (nicht signifikant; $n=5$ bzw. 9). Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe bestanden allerdings nach Neutralisierung des Mediums. Die Erholung des Zellvolumens verlief in den Probenecidversuchen nur in den ersten 7 min so wie in der Kontrollgruppe. Die weitere Erholung des Zellvolumens war in diesen Versuchen erheblich gehemmt. Am Ende des Experiments 30 min nach Neutralisieren blieben die Zellen mit $114,4 \pm 2,1$ % des Ausgangsvolumens gegenüber $105,4 \pm 1,9$ % des Zellvolumens der Kontrolle weiterhin erheblich geschwollen ($p < 0,05$; $n=5$ bzw. 9) (Abb. 3.9).

Unter Probenecid entwickelte sich schon in der Kontrollphase eine geringfügige intrazelluläre Azidose gegenüber den Zellen ohne Probenecid, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Bereits 5 min nach Zugabe von Milchsäure war die dadurch hervorgerufene zelluläre Azidose statistisch signifikant stärker ausgeprägt. Auch 15 bzw. 20 min nach Ansäuern des Mediums war die Abnahme von pH_i bei den Zellen mit Probenecid

auf $6,18 \pm 0,03$ signifikant stärker als bei den Zellen der Kontrollgruppe. Mit Neutralisierung des Mediums normalisierte sich auch pH_i , wenngleich der Verlauf der Erholung etwas verzögert war (nicht signifikant vs. Kontrollen) (Abb. 3.9).

4. Bedeutung von Kalziumionen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung von Kalziumionen auf die Azidose-induzierte Gliazellschwellung und intrazelluläre Azidose untersucht. Um beurteilen zu können, ob eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, z.B. Mitochondrien und dem sarkoplasmatischem Retikulum, und/oder extrazelluläre Kalziumionen für die Volumen- und pH_i -Veränderung von Gliazellen in Azidose eine Rolle spielen, wurden die Versuche mit Kalzium-freiem Versuchsmedium bzw. dem intrazellulären Kalziumchelator BAPTA-AM und eine Kombination dieser Protokolle durchgeführt.

4.1 Kalzium-freies Medium pH_e 7,4

Zunächst wurde der Einfluss eines Kalzium-freien Versuchsmediums auf das Zellvolumen unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 geprüft.

Wie zuvor für die Kontrollversuche, in Medium mit physiologischer Kalziumkonzentration beschrieben, kam es auch nach Suspension der Zellen in Kalzium-freiem Medium zur Abnahme des Zellvolumens über den Beobachtungszeitraum von 120 min.

In Kalzium-freiem Medium schrumpften suspendierte Gliazellen nach 120 min auf einen Wert von $96,4 \pm 2,3$ %. Dies entspricht weitgehend der Zellschrumpfung in der Kontrollgruppe mit Kalzium-haltigem Suspensionsmedium ($96,5 \pm 1,6$ %) (Abb. 3.10).

Die Suspension von Gliazellen in Kalzium-freiem Medium ergab über den gesamten Beobachtungszeitraum keinen Unterschied bzgl. pH_i gegenüber dem der Kontrollen. Zu Beginn des Versuchs mit Kalzium-freiem Medium war pH_i bei $7,08 \pm 0,18$, schwankte geringfügig um diesen Wert und erreichte nach 120 min $7,10 \pm 0,10$ (Abb. 3.10).

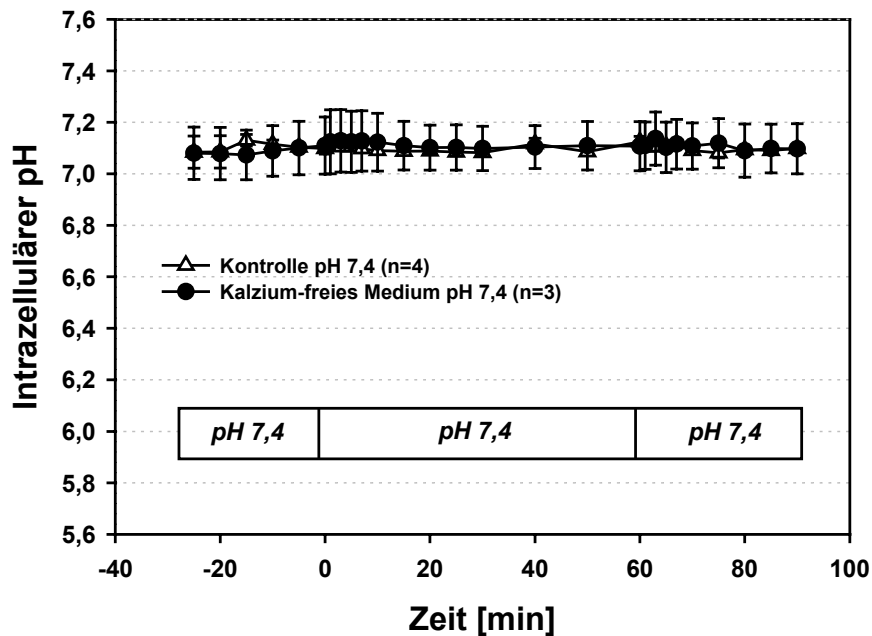
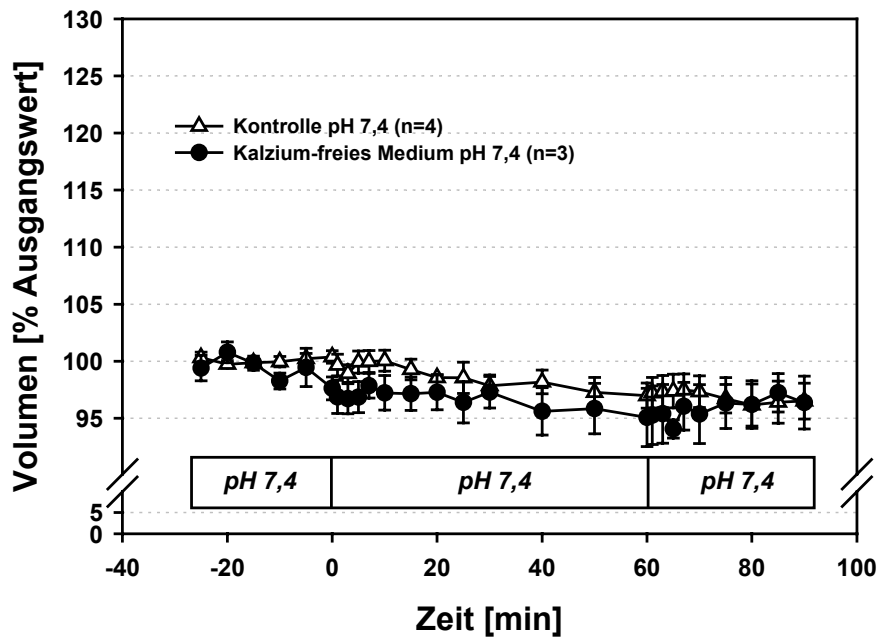


Abb. 3.10: Volumen und intrazellulärer pH von C6 Gliomzellen nach isotoner Suspension in Kalzium-freiem Medium bei pH 7,4

Die Wirkung auf das Volumen von C6 Gliomzellen ist im oberen Abschnitt, die Wirkung auf pH_i im unteren Abschnitt der Abbildung dargestellt. Die Abwesenheit von Kalziumionen im Medium hatte keinen Einfluss auf beide Messgrößen. Zellvolumen wie pH_i entsprachen über einen Beobachtungszeitraum von 2 h dem Wert der Kontrollversuche mit Kalzium-haltigem Medium.

4.2 Kalzium-freies Medium pH_e 6,2

Nachdem wie erwähnt die Suspension von Gliazellen in Kalzium-freiem Medium weder Zellvolumen noch pH_i im Vergleich zum Kontrollmedium verändert, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss der Kalzium-freien Suspension auf die Azidose-induzierte Zellschwellung und intrazelluläre Azidose untersucht.

Wie in den vorangehenden Versuchen kam es bei neutralem pH im Medium zu einer geringen Volumenabnahme. Die Ansäuerung auf pH 6,2 führte bereits 1 min nach Azidose-Induktion zu einer prompten Schwellung der Zellen mit einem Volumen von $104,2 \pm 1,2$ % des Ausgangswerts. Im nachfolgenden Verlauf des Azidoseexperiments kam es allerdings zu keiner weiteren Volumenzunahme. Nach 40 min wurde das Maximum bei $107,0 \pm 2,0$ % erreicht. Im Vergleich zu den Azidoseversuchen mit normaler Kalziumkonzentration im Medium war die Zellschwellung in Kalzium-freiem Medium über den gesamten Verlauf der Milchsäureexposition abgeschwächt ($p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n=5$ bzw. 9).

Nach Neutralisieren des Medium-pH kam es zur Erholung des Zellvolumens, das im weiteren Verlauf sogar auf $97,1 \pm 2,0$ % des Ausgangswertes schrumpfte. Der Unterschied gegenüber dem Ausgangswert vor Azidose war statistisch jedoch nicht signifikant (Abb. 3.11).

Im Gegensatz zu dieser deutlichen Wirkung von Kalzium-freiem Medium auf die Azidose-induzierte Zellschwellung, wurde kein pH_i-Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. pH_i entsprach zu jedem Zeitpunkt des Experiments, d.h. vor, während und nach Azidose, weitgehend dem intrazellulären pH von Zellen der Kontrollgruppe mit Kalzium-haltigem Medium. Nach Beginn der Laktazidose bei pH 6,2 kam es der Kontrollgruppe entsprechend zum Absinken von pH_i ohne Auftreten von signifikanten Schwankungen. Mit Normalisieren des Medium-pH auf 7,4 erholte sich pH_i ebenfalls auf den Ausgangswert (Abb. 3.11).

4.3 Intrazelluläre Kalziumchelierung

Um zu prüfen, welche Rolle die Freisetzung von intrazellulären Kalziumionen bei der Azidose-induzierten Schwellung und der zellulären Azidose hat, wurden Gliazellen mit dem membranpermeablen Kalziumchelator BAPTA-AM inkubiert.

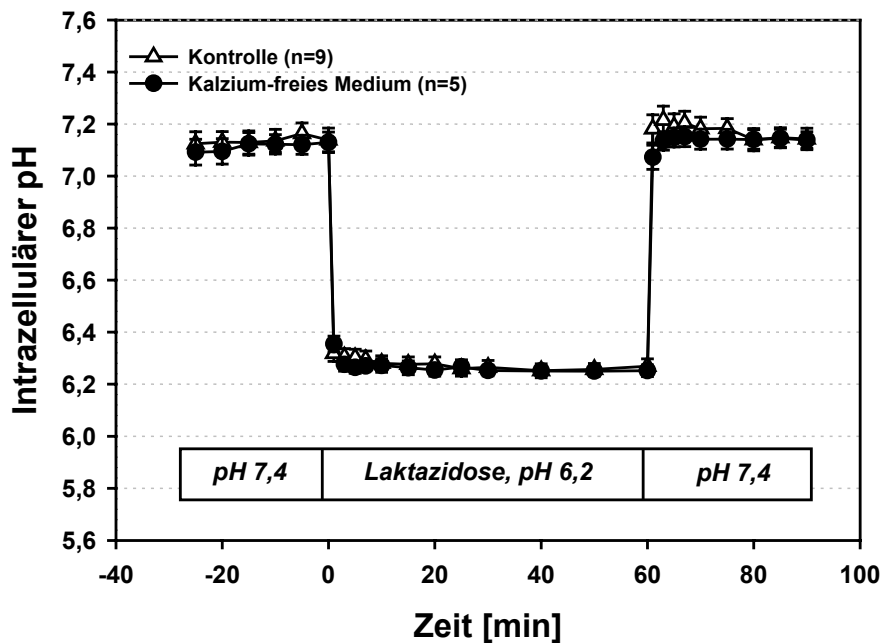
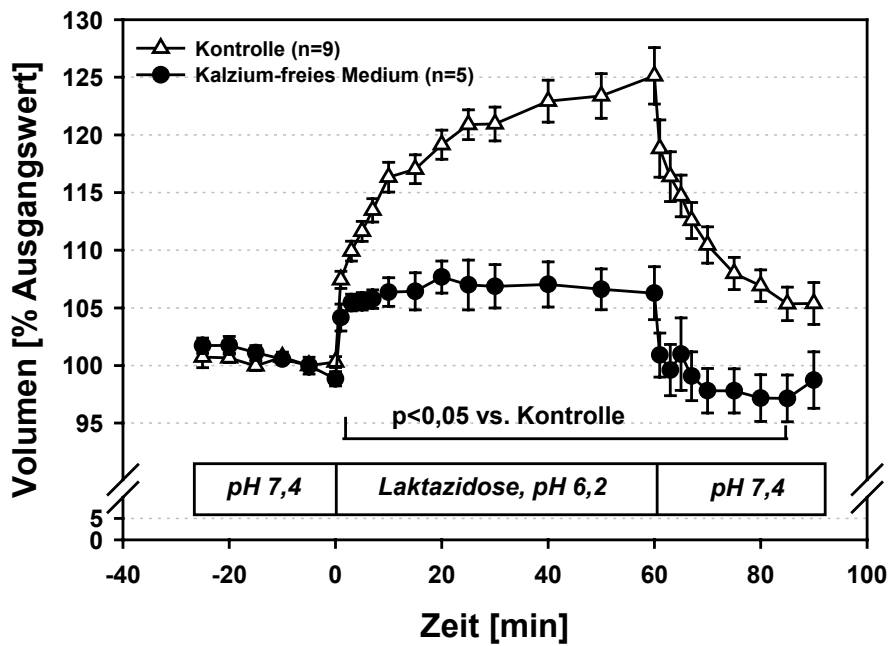


Abb. 3.11: Azidose-induzierte Zellschwellung und intrazelluläre Azidose – Versuche mit Kalzium-freiem Medium

Unter Kontrollbedingungen vor Azidose kam es in den Versuchen mit Kalzium-freiem Versuchsmedium zu einer geringen, nicht signifikanten Schrumpfung des Zellvolumens. Das Ausmaß der nachfolgenden Azidose-induzierten Schwellung war von Beginn an deutlich reduziert. Auch nach Neutralisierung des Mediums war das Zellvolumen signifikant kleiner als in den Kontrollversuchen mit Kalzium-haltigem Medium. Auf der anderen Seite bestanden in keiner Versuchsphase Unterschiede zwischen dem intrazellulären pH von Zellen der Kontrollgruppe und den Zellen in Kalzium-freiem Medium.

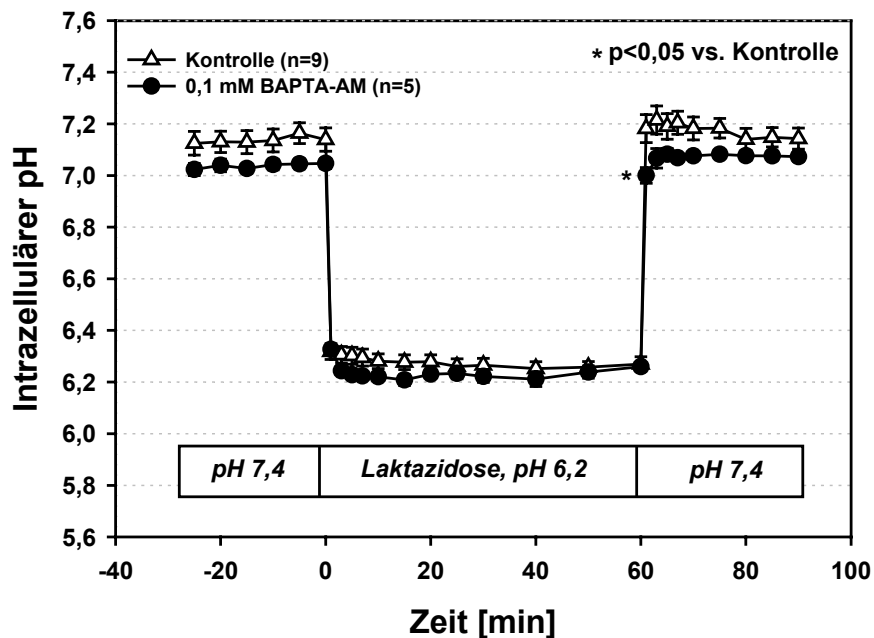
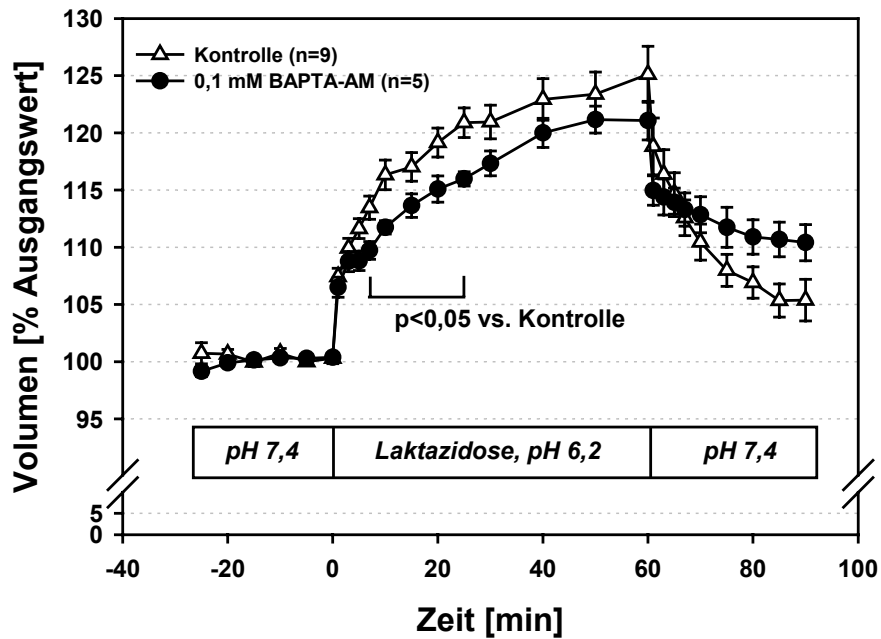


Abb. 3.12: Milchsäure-induzierte Schwellung und Ansäuerung von Gliazellen unter Inkubation mit BAPTA-AM

Der intrazelluläre Kalzium-Chelator BAPTA-AM hatte unter Ausgangsbedingungen keinen Einfluss auf das Zellvolumen, führte jedoch zu einer geringen Abnahme von pH_i . Die Azidose-induzierte Schwellung von C6 Gliomzellen war mäßig eingeschränkt, ebenso die Erholung des Zellvolumen nach Neutralisierung des Mediums. In der Azidosephase wurde kein Unterschied zwischen pH_i der Zellen der Kontrollgruppe und dem der mit BAPTA-AM inkubierten Zellen beobachtet. Nach Neutralisierung kehrte pH_i der Zellen mit BAPTA-AM auf ein gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigtes Niveau zurück.

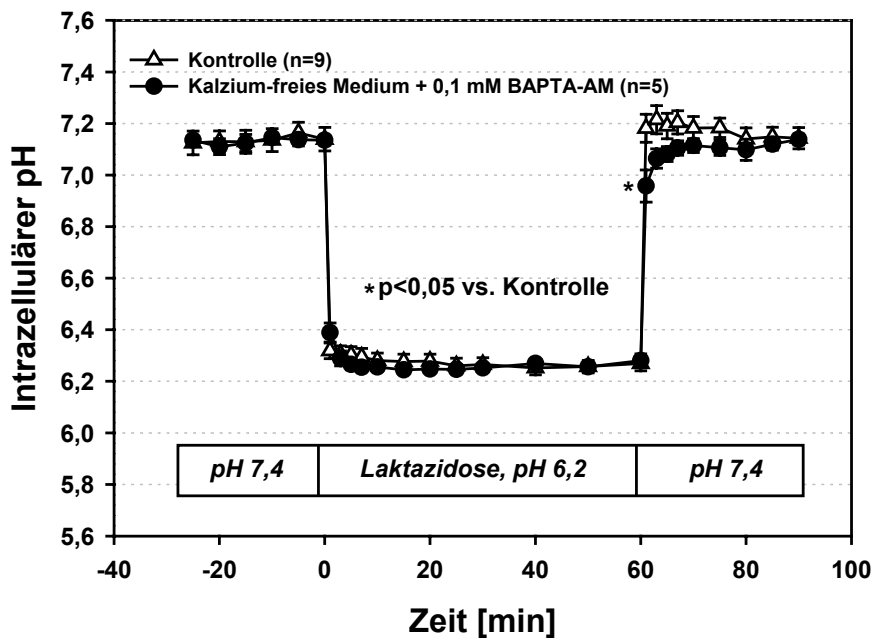
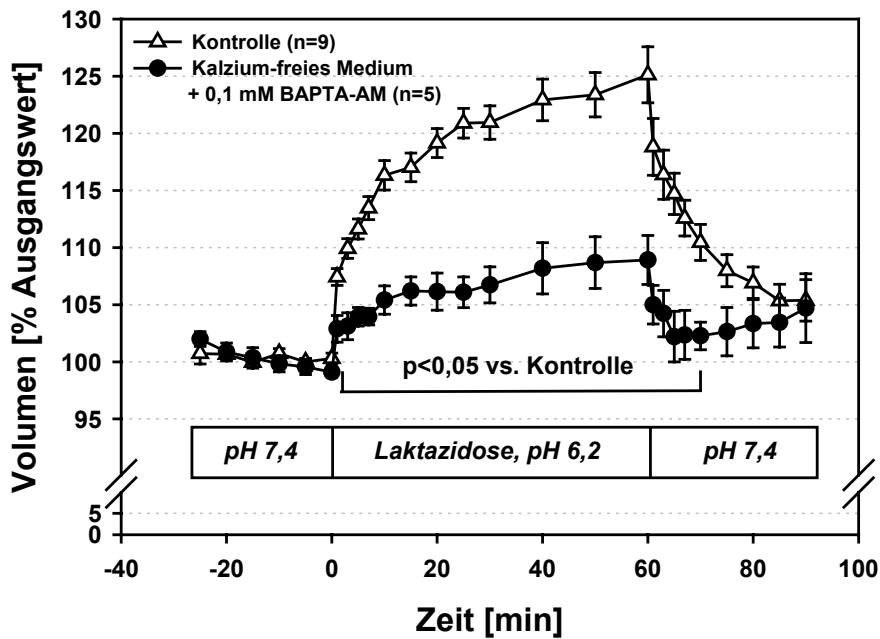


Abb. 3.13: Milchsäure-induzierte Schwellung und Ansäuerung von C6 Gliomzellen nach Suspension in Kalzium-freiem Medium und Inkubation mit dem intrazellulären Kalzium-Chelator BAPTA-AM

Wie in den Versuchen mit Kalzium-freiem Medium kam es zu einer geringfügigen Schrumpfung der Zellen vor Einleitung der Azidose, während pH_i den Kontrollwerten entsprach. Mit Zugabe von Milchsäure kam es zu einer erheblich abgeschwächten Zellschwellung, pH_i hingegen fiel auf das gleiche Niveau wie bei Zellen der Kontrollgruppe. Nach Neutralisierung erholte sich das Zellvolumen zunächst, gefolgt von einer erneuten Expansion gegen Ende der Beobachtung. pH_i erholte sich mit Verzögerung auf seinen Ausgangswert.

In der Kontrollphase vor Azidose zur Erfassung von Ausgangswerten wurden keine signifikanten Schwankungen des Zellvolumens in dem Beobachtungszeitraum von 30 min gefunden. Mit Beginn der Laktazidose kam es auch in den Versuchen mit BAPTA-AM zum typischen Anstieg des Zellvolumens. Der Verlauf der Zellschwellung entsprach weitgehend dem der Kontrollgruppe, wenngleich das Ausmaß der Schwellung nicht ganz erreicht wurde ($p < 0,05$ vs. Kontrolle für die Zeitpunkte 7-25 min; $n=5$ bzw. 9) (Abb. 3.12). Das in den Versuchen mit BAPTA-AM gefundene Schwellungsmaximum nach Zugabe von Milchsäure lag bei $121,1 \pm 1,2$ % des Ausgangswerts (50 min). Die durch Neutralisieren induzierte Erholung des Zellvolumens blieb allerdings im Vergleich zu den Kontrollversuchen unvollständig. Das Volumen von mit BAPTA-AM inkubierten Zellen äquilibrierte nach 30 min bei $110,4 \pm 1,6$ % des Ausgangswerts im Vergleich zu $105,4 \pm 1,8$ % des Volumens der Kontrollgruppe (nicht signifikant; $n=5$ bzw. 9) (Abb. 3.12).

Bereits vor Induktion der Azidose hatten die mit BAPTA-AM inkubierten Zellen einen niedrigeren intrazellulären pH von $7,02 \pm 0,02$ bis $7,05 \pm 0,02$ verglichen mit $7,13 \pm 0,04$ bis $7,16 \pm 0,04$ von Gliazellen der Kontrollgruppe (nicht signifikant). Nach Zugabe von Milchsäure (Medium pH 6,2) wurde eine Abnahme von pH_i bei den Zellen mit BAPTA-AM beobachtet, deren Ausmaß dem der Kontrollversuche ohne BAPTA-AM entsprach. Die nachfolgende Neutralisierung des Mediums ging auch in diesen Versuchen mit einer nahezu vollständigen Erholung von pH_i der Zellen einher (Abb. 3.12).

4.4 Intrazelluläre Kalziumchelierung und Kalzium-freies Medium

Wie bei den Versuchen mit Suspension von Gliazellen in Kalzium-freiem Medium kam es schon in der Kontrollphase vor Azidose unter Kombination mit dem intrazellulären Kalziumchelator BAPTA-AM zur leichten Schrumpfung des Ausgangszellvolumens um ca. 2-3 %. Mit Induktion der Laktazidose (pH 6,2) entwickelte sich eine nur mäßig ausgeprägte Zellschwellung im Vergleich zu den Kontrollversuchen. Eine Minute nach Zugabe von Milchsäure wurde ein Zellvolumen von $102,9 \pm 1,2$ % des Ausgangswerts im Vergleich zu $107,4 \pm 0,7$ % des Volumens von Zellen der Kontrollgruppe gefunden. Nach 60 min erreichten die Zellen ein Schwellungsmaximum von $108,9 \pm 2,1$ % ($p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n=5$ bzw. 9) (Abb. 3.13).

Im Gegensatz zur eindrucksvollen Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch BAPTA-AM plus Kalzium-freies Medium hatten diese Versuchsbedingungen nur einen geringen Einfluss auf die intrazelluläre Ansäuerung. Der Ausgangs- pH_i sowie pH_i während

Azidose entsprachen dem pH_i von Zellen der Kontrollgruppe. Mit Neutralisieren auf pH 7,4 kehrte pH_i von Zellen der Versuche mit Kalzium-freiem Medium plus BAPTA-AM allerdings verzögert auf seinen Ausgangswert zurück. Ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber den Zellen der Kontrollgruppe wurde jedoch nur 1 min nach Neutralisieren beobachtet (Abb. 3.13).

D) Diskussion

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von verschiedenen Membrantransport- und -kanalsystemen untersucht, der Einfluss von Chlorid-, Bikarbonat- oder Kalzium-freien Medien sowie des intrazellulären Kalziumchelators (BAPTA-AM) auf die Azidose-induzierte Schwellung und Ansäuerung von C6 Gliomzellen. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von *in vitro* suspendierten Gliazellen. Das Zellvolumen und der intrazelluläre pH (pH_i) wurden durchflusszytometrisch, letzterer unter Verwendung des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs BCECF bestimmt.

C6 Gliomzellen können unter gleichbleibenden Bedingungen über mehr als zwei Stunden problemlos als Einzelzellen suspendiert werden ohne Veränderung der Vitalität oder anderen wichtigen zellphysiologischen Parametern. Mit Induktion der Azidose des Mediums bei pH 6,2 kam es sofort zur Schwellung der suspendierten Zellen mit einem Maximum nach 60 min und Absinken von pH_i . Mit Neutralisieren des Mediums erholte sich das Zellvolumen jedoch im Gegensatz zum intrazellulären pH nicht auf den Ausgangswert vor Ansäuern.

Die Azidose-induzierte Zellschwellung wurde durch Suspension der Gliomzellen in Chlorid- oder Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium erheblich abgeschwächt. Entsprechende Wirkungen wurden mit den Transport- bzw. Kanalinhibitoren DIDS, Niflumet, Bumetanid, Furosemid oder NPPB erzielt. Mit Ausnahme der Versuche mit dem Kotransportinhibitor Bumetanid war die Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung stets mit Veränderungen des pH_i -Verlaufs assoziiert.

Der Inhibitor von organischen Anionentransportern Probenecid hatte nach Ansäuerung auf das Zellvolumen nur unwesentlichen Einfluss, konnte aber die Erholung des Zellvolumens nach Neutralisierung des Mediums modifizieren. Der intrazelluläre pH war in diesen Experimenten während der Ansäuerung des Mediums gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

In Abwesenheit von Kalziumionen war die Azidose-induzierte Schwellung signifikant gehemmt, während keine Veränderungen von pH_i im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit kalziumhaltigem Medium zu beobachten waren. Die Chelierung von intrazellulären Kalziumionen hatte keinen spezifischen Einfluss, weder auf das Zellvolumen noch auf den intrazellulären pH.

2. Methodendiskussion

2.1 Das *in vitro* Modell

Bei der zerebralen Ischämie oder dem Schädel-Hirn-Trauma kommt es gleichzeitig zur Aktivierung zahlreicher komplexer pathophysiologischer Prozesse. Die terminale Depolarisation nach kompletter Ischämie oder Anoxie führt zur Nivellierung transmembranärer Ionengradienten, d.h. zum Anstieg der interstitiellen Kaliumkonzentration und Absinken der interstitiellen Natrium- und Kalziumkonzentration. Darüber hinaus werden Exzitotoxine wie Glutamat und Aspartat in den Extrazellulärraum freigesetzt. Es kommt zur Produktion von freien Radikalen, zur Lipidperoxidation und Bildung und Freisetzung von Arachidonsäure und vielen anderen Mediatoren des Zellschadens. Die Aktivierung der anaeroben Glykolyse und gleichzeitige ATP-Verlust führt zur Akkumulation von Milchsäure mit Absinken des Gewebe-pH. Die Vielzahl der gleichzeitig ablaufenden Veränderungen macht es *in vivo* nahezu unmöglich, zwischen kausal verantwortlichen Mechanismen, z.B. der Zellschwellung und Zellschädigung und begleitenden Epiphänomenen zu unterscheiden. Aus diesem Grunde werden wichtige Teilaspekte unter Einsatz von *in vitro* Modellen mit gezielter Betrachtung einzelner Faktoren analysiert unter Konstanthaltung der Rahmenbedingungen. Viele Arbeitsgruppen versuchen, neurophysiologische Fragen mit *in vitro* Modellen wie organotypischer Kultur, kultivierten Gliazellen, Neuronen oder Mischkulturen zu beantworten.

Die für die vorliegende Arbeit verwendete *in vitro* Methode mit Verwendung suspendierter C6 Gliomzellen erlaubt, Veränderungen gezielt vorzunehmen und zu kontrollieren und pathophysiologisch relevante Bedingungen zu simulieren. Faktoren der Homöostase, z.B. pO_2 , pCO_2 , pH, Temperatur oder die Konzentrationen pharmakologisch und toxikologisch relevanter Substanzen hin bis zur Osmolarität und Elektrolytkonzentrationen werden in engen Grenzen konstant gehalten bzw. gezielt verändert. Durch das *in vitro* praktisch unendlich grosse Volumenverhältnis von Extra- zu Intrazellulärraum spielen zelluläre Reaktionen, z.B. die Freisetzung von Ionen oder von Stoffwechselprodukten in das Medium kaum eine Rolle (Kempski et al., 1983; Kempski et al., 1982).

In Abbildung 4.1 sind die Steuer- und Messgrößen des von mir verwendeten Modells schematisch dargestellt (Zimmer, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde als Steuergröße der Medium-pH durch Zugabe von isotoner Milchsäure gezielt verändert. Andere für die Volumenhomöostase der suspendierten Zellen wichtige Parameter, z.B. die

Mediumosmolarität und Elektrolytkonzentrationen wurden strikt konstant gehalten, ein experimentelles Vorgehen das *in vivo* nicht möglich ist. Die durch die Milchsäureazidose hervorgerufene Volumenzunahme und Ansäuerung der Zellen kann deshalb direkt auf das Absenken des Medium-pH zurückgeführt werden – entsprechendes gilt bei Applikation spezifischer Pharmaka. Ein Problem des Einsatzes von *in vitro* Methoden ist natürlich die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation (Kimmelberg, 1998). Einzelzellen in Suspension haben z.B. nicht den im physiologischen Gewebe vorhandenen Zellkontakt und damit ggf. wichtige Zell-Zell-Interaktionen. Aus diesem Grunde sollten wichtige *in vitro* gewonnene Ergebnisse *in vivo* bestätigt oder verworfen werden.

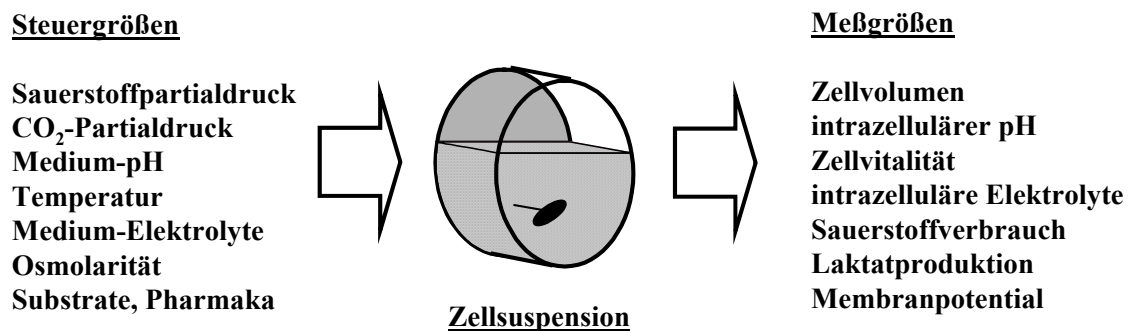


Abb. 4.1: Steuer- und Messgrößen des *in vitro* Modells (modifiziert nach Zimmer 1989)
Das Suspensionsmodell bietet die Möglichkeit, die links dargestellten Steuergrößen konstant zu halten bzw. gezielt zu verändern. Auswirkungen auf die rechts dargestellten Messgrößen können mit geeigneten Analyseverfahren quantitativ erfasst werden.

2.2 C6 Gliomzellen als Modellzellen

Auf der Basis von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist vermutet worden, dass neben den von Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden, vorwiegend Astrozyten unter pathologischen Bedingungen schwellen (Baethmann, 1978; Kimmelberg, Ransom, 1986; Bullock et al., 1991; Kimmelberg, 1995). *In vitro* ist auch bei Neuronen das Phänomen der zytotoxischen Zellschwellung gezeigt worden. Seine Bedeutung unter *in vivo*

Bedingungen wird jedoch weniger klar verstanden (Staub et al., 1993a; Mackert, 1994). Für die vorliegenden Untersuchungen wurden C6 Gliomzellen quasi stellvertretend für Astrozyten als Modellzellen mit gliaspezifischen Eigenschaften ausgewählt. C6 Gliomzellen sind von einem mit N-Nitrosomethylharnstoff induzierten Gliazelltumor der Ratte mit hoher Expression von S-100, einem Glia-spezifischem Marker-Protein, isoliert und als permanente Zelllinie etabliert worden (Benda et al., 1968). Ausgehend von zunächst Oligodendrozyten-ähnlichen Eigenschaften der Zellen während jungem Passagealter kommt es später mit weiterer Subkultivierung zur Transdifferenzierung in einen astrozytären Zelltyp mit Expression Astrozyten-spezifischer Enzyme (Parker et al., 1980). In diesem Stadium haben C6 Gliomzellen qualitativ und quantitativ eine hochgradige Übereinstimmung ihres Phänotyps mit primär kultivierten Astrozyten wichtige zelluläre Merkmale betreffend (Tab. 4.1) als Voraussetzung für ihre Verwendung als Modellzellen für Astrozyten. C6 Gliomzellen synthetisieren gliaspezifische Markerproteine, z.B. das saure Gliafaserprotein GFAP (glial fibrillary acidic protein) und Glutaminsynthetase und verfügen über für Astrozyten typische 'uptake'-Mechanismen für Neurotransmitter wie Glutamat, Aspartat und γ -Aminobutyrat (GABA). Im übrigen werden auch bei C6 Gliomzellen wie bei Astrozyten Volumenregulationsmechanismen beobachtet, z.B. die regulatorische Volumenabnahme (RVD) nach hypotoner Suspension (Tab. 4.1). Auch bzgl. relevanter intrazellulärer Elektrolyte und Membrantransportmechanismen für Ionen gibt es enge Analogien zwischen C6 Gliomzellen und Astrozyten.

Bei beiden Zelltypen konnte der für die intrazelluläre pH-Regulation bedeutende Na^+/H^+ -Antiporter, der Na^+ -abhängige und -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter sowie der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter nachgewiesen werden. Allerdings sind im Gegensatz zu primär kultivierten Astrozyten bei C6 Gliomzellen bisher keine Hinweise für einen elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport erhalten worden, der zur pH_i -Regulation beiträgt. Nach Glutamatexposition zeigen beide Zelltypen eine vergleichbare Schwellung, auch die Schwellungsreaktion auf Arachidonsäure ist weitgehend vergleichbar. Die eigenen Beobachtungen bestätigen das in früheren Experimenten berichtete Ausmass der zellulären Volumenzunahme und der intrazellulären Ansäuerung von primär kultivierten Astrozyten bei der Laktazidose.

Für die vorliegenden Untersuchungen wären demnach auch Astrozyten aus Primärkultur geeignet gewesen. Die Verwendung von C6 Gliomzellen hat allerdings den Vorteil, dass nahezu beliebig grosse Mengen homogener Zellen aufgrund der kurzen Generationszeit zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorzug ist die gegenüber primär kultivierten Astrozyten

geringe Variabilität des Volumens suspendierter Zellen, wodurch die zuverlässige Erfassung selbst geringer Veränderungen der Zellgrösse erheblich erleichtert ist.

ZELLMARKER UND FUNKTIONEN	C6	Literatur	Astrozyten	Literatur
<i>Gliaspezifische Proteine</i>				
1. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	+	Bissell et al., 1974 Liao et al., 1978 Bignami et al., 1979	+	Antanitus et al., 1975 Sensenbrenner et al., 1980 Hansson et al., 1982
2. Glutamin-Synthetase (GS) [mM/min/mg Prot.]	8,3-33 1,1 5,8-8	Parker et al., 1980 Pishak, Phillips, 1980 Davies, Vernadakis, 1986	12,2 23-31	Juurlink, 1982 Hansson, 1986
<i>Membrantransporter</i>				
1. Glutamat	+	Nicklas, Browning, 1983 Schneider et al., 1992	+	Schousboe et al., 1977 Hansson, 1986
2. Aspartat	+	Erecinska et al., 1986b	+	Drejer et al., 1983
3. γ -Aminobutyrat	+	Erecinska et al., 1986b	+	Hertz et al., 1978
4. Na^+/H^+ Antiport	+	Jean et al., 1986 Jakubovicz et al., 1987	+	Kimelberg et al., 1979 Mellergard et al., 1992 Boyarsky et al., 1993a
5. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Antiport	+	Staub et al., 1993b Shrode, Putnam, 1994	+	Kimelberg et al., 1979 Shrode, Putnam, 1994
6. $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ Kotransport	+	Chassande et al., 1988 Staub et al., 1993b	+	Tas et al., 1987 Kimelberg, Frangakis, 1985
7. $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ Kotransport	-	Shrode, Putnam, 1994	+	Shrode, Putnam, 1994 Brune et al., 1994
<i>Regulatorische Volumenabnahme</i>				
	+	Kempski et al., 1983 Chassande et al., 1988 Lohr, Yohe, 1994	+	Olson et al., 1986 Kimelberg, 1987 Hoffmann, 1992
<i>Elektrolytkonzentrationen</i>				
1. Natrium [mM]	16,5 18 6	Kempski et al., 1987 Kukes et al., 1976 Erecinska, Silver, 1986a	28 15	Grossman et al., 1968 Rose, Ransom, 1996
2. Kalium [mM]	154 145 150	Kempski et al., 1987 Kukes et al., 1976 Erecinska, Silver, 1986a	131 130	Grossman et al., 1968 Kimelberg et al., 1979
3. Chlorid [mM]	14	Kukes et al., 1976		
<i>Membranpotential [mV]</i>				
	-90 -88	Erecinska, Silver, 1986a Erecinska et al., 1995	-75 -60 - -80	Anderson et al., 1995 Kimelberg, O'Connor, 1988

Tab. 4.1: Gegenüberstellung biochemischer und funktioneller Parameter von C6 Gliomzellen und primär kultivierten Astrozyten

Die Tabelle zeigt eine grosse Gemeinsamkeit wichtiger Eigenschaften von C6 Gliomzellen und primär kultivierten Astrozyten als Rechtfertigung, C6 Gliomzellen als Modellzellen für Astrozyten einzusetzen.

2.3 Messung des Zellvolumens

Für die Messung des Volumens kultivierter Zellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Von Bedeutung sind die Bestimmung des intrazellulären Wassergehaltes, lichtmikroskopische Methoden, Ionen-selektive Mikroelektroden, die Messung von Laser-Streulicht, Impedanzmessungen und durchflusszytometrische Methoden. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile.

Bei der Bestimmung des intrazellulären Wassergehaltes mit radioaktiven Markern werden bevorzugt [¹⁴C]-Harnstoff oder [¹⁴C]3-O-Methylglukose verwendet. Eine Voraussetzung ist die gleichmässige Verteilung der Indikatorsubstanz zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Bisher ist jedoch nicht zweifelsfrei geklärt worden, ob diese Voraussetzung erfüllt ist. Abgesehen davon ist die zeitliche Auflösung der Methode wegen der Verteilungskinetik des Indikators und der notwendigen präparatorischen Schritte stark eingeschränkt (Kimmelberg et al., 1992). Die Empfindlichkeit der Methode ist gering - es werden nur Veränderungen des Zellvolumens grösser 10 % erfasst.

Mikroskopische Methoden haben den grossen Vorteil, Zellen gleichzeitig morphologisch beurteilen zu können. Allerdings werden mit mikroskopischen Methoden stets nur einzelne Zellen erfasst, die statistische Aussagekraft der Befunde ist eingeschränkt.

Neuere Methoden beruhen z.B. auf der Messung der elektrischen Impedanz von adhären Zellen (Kimmelberg et al., 1992) oder der Erfassung von Laser-Streulicht von Zellen in Kultur (McManus et al., 1993). Die Erfahrungen mit diesen Methoden sind jedoch gering, so dass keine Aussage über ihre Eignung gemacht werden kann.

Bei den durchflusszytometrischen Methoden geht es um die Messung des von der Zelloberfläche reflektierten Streulichts oder wie in den vorliegenden Experimenten der elektrischen Impedanz nach Coulter. Das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht von Zellen ist allerdings kein präzises Mass des Zellvolumens. Damit erhaltene Informationen betreffen die Oberflächenbeschaffenheit, die Dichte von zellulären Organellen bzw. die Granularität von Zellen.

Ein präzises Mass des Zellvolumens ist das Coulter-Signal – ein elektrischer Spannungsimpuls durch die vom Zellvolumen abhängende Erhöhung des elektrischen Widerstandes beim Durchtritt der suspendierten Zelle durch ein Messloch (siehe Methodik). Ein besonderer Vorteil des Coulter-Prinzips ist die schnelle Durchführung der Messung, damit die Gewährleistung einer hohen zeitlichen Auflösung. Bei jeder Messung kann eine grosse Zahl von Zellen, in dieser Arbeit $2-4 \times 10^4$, analysiert werden, wodurch die statistische

Zuverlässigkeit der Einzelmessung erheblich gewinnt. Das von uns verwendete System erfasst selbst geringe Volumenveränderungen von nur $\sim 2\%$, ist damit der Bestimmung des zellulären Wassergehaltes durch radioaktive Marker deutlich überlegen.

Ein Nachteil des Coulter-Prinzips ist die Notwendigkeit, Zellen für die Messung ihres Volumens suspendieren zu müssen. Für diesen Zweck werden Zellen von der Kulturschale enzymatisch abgelöst, wodurch ihre zumindest vorübergehende Schädigung in Kauf genommen werden muss. Davon abgesehen ist unklar, ob ein Verlust der Bindung der Zellen an die Unterlage und der möglicherweise noch wichtigere Verlust von Zell-Zell-Kontakten Einfluss hat auf interessierende Messparameter wie z.B. Zellvolumen, intrazellulärer pH u.a.m.

2.4 Methode der fluorimetrischen pH_i -Messung

Zur Bestimmung des intrazellulären pH sind bisher verschiedene Methoden zum Einsatz gekommen. Selten verwendete Methoden betreffen die extra/intrazelluläre Verteilung schwacher Säuren oder die Messung des 'chemical shifts' mittels NMR. Heute werden für experimentelle Zwecke pH-sensitive Mikroelektroden (Ammann et al., 1981) oder pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe bevorzugt. Im Gegensatz zur pH_i -Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt die pH_i -Bestimmung mit Mikroelektroden unmittelbarer. Die pH-Elektrode wird mit Hilfe von pH-Pufferlösungen kalibriert und erfasst nach Einstechen in die Zelle den zytosolischen pH. Allerdings ist die Messung mit Mikroelektroden invasiv und geht mit einer Traumatisierung der Zelle einher. Ein weiterer Nachteil ist das relativ langsame Ansprechen der Elektrode auf pH-Veränderungen, so dass schnelle pH_i -Änderungen nicht erfasst werden können. Darüberhinaus ist eine Messung immer auf einzelne Zellen beschränkt. Im übrigen sind pH-sensitive Mikroelektroden nur für Zellen mit einem Durchmesser $>15\ \mu\text{m}$ geeignet.

Die Messung des intrazellulären pH mit Hilfe von pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen ist erst in den letzten Jahren etabliert worden. Die 'Beladung' der Zellen mit dem Farbstoff ist durch die Applikation von Membran-permeablen Farbstoffestern möglich, die nach Übertritt in die Zelle durch Esterasen gespalten werden. Der Farbstoff akkumuliert nicht nur im Zytosol sondern auch in zellulären Organellen. Deshalb repräsentiert der mit Fluoreszenzindikatoren gemessene intrazelluläre pH nicht ausschliesslich das zytosolische Kompartiment, sondern einen mittleren pH-Wert unter Einbeziehung von farbstoffbeladenen Organellen. Fluoreszenzfarbstoffe sprechen auf pH-Veränderungen rasch an, ermöglichen

somit Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung. Ihre Verwendung in der Durchflusszytometrie erlaubt eine fast synchrone Messung des intrazellulären pH von vielen tausend Zellen. Die flowzytometrische Bestimmung des intrazellulären pH eines einzelnen Aliquots der Zellsuspension gestattet bereits eine valide Aussage. Die Messung der Fluoreszenz aus zwei verschiedenen Spektralbereichen des Fluoreszenzemission (mit Ermittlung des Emissionsquotienten) ist ein geeignetes Verfahren für die Korrektur von Messfehlern durch Farbstoffverlust der Zelle oder Ausbleichen des Farbstoffs. Diese Vorgänge spielen bei Beobachtungen über mehrere Stunden eine wichtige Rolle.

Derzeit stehen Fluorochrome wie Seminaaphthorhodafluore (SNARF), Orange Green-Derivate, Rhodole und andere Fluorescein- und Carboxyfluorescein-Derivate als membranpermeable Ester zur Verfügung. Für die vorliegenden Experimente wurde das Carboxyfluoresceinderivat 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. BCECF ist seit seiner Einführung durch Tsien in vielen Untersuchungen zum Einsatz gekommen (Rink et al., 1982). Aufgrund des günstigen pKs von ~ 7 eignet sich BCECF besonders für Messungen des intrazellulären pH (Nähe zwischen pH und pKs) – auch nach Ansäuern des Mediums.

Die Eichung wurde mit einem von Thomas beschriebenen Verfahren unter Verwendung von Nigericin vorgenommen (Thomas et al., 1979). Die dadurch mögliche Erfassung von absoluten pH_i -Werten ist allerdings mit Einschränkungen zu betrachten. Vergleichende Messungen des intrazellulären pH von grossen Gliazellen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) mit Mikroelektroden und BCECF haben gezeigt, dass Nigericin offenbar keinen vollständigen Angleich von pH_i an pH_e gewährleistet (Nett, Deitmer, 1996) als Indiz dafür, dass die Eichung nicht absolut verlässlich ist. Mit BCECF gemessene pH-Werte sind deshalb etwa um 0.12 Einheiten zu hoch. Diese systematische Abweichung war im geprüften pH-Bereich konstant. Offenbar ist die Messung von pH_i mit BCECF nach Eichung mit Nigericin der Messung mit pH-sensitiven Mikroelektroden bzgl. Genauigkeit unterlegen.

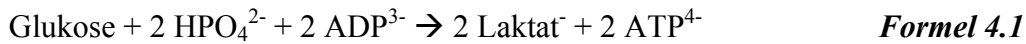
3. Die Milchsäureazidose als Mediator des zerebralen Sekundärschadens

Das Konzept, dass Milchsäure ein Mediator des Sekundärschadens des Gehirns ist, beruht auf Untersuchungen, die bereits vor über 20-30 Jahren durchgeführt worden sind. Wenngleich Hossmann und Kleihues 1973 gezeigt haben, dass eine globale Ischämie des Gehirns von nicht weniger als 60 min Dauer unter der Voraussetzung einer optimalen Rezirkulation überraschenderweise mit weitgehender Wiederherstellung der neurologischen Funktionen überlebt werden kann (Hossmann, Kleihues, 1973), haben Salford und Mitarbeiter in ihren ebenfalls 1973 veröffentlichten Untersuchungen die wesentlich schlechtere Erholung der neurologischen Funktion nach 60minütiger Hypoxie (Salford et al., 1973) dem Anstieg der Laktatkonzentration im Hirngewebe auf deutlich erhöhte Werte von bis zu 35 $\mu\text{mol/g}$ angelastet (Salford, Siesjo, 1974). Myers und Yamaguchi haben 1977 erstmals direkte Hinweise auf den deletären Einfluss der Laktazidose des Gehirns bei der zerebralen Ischämie publiziert (Myers, Yamaguchi, 1977). Junge Affen mit Hyperglykämie durch Glukoseinfusion hatten nach induziertem Herzstillstand einen deutlich stärker ausgeprägten Hirnschaden als normo- oder hypoglykämische Kontrolltiere. Die Hyperglykämie, der dadurch erhöhte Glukosegehalt des Gehirns hatte eine erheblich verstärkte anaerobe Glykolyse und damit Milchsäureakkumulation im ischämischen Hirngewebe hervorgerufen.

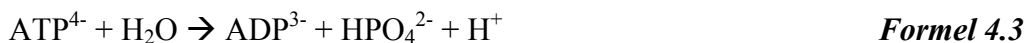
Inzwischen ist die Laktazidose als zentraler Mechanismus des zerebralen Sekundärschadens bei der Ischämie, dem Schädel-Hirn-Trauma und anderen Prozessen (z.B. Meningitis) anerkannt (Siesjo, 1988a; Siesjo et al., 1996).

Unter physiologischen Bedingungen wird der interstitielle pH des Hirngewebes in engen Grenzen reguliert. Er liegt etwa 0,10 pH-Einheiten unter dem Blut- oder Liquor-pH und ist, abhängig von der neuronalen Aktivität, kurzzeitigen Schwankungen ausgesetzt (Chesler, 1990). Für den 'mittleren' intrazellulären pH des Gehirns von Säugern ist unter Verwendung verschiedener Messmethoden ein Wert von etwa 7,1 berichtet worden. D.h. der normale intrazelluläre pH ist stets etwas niedriger als der extrazelluläre pH. Der intra-/extrazelluläre pH entspricht unter physiologischen Bedingungen einer normalen Laktatkonzentration von ca. 1-1,5 $\mu\text{mol/g}$ Hirngewebe (Rehncrona et al., 1980; Smith et al., 1986; Siesjo, 1988a).

Bei der zerebralen Ischämie, dem Schädel-Hirn-Trauma oder anderen akuten Insulten des Gehirns kommt es auch zur Störung der pH-Homöostase. Der Sauerstoffmangel aktiviert die anaerobe Glykolyse als Mechanismus der Gewebsazidose. Das Nettoergebnis der Glykolyse kann nach Krebs (Krebs et al., 1975) durch folgende Reaktionen beschrieben werden:



Nachdem die Reaktion nach Formel 4.1 überwiegt, scheint es zu einer nur unbedeutenden Produktion von H^+ -Ionen zu kommen. Allerdings ist der nachfolgende Abbau von ATP zu berücksichtigen, der zur weiteren Akkumulation von H^+ -Ionen über die folgenden Reaktionen beiträgt:



Die Reaktionsgleichungen (Formel 4.1 bis 4.4) zeigen, dass es bei gleichbleibenden ATP-Spiegeln zur isomolaren Produktion von Laktat und Protonen kommt als Mechanismus der Milchsäureakkumulation im Gewebe. Daraus folgt ein Absinken des Gewebe pH. Das Ausmass der Milchsäureazidose hängt offenkundig von der Verfügbarkeit von Glukose, also den Plasmaglukosespiegeln und dem Glykogenvorrat des Gehirns ab (Nakai et al., 1988). Bei bestehender Restdurchblutung (inkomplette Ischämie) bzw. weiterer Verfügbarkeit von Glukose bei der zerebralen Hypoxie (ohne oder nur mässige Ischämie) also weiterem Angebot von Glukose, kann die Glykolyserate und damit die Gewebeazidose erheblich verstärkt sein.

Unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen gefundene extra- und intrazelluläre pH-Werte und Laktatkonzentrationen des Gehirns sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Bei der zerebralen Ischämie sind in Abhängigkeit von den Rahmenbedingungen (Normo- oder Hyperglykämie) extrazelluläre pH-Werte von 6,8 bis 5,4 gefunden worden. Der dabei gemessene intrazelluläre pH fiel ab in einen Bereich von 6,6 bis 5,2, während die Laktatkonzentration im Gewebe auf 10 bis 81 $\mu\text{mol/g}$ Hirngewebe angestiegen war. Diese Befunde bestätigen, dass der für meine Experimente gewählte Medium-pH von 6,2 relevant ist.

Die Laktazidose des Gehirns scheint für die Konversion vom disseminierten Untergang selektiv vulnerabler Neurone in einen ischämischen Infarkt, d.h. in eine Pannekrose mit Untergang von Gliazellen und Gefässendothel ein entscheidender Faktor zu sein (Plum, 1983). Darüber hinaus wird auch die Ausdehnung eines Infarktes und damit das funktionelle

Outcome von der präischämischen Glukosekonzentration im Plasma ergo dem Ausmass der Hirngewebsazidose massgeblich beeinflusst. Versuchstiere mit Hyperglykämie haben gegenüber normoglykämischen Versuchstieren mit fokaler zerebraler Ischämie einen deutlich stärker ausgeprägten Parenchymschaden des Gehirns. Es kommt häufiger zum Auftreten postischämischer Krampfanfälle mit schlechterer funktioneller Erholung und erhöhter Mortalität aufgrund der grösseren Ausdehnung des Infarkts (Siesjo, 1988b; Nedergaard, 1987; Pulsinelli et al., 1982b; Kalimo et al., 1981).

Auch *in vitro* auf zellulärer Ebene kann die pathologische Wirkung der Azidose deutlich gemacht werden. Norenberg et al. haben massive pathologische Veränderungen durch eine Azidose bei primär kultivierten Astrozyten mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet (Norenberg et al., 1987). Die Azidose führt Dosis-abhängig zum Tod von Neuronen und Gliazellen in Kultur (Nedergaard et al., 1991a; Goldman et al., 1989).

Obwohl die Bedeutung der Hirngewebsazidose für den sekundären Hirnschaden unumstritten ist, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nur teilweise bekannt. Ein wichtiger pathophysiologischer Vorgang ist die in Azidose erhöhte Produktion von freien Radikalen durch Freisetzung von Eisenionen (Fe^{2+}) aus ihrer Proteinbindung (Rehncrona et al., 1989; Siesjo et al., 1996). Auch die Signaltransduktion wird von der Azidose beeinflusst (Siesjo et al., 1996). Die nachfolgend diskutierte Azidose-induzierte Zellschwellung ist ein prominentes pathophysiologisches Phänomen des sekundären Hirnschadens.

In diesem Zusammenhang darf jedoch nicht übersehen werden, dass eine zerebrale Laktazidose *in vitro* auch protektive Eigenschaften bei kultivierten Zellen entfalten kann. In saurem Milieu ist der exzitotoxische und anoxische Zelltod von Neuronen in Kultur abgeschwächt und die Apoptoserate verringert .

In dieser Arbeit werden Mechanismen der Volumen- und pH-Regulation von C6 Gliomzellen nach Ansäuerung untersucht. Dieses Modell soll der Azidose der perifokalen Penumbra einer ischämischen oder traumatischen Läsion entsprechen. Wie erwähnt, wird die ischämische Penumbra als Gewebe mit verlorenem Funktionsstoffwechsel bei erhaltenem Strukturstoffwechsel betrachtet. Die Penumbra ist somit noch nicht irreversibel geschädigt, deshalb einer Therapie ggf. zugänglich. Durch aus dem ischämischen bzw. traumatischen Fokus übertretende Milchsäure bzw. H^+ -Ionen kann es von der Mangel durchblutung abgesehen zur Schädigung des Penumbragewebes kommen, z.B. zur Entwicklung eines

zytotoxischen Hirnödems. Dieser Vorgang könnte die Vitalität des Parenchyms entscheidend beeinträchtigen – sogar zum sekundären Gewebsuntergang beitragen.

<i>PATHOLOGIE</i>	pH_e	pH_i	<i>LAKTAT</i> [μ MOL/g]	<i>LITERATUR</i>
Ischämie	6,4, 6,0 (a) 6,5, 6,0 (a) 6,8, 6,5 (a) 6,1, 5,4 (a) 6,6 6,8, 6,2 (a) 6,4, 5,8 (a)	 6,1 6,3, 5,9 (a) 6,3, 5,9 (a) 6,0 6,0, 5,5 (a) 6,8, 6,8 (a) 3,9-5,2 (a) 5,4-6,1 (c) 6,6, 6,2 (a)	12, 21 (a) 13, 32 (a) 25, 34 (a) 21, 28 (a) 25 13, 31 (a) 10, 21 (a) 10, 21 (a) 52, 81 (a)	Ljunggren et al., 1974 Rehncrona et al., 1980 Siesjo, 1981 Siemkowicz, Hansen, 1981 Welsh et al., 1983 Harris, Symon, 1984 Kraig et al., 1985 von Hanwehr et al., 1986 Smith et al., 1986 Munekata, Hossmann, 1987 Chopp et al., 1987 Nedergaard et al., 1991b Kraig, Chesler, 1990 Behar et al., 1989 LaManna et al., 1995
Schädel-Hirn-Trauma		6,8 6,8, 6,6 (b) 6,9 6,9		McIntosh et al., 1987 Andersen et al., 1988 Inao et al., 1988 Marmarou, 1992
Spreading Depression	6,8 6,9	 6,8	7	Mutch, Hansen, 1984 Kraig et al., 1985 Chesler, Kraig, 1989
Epilepsie	6,7	6,7	12 10	Siesjo, 1981 Siesjo et al., 1985
Meningitis	6,9		6	Andersen et al., 1989

Tab. 4.2: pH_e , pH_i und Laktatkonzentration im ZNS unter pathophysiologischen Bedingungen
(a) Hyperglykämie, (b) Hypoventilation, (c) Reoxygenierung

4. Zellschwellung durch Milchsäureazidose - Mechanismen

Tierexperimentelle Untersuchungen legen nahe, dass eine Hirngewebslaktazidose, z.B. bei hyperglykämischen Tieren zu einer stärker ausgeprägten Ödembildung führt (Myers, 1979; Pulsinelli et al., 1982a; Warner et al., 1987; Morimoto et al., 1993), wobei Komponenten des vasogenen wie zytotoxischen Ödems zu finden sind (Siesjo, 1988). *In vitro* Untersuchungen konnten dies bestätigen: Azidose führt zur ausgeprägten Schwellung von Astrozyten und Neuronen (Jakubovicz et al., 1987; Kempfski et al., 1988; Staub et al., 1990; Staub et al., 1993a). Die Volumenzunahme der Zellen wird mit dem Einstrom von Natrium-Ionen und Chlorid zusammen mit Wasser erklärt.

4.1 Bisheriges Konzept der Azidose-induzierten Zellschwellung

Kempfski und Staub haben am Institut für Chirurgische Forschung eine Reihe von systematischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Azidose-induzierten Schwellung und Schädigung von C6 Gliomzellen und primär kultivierten Astrozyten durchgeführt (Kempfski et al., 1988; Staub et al., 1990; Staub et al., 1993b). In diesen Experimenten wurden suspendierte Gliazellen bei pH_e -Werten von 7,4 bis 4,2 exponiert und das Zellvolumen sowie die Zellvitalität bestimmt. pH_e -Werte unterhalb 6,8 gingen mit einer dosis-abhängigen Zellschwellung einher. Ab pH_e 5,6 kam es zum ansteigenden Vitalitätsverlust der Zellen. Das Maximum der Zellschwellung bei pH_e 6,2 war bereits nach einer Stunde erreicht. Deshalb wurde in den vorliegenden Untersuchungen das Medium nach 60 min wieder neutralisiert. Vergleichende Experimente über die Azidose-induzierte Schwellung mit Schwefel- und Milchsäure haben eine stärker ausgeprägte Schwellung nach Milchsäureexposition ergeben. Die Schwellung war von der Gegenwart extrazellulärer Natriumionen abhängig (d.h. Hemmung der Zellschwellung in Natrium-freiem Medium), konnte durch den Na^+/H^+ -Antiport-Inhibitor Amilorid inhibiert werden, ebenfalls durch den Cl^-/HCO_3^- -Antiport-Inhibitor SITS und das Schleifendiuretikum Torasemid. Darüber hinaus hat Azetazolamid oder die Suspension von C6 Gliomzellen oder primär kultivierten Ratten-Astrozyten in Bikarbonat/ CO_2 -freiem HEPES-Medium die Azidose-induzierte Schwellung reduziert.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist folgendes Konzept der Azidose-induzierten Gliazellschwellung entstanden:

Die extrazelluläre Konzentrationserhöhung von Milchsäure durch Zugabe zieht einen Konzentrationsausgleich von Milchsäure zwischen Extra- und Intrazellulärraum nach sich

(Walz, Mukerji, 1990). Dieser erfolgt zum einen durch freie Diffusion ungeladener, nicht-dissoziierter Milchsäure durch die Zellmembran (Dringen et al., 1995; Walz, Mukerji, 1990), andererseits durch Carrier-vermittelten Einstrom (Nedergaard, Goldman, 1993; Tildon et al., 1993). Die zelluläre Aufnahme von Milchsäure allein bewirkt bereits ein Absinken von pH_i (Nedergaard, Goldman, 1993) und eine Schwellung der Zellen (Staub, 1992). Der überwiegende Anteil von zugegebener Milchsäure liegt aufgrund ihres pK von 3,83 bei den untersuchten pH_e -Werten in dissoziierter Form vor. Die freien Protonen (H^+) reagieren mit Bikarbonat (HCO_3^-) zu Hydrogencarbonat (H_2CO_3), das in CO_2 und H_2O zerfällt. CO_2 wiederum kann als Gas die Zellmembran ungehindert passieren, gelangt somit ins Zytosol. Dort entsteht katalysiert durch die intrazellulär in hohen Konzentrationen vorhandene Carboanhydrase (Kimmelberg et al., 1982; Cammer, Tansey, 1988) zunächst Kohlensäure, die sofort in H^+ und HCO_3^- zerfällt. Damit kommt es zum weiteren Absinken von pH_i . Die dadurch entstandene zelluläre Azidose aktiviert pH -regulatorische Membrankanäle bzw. -transporter, den Na^+/H^+ - bzw. Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter. Beide führen elektroneutral entlang der Konzentrationsgradienten für Na^+ bzw. Cl^- , zum Efflux von H^+ bzw. HCO_3^- . Der 1:1 Austausch dieser Ionen *per se* sollte nicht zu einer Zunahme der osmotischen Konzentration der Zelle führen, somit nicht zur Zellschwellung. Die aus der Zelle exportierten Protonen und Bikarbonationen können allerdings über Hydrogencarbonat wiederholt zu CO_2 und Wasser umgewandelt werden und erneut in die Zelle eindringen. Dieser Kreislauf bewirkt per Saldo eine Akkumulation von Na^+ und Cl^- im Zytosol, die nur unter Energieverbrauch daraus exportiert werden können. Auf diesem Wege steigt die intrazelluläre osmotische Konzentration an, es kommt zum Einstrom von Wasser in die Zelle und damit zur Zellschwellung.

Dieses Konzept enthält allerdings Unklarheiten. Es ist schon länger bekannt, dass der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter durch Absinken von pH_i gehemmt wird. Dies gilt von anderen Zelltypen abgesehen (Frelin et al., 1988) auch für primär kultivierte Rattenastrozyten bzw. C6 Gliomzellen (Shrode, Putnam, 1994; Mellergard et al., 1993). Die Aktivierung dieses Antiporters gewinnt vielmehr bei einem pH_i -Anstieg hin zu alkalischen Werten an Bedeutung. Unter diesen Umständen trägt der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter durch Export von HCO_3^- aus der Zelle zur pH_i -Regulation mit Einstellung physiologischer Werte bei. Beim Absinken von pH_i wurde ausschliesslich eine Aktivierung der Na^+ -abhängigen Form dieses Antiporters beobachtet (Shrode, Putnam, 1994; Mellergard et al., 1993). Dieser Transporter wirkt in umgekehrter Richtung zu der des Na^+ -unabhängigen Antiporters. Er kann auf diesem Wege HCO_3^- in das Zytosol transportieren und dadurch den pH_i alkalisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Na^+ -abhängigen oder $-\text{unabhängigen}$ $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters für die Azidose-induzierte Zellschwellung geprüft. Darüber hinaus sind weitere Mechanismen des Anionen-Transportes sowie der Beteiligung von Kalzium-Ionen untersucht worden.

4.2 Kontrollversuche – Azidoseschwellung und pH_i

pH_i von C6 Gliomzellen war unter Ausgangsbedingungen mit Konstanz der physiologischen Parameter bei $7,10 \pm 0,01$. Dieser Wert entspricht den bereits in vorausgehenden Studien für C6 Gliomzellen ermittelten Befunden bei Suspension in Bikarbonat-gepuffertem Medium. Unter der Annahme, dass sich H^+ -Ionen entlang ihrem elektrochemischen Gradienten passiv zwischen Intra- und Extrazellulärraum verteilen, sollte ein wesentlich niedriger pH_i erwartet werden (Roos, Boron, 1981). Aus der Nernst'schen Gleichung ergäbe sich bei einem Membranpotential von -80 mV und pH_e von 7,4, bei einer passiven H^+ -Verteilung, ein pH_i von 6,1 (Plesnila et al., 1999). Die Differenz zwischen dem theoretisch erwarteten und praktisch gemessenen pH von ca. einer Einheit, die bei allen Säugetierzellen gefunden wird, kann durch Regulationsvorgänge erklärt werden. Unter physiologischen Bedingungen werden H^+ aus der Zelle exportiert und/oder HCO_3^- im Zytosol akkumuliert um den 'steady-state' pH_i aufrecht zu erhalten (Roos, Boron, 1981). Daran möglicherweise beteiligte Membrantransporter sind der Na^+/H^+ -Antiporter und/oder der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter.

Der Verlauf der Azidose-induzierten Schwellung nach Zugabe von Milchsäure bei pH_e 6,2 entsprach in Ausmass und Kinetik den von Staub bereits gemachten Beobachtungen (Staub et al., 1990). Gleichzeitig mit der extrazellulären Ansäuerung kam es zum Absinken von pH_i auf Werte von $6,32 \pm 0,03$ bis $6,25 \pm 0,03$. Regulatorische Tendenzen zur Aufrechterhaltung des normalen pH_i waren nicht zu beobachten. Über die gesamte Dauer der Azidose kam es zu keiner signifikanten Erholung des erniedrigten pH_i . Obwohl zunächst eine Aktivierung von pH_i -regulatorischen Transportprozessen wie dem Na^+/H^+ -Antiporter und Bikarbonat-abhängigen Transportern als Mechanismus der Zellschwellung durch Azidose postuliert wurden, scheinen diese Mechanismen bei der Verteidigung des pH_i zu versagen. Es sieht eher so aus, als erfolgen hier frustrane Versuche der pH_i -Regulation auf Kosten der Zellvolumenregulation und daraus folgender Zellschwellung. Das Phänomen einer insuffizienten pH_i -Regulation während extrazellulärer Azidose konnte bei verschiedenen Experimenten mit Astrozyten (Møllergard, Siesjö, 1991; Møllergard et al., 1994; Plesnila et

al., 1999), Neuronen (Ou Yang et al., 1993) oder Neuroblastomzellen (Møllergaard et al., 1993) in Bikarbonat/CO₂-haltigem oder -freiem Medium beobachtet werden. Auch bei Muskelzellen konnte dieses Phänomen bereits 1979 von Boron und Mitarbeitern demonstriert werden (Boron et al., 1979). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der extrazelluläre pH eine wichtige Determinante der pH_i-Regulation ist, d.h. dass pH_i eine Funktion von pH_e ist.

In Untersuchungen von Møllergaard et al. war die Aufrechterhaltung eines normalen pH_i bei pH_e ~ 7,15 verzögert, bei pH_e ~ 6,9 verloren gegangen (Møllergaard et al., 1994). Die Autoren bieten dafür verschiedene Erklärungen: i) die zellulären Mechanismen des Protonenexports erkennen Veränderungen des pH_e bzw. des pH_e/pH_i Quotienten und streben einen konstanten Quotienten an nicht aber einen normalen absoluten pH_i; ii) der Influx von Protonen ist in einem Ausmass gesteigert, das durch die regulatorischen pH_i-Kontrollmechanismen nicht mehr kompensiert werden kann; iii) der Export von Protonen wird durch einen erniedrigten pH_e gehemmt.

Møllergaard und Koautoren favorisieren, dass ein saurer Medium-pH den aktiven Export von Protonen hemmt als Mechanismus des Versagens der pH_i Kontrolle. Diese Annahme basiert auf der Tatsache, dass die Na⁺/H⁺-Antiporteraktivität pH_e-abhängig ist. Extrazelluläre Protonen scheinen mit Na⁺ um die extrazelluläre Bindungsstelle des Antiporters zu konkurrieren und diesen ab einem pH_e von 6,0 zu hemmen (Siesjö et al., 1993). Jean und Mitarbeiter haben allerdings bei C6 Gliomzellen einen deutlichen Einfluss von pH_i auf die pH_e-abhängige Aktivität des Antiporters gefunden (Jean et al., 1986). Mit sinkendem pH_e kam es zwar zu einer Aktivitätsabnahme des Antiporters, dessen Aktivität konnte jedoch durch Absenken von pH_i wieder gesteigert werden. Auch Plesnila et al. haben bei der extra- und intrazellulären Azidose eine Aktivitätssteigerung des Na⁺/H⁺-Antiporters gefunden. Die Aktivität war jedoch nicht ausreichend, einen physiologischen pH_i aufrechtzuerhalten (Plesnila et al., 1999). D.h., mit fallendem pH_e kommt es zunächst zur Erniedrigung der Antiporter-Aktivität, die aber durch die intrazelluläre Azidose möglicherweise wieder stimuliert werden kann. Somit kann von einem Versagen des Antiporters bei einer mangelnden pH_i-Regulation nicht die Rede sein. Vielmehr scheinen die hier tätigen Mechanismen eher Veränderungen von i) pH_e bzw. ii) des pH_e/pH_i Quotienten zu erkennen und ggf. anzustreben, einen konstanten Quotienten im Gegensatz zu einem normalen absoluten pH_i-Wert aufrechtzuerhalten.

Mit Neutralisierung des Mediums zur Beendigung der Azidose war ein spontaner Rückgang der Zellschwellung zu erkennen, der in seinem Verlauf ebenfalls den bestehenden Voruntersuchungen entsprach. Die dieser Volumenabnahme zugrundeliegenden

Mechanismen sind bisher nicht systematisch untersucht. Es ist allerdings denkbar, dass die für die regulatorische Volumenabnahme nach hypotoner Zellschwellung verantwortlichen Mechanismen eine Rolle spielen. Vor allem Cl^- und K^+ -Kanäle sowie der gekoppelte K^+ - Cl^- -Kotransporter könnten beteiligt sein. Zur näheren Klärung ihrer Funktion müssten eigene Versuche durchgeführt werden. Die vorliegenden Ergebnisse sind ungeeignet, Aussagen über die der Zellvolumenerholung zugrundeliegende Vorgänge zu machen, da durch die Zugabe diverser Inhibitoren bereits vor Neutralisierung des Mediums unterschiedliche Zellvolumina herrschten. In den vorliegenden Versuchsreihen sollte die Dokumentation der Volumenerholung lediglich als Parameter für die aufrechterhaltene Zellvolumenregulation dienen, vor allem um eine massive ggf. irreversible Zellschädigung weitgehend auszuschließen.

Analog zur Erholung des Zellvolumens kam es bereits eine Minute nach Neutralisierung zur Normalisierung von pH_i . Daraus lässt sich ebenfalls folgern, dass die Kontrollmechanismen des intrazellulären pH die Azidosephase unbeschadet überstanden haben bzw. pH_i abhängig vom extrazellulären pH regulieren.

4.3 Versuche zu Anionentransportern und -kanälen

Zur Interpretation der nachfolgenden Untersuchungsergebnisse sollen zunächst einige bekannte Befunde über pH_i -regulatorische und andere Anionentransporter und -kanäle erörtert werden.

4.3.1 Anionentransporter und Chlorid-Kanäle

4.3.1.1 pH-regulatorische Anionentransporter

Abgesehen vom Na^+/H^+ -Antiporter, der fast bei allen Säugetierzellen unter anderem auch Gliazellen (Boyarsky et al., 1993b; Chow et al., 1991; Kimelberg et al., 1979; Shrode, Putnam, 1994; Mellergard et al., 1992; Jakubovicz, Klip, 1989; Jean et al., 1986) vorhanden ist, sind der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter sowie Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter an der Regulation des i.z. pH von Gliazellen beteiligt (Shrode, Putnam, 1994; Mellergard et al., 1993; Kimelberg et al., 1979; Bevensee et al., 1997b). Die Funktion der Membrantransporter macht die Gegenwart von Bikarbonat erforderlich, im Falle der Antiporter zusätzlich von Chlorid. Sie können durch die Stilbenderivate SITS und DIDS gehemmt werden sowie durch verschiedene

Chloridkanalinhibitoren (Cabantchik, Greger, 1992).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Chlorid/Bikarbonataustausch- bzw. -transportsysteme unterschieden. Ein Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter, der vom Natriumeinstrom in die Zelle angetrieben Chloridionen der Zelle gegen extrazelluläres Bikarbonat mit einer 1:1:2 Stöchiometrie ($\text{Na}^+:\text{Cl}^-:\text{HCO}_3^-$) austauscht. Die Aufgabe dieses Antiporters ist die Alkalisierung bzw. Normalisierung des i.z. pH bei einer zellulären Azidose. Es gibt einen weiteren Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter. Er transportiert mit 1:1 Stöchiometrie extrazelluläre Chloridionen im Austausch gegen intrazelluläre HCO_3^- -Ionen. Dadurch kommt es zur Normalisierung von pH_i bei einer zellulären Alkalose. Beide Transporter operieren elektroneutral d.h. ohne das Membranpotential zu verändern. Davon abgesehen spielt der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter eine Rolle bei der regulatorischen Volumenerholung von Zellen nach hypertoner Exposition. Zusammen mit dem Na^+/H^+ -Antiporter führt er zur Akkumulation von Na^+ und Cl^- in der Zelle, ohne den i.z. pH zu beeinflussen. Durch die damit einhergehende Erhöhung der osmotischen Konzentration der Zelle kommt es zum Einstrom von Wasser und damit zur Schwellung der geschrumpften Zelle.

Ein drittes Bikarbonat-Transportsystem ist der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter. Er wurde auch bei Gliazellen gefunden, z.B. Astrozyten (Shrode, Putnam, 1994; Chow et al., 1991; Brune et al., 1994; Bevenssee et al., 1997a). Allerdings gibt es bislang keine Hinweise, ob C6 Gliomzellen diesen Kotransporter auch haben (Shrode, Putnam, 1994). Der Transporter ist elektrogen, beeinflusst somit das Membranpotential, während die Stöchiometrie des Ionenaustauschs nicht näher bekannt ist. Der durch dieses Membranprotein bewirkte Ionentransport ist allerdings nicht streng unidirektional. Der Transporter soll befähigt sein, an Verschiebungen des i.z. pH zur alkalischen wie sauren Seite mitzuwirken (Shrode, Putnam, 1994).

Die hier diskutierten Transportsysteme sind zur Übersicht in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

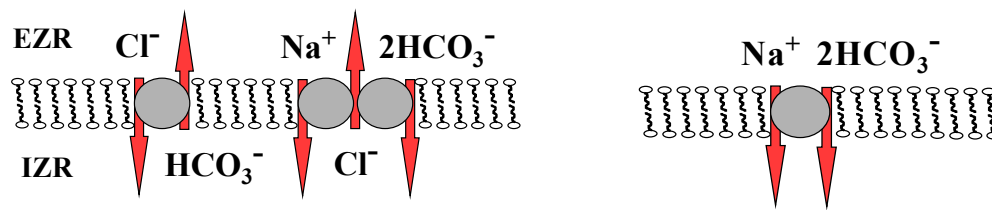


Abb. 4.2 Schematische Darstellung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiport und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport

4.3.1.2 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransport

Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter ist bei Zellen verschiedener Gewebe nachgewiesen. Seine Aufgaben sind neben anderen die epitheliale Resorption und Sekretion von Ionen, die intrazelluläre Akkumulation von Cl^- und K^+ sowie die Regulation des Zellvolumens (Haas, 1994). Den ersten Beleg für das Vorkommen eines Furosemid-empfindlichen Cl^- und K^+ Transports bei Astrozyten haben Kimelberg und Mitarbeiter geliefert (Kimelberg et al., 1979). Eine nähere Charakterisierung des Transporters erfolgte durch Tas (Tas et al., 1987). 1988 wurde der Bumetanid- und Furosemid-empfindliche Transporter bei C6 Gliomzellen beschrieben (Chassande et al., 1988). Seine Aktivität steigt mit Zunahme der extrazellulären Kalium- und Chloridkonzentration. Der Transporter ist auch unter physiologischen Bedingungen aktiv, hat aber keinen Einfluss auf das Zellvolumen. Die Inhibition des Transporters durch Bumetanid unter sonst physiologischen Bedingungen ruft keine Veränderung des Zellvolumens hervor. Die hypertone Schrumpfung von Zellen aktiviert den Transporter, jedoch ohne bei Astrozyten oder C6 Gliomzellen eine regulatorische Volumenzunahme zu gewährleisten, die bei anderen Zelltypen hingegen beobachtet werden kann (Kimelberg, Frangakis, 1985; Kempfski et al., 1983). Bei Astrozyten ist der Transporter an einer passiven Ionen-Aufnahme beteiligt sowie an der extrazellulären Clearance von K^+ -Ionen bei erhöhten Konzentrationen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen mit vermehrter Freisetzung aus Neuronen und Astrozyten (Walz, 1992; Walz, Hinks, 1986; Walz, Mukerji, 1988). Mit Hilfe der Na^+/K^+ -ATPase kommt es dabei zur Nettoaufnahme von KCl in die Zelle.

4.3.1.3 Zell-Volumen-sensitive Chlorid-Kanäle

Auch Chlorid-Kanäle spielen eine bedeutende Rolle bei der zellulären Volumenregulation. Bei nahezu allen bisher untersuchten Säugetierzellen ruft die Zellschwellung eine kompensatorischen Aktivierung von Chloridkanälen hervor (Strange, Jackson, 1995). Dieser Vorgang ist bei der regulatorischen Volumenabnahme nach hypotoner Schwellung intensiv untersucht worden. Bei hypoton suspendierten Zellen mit prompter Zunahme des Zellvolumens kommt es zu einer über Minuten dauernden 'regulatorischen' Volumenabnahme. Die Erholung des Zellvolumens wird bei verschiedenen Zelltypen, z.B. primär kultivierten Astrozyten oder C6 Gliomzellen durch den Ausstrom von Kalium- bzw. Chlorid-Ionen durch spezifische Ionenkanäle vermittelt (Pasantes Morales et al., 1994; Jackson, Strange, 1995). Chlorid-Kanäle werden durch die Vergrößerung des Zellvolumens aktiviert, als ein für den Ausstrom von Chlorid und damit der Erholung des Zellvolumens zugrundeliegender Vorgang (Strange et al., 1996). Nähere Informationen über die Aktivierung von Volumen-sensitiven Chlorid-Kanälen sind allerdings nicht verfügbar. Immerhin konnte eine enge Abhängigkeit der Aktivität dieser Kanäle bei C6 Gliomzellen vom Membranpotential beobachtet werden sowie ein Zusammenhang mit der intrazellulären Ionenkonzentration und dem pH (Emma et al., 1997; Jackson, Strange, 1995). Eine extrazelluläre oder intrazelluläre Azidose kann zur Deaktivierung des durch Zellschwellung geöffneten Kanals führen (Jackson, Strange, 1995; Pasantes Morales et al., 1994). NPPB ist ein potenter Inhibitor von Volumen-sensitiven Chlorid-Kanälen. Auch Niflumet hat eine inhibitorische Wirkung auf diese Kanäle.

4.3.2 Die Inhibition von pH-regulatorischen Anionentransportern

Weiter oben wurde bereits angesprochen, dass bei den hier untersuchten Zellen offenbar ein alkalisierender Mechanismus zur Regulation des intrazellulären 'steady state' pH ständig aktiv sein muss. Wie die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, verfügen C6 Gliomzellen über einen mit DIDS hemmbaren Alkalisierungsmechanismus, der unter physiologischen Bedingungen aktiv ist. Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiport-Inhibitor DIDS bewirkt eine Abnahme des intrazellulären 'steady state' pH, offenbar weil der Inhibitor einen Transportvorgang blockiert der Protonenäquivalente aus der Zelle exportiert bzw. Bikarbonat in der Zelle akkumuliert. Der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter oder Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiport sind möglicherweise beteiligt. Dieser Vermutung wird durch eine von Haberstock im gleichen System beobachtete Abhängigkeit des intrazellulären pH von der Gegenwart von Natriumionen im Medium unter physiologischen Bedingungen gestützt, die allein durch einen Na^+/H^+ -Antiport-Inhibitor in C6 Gliomzellen nicht erreicht werden konnte (Haberstock, 1999). Darüber hinaus wurde in den eigenen Untersuchungen eine deutliche, jedoch nicht signifikante Erniedrigung des intrazellulären pH durch Suspension von C6-Gliomzellen in Chlorid-freiem Medium beobachtet. Diese Abhängigkeit der pH_i -Regulation von der Gegenwart extrazellulärer Cl^- -Ionen unter Ausgangsbedingungen spricht für eine Beteiligung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters. Diese Schlussfolgerung ist in Einklang mit in der Literatur beschriebenen Befunden über die pH_i -Regulation von C6 Gliomzellen. Aus den Experimenten von Shrode und Putnam geht die Bedeutung dieses Antiporters für 'steady state' Bedingungen des intrazellulären pH von C6 Gliomzellen und Astrozyten eindeutig hervor, ebenso aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit primären Astrozytenkulturen (Bevensee et al., 1997b; Mellergard et al., 1993).

Weiterhin müsste man unter diesen Umständen eine Abhängigkeit des intrazellulären pH unter Kontrollbedingungen von Bikarbonat-Ionen erwarten. In den vorliegenden Versuchen blieb jedoch interessanterweise die von anderen Autoren gefundene geringfügige intrazelluläre Ansäuerung nach Suspension der Zellen in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium aus (Mellergard et al., 1993; Shrode, Putnam, 1994; Boyarsky et al., 1993a; Bevensee et al., 1997b; Deitmer, Rose, 1996). Ein pH_i -Shift in den sauren Bereich ergäbe einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung eines HCO_3^- -abhängigen Systems an der Regulation des intrazellulären 'steady state' pH. Allerdings wurde in meinen Experimenten der Wechsel von Bikarbonat-haltigem zu Bikarbonat/ CO_2 -freiem, HEPES-gepuffertem Medium ca. 30 min vor der ersten Messung von pH_i und Zellvolumen durchgeführt. Akute Veränderungen des

intrazellulären pH durch den Wechsel des Mediums konnten aus diesem Grund nicht erfasst werden. Möglicherweise sind bis zur ersten Messung dieser Größen andere pH-regulatorische Mechanismen wie z.B. der Na^+/H^+ -Antiporter angesprochen. Shrode and Putnam haben in Versuchen mit Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium eine Abhängigkeit des intrazellulären pH von der Gegenwart extrazellulärer Na^+ -Ionen gefunden. Die dabei vorhandene Wirksamkeit von Amilorid zeigte die Beteiligung des Na^+/H^+ -Antiporters. Jean et al. haben bei C6 Gliomzellen bei physiologischem pH einen durch Amilorid hemmbaren $^{22}\text{Na}^+$ -Einstrom gefunden - als Indiz für die Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters unter Kontrollbedingungen (Jean et al., 1986).

Die H^+ -ATPase spielt als weiterer Kontrollmechanismus des intrazellulären pH unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle (Volk et al., 1998). Der aktive Export von H^+ -Ionen durch diesen energieabhängigen Membrantransporter könnte erklären, warum die Suspension von C6 Gliomzellen in Bikarbonat/ CO_2 -freiem Medium ohne Shift des pH_i in den sauren Bereich geblieben ist.

Neben DIDS hatten auch die Pharmaka Niflummat oder NPPB den intrazellulären pH unter Kontrollbedingungen verändert, allerdings erheblich wirkungsvoller als DIDS. Beide Pharmaka hemmen den Austausch von anorganischen Anionen (Chassande et al., 1988; Falke, Chan, 1986b). Die hier gefundene Wirkung könnte auf diese Hemmung zurückgeführt werden. Allerdings wurden für NPPB von Lukacs und Mitarbeitern (1991) protonophorische Eigenschaften beobachtet, die einen Einstrom von H^+ -Ionen in das Zytosol von murinen Makrophagen oder humanen Neutrophilen gewährleisten (Lukacs et al., 1991). Brown und Dudley (1996) haben diese Beobachtungen bei renalen Epithelzellen bestätigt, für Niflummat haben sie eine ähnliche Wirkung gefunden (Brown, Dudley, 1996). Die hier gemachten Beobachtungen mit Niflummat bzw. NPPB über die Veränderungen von pH_i von C6 Gliomzellen sind wahrscheinlich auf diesen Mechanismus zurückzuführen, nicht aber auf die Hemmung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters.

Wie bereits angesprochen erklärt das bisherige Konzept die Azidose-induzierte Schwellung u.a. durch eine Aktivierung des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters. Dem Konzentrationsgradienten für Chloridionen entsprechend vermittelt der Antiporter den Einstrom von Cl^- -Ionen im Austausch gegen intrazelluläre HCO_3^- -Ionen. Bei verschiedenen Zellen, einschliesslich primär kultivierten Astrozyten der Ratte oder bei C6 Gliomzellen wird der Antiporter durch Absenken des intrazellulären pH jedoch nicht aktiviert (Frelin et al., 1988; Mellergard et al., 1993; Shrode, Putnam, 1994). Die intrazelluläre Azidose bewirkt hingegen eine Aktivierung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters. Dieser Antiporter erleichtert dem elektrochemischen Gradienten folgend den intrazellulären Einstrom von Na^+ -

Ionen zusammen mit 2 HCO_3^- -Ionen in die Zelle im Austausch gegen intrazelluläre Cl^- -Ionen. Auf diese Weise kommt es zur relativen Bikarbonat-Akkumulation in der Zelle, damit zur Alkalisierung des sauren pH_i .

Der Inhibitor der Na^+ -abhängigen wie Na^+ -unabhängigen Form des Antiporters, DIDS, gewährleistet nicht nur eine ausgeprägte Inhibition der Azidose-induzierten Zellschwellung, sondern auch eine deutliche Abschwächung der intrazellulären Ansäuerung. Dies lässt Rückschlüsse zu auf einen Transportprozess wodurch Cl^- in der Zelle akkumuliert, während HCO_3^- aus der Zelle exportiert wird d.h. auf den Na^+ -unabhängigen Antiporter. Die Diskrepanz gegenüber den oben angesprochenen Befunden, aus denen eine Aktivitätsabnahme des Antiporters durch intrazelluläre Azidose hervorgeht, lässt sich möglicherweise auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurückführen. Während die intrazelluläre Ansäuerung in den oben genannten Experimenten der anderen Arbeitsgruppen durch Methoden induziert wurde, die den extrazellulären pH nicht verändern ('ammonia prepulse'), wurde in den eigenen Versuchen der pH des Mediums durch Zugabe von Milchsäure gesenkt - mit sekundärer Ansäuerung des intrazellulären pH. Durch diese Methode wird die extrazelluläre Bikarbonatkonzentration unterschiedlich beeinflusst. In den eigenen Experimenten kam es durch Pufferung zum ausgeprägten Verbrauch von extrazellulärem Bikarbonat, d.h. zum Konzentrationsabfall von 21,8 auf 6,0 mM. Das Absinken der Bikarbonatkonzentration könnte als kräftiger Stimulus des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters gewirkt haben. Der dadurch hervorgerufene Ausstrom von HCO_3^- -Ionen aus der Zelle wird zur intrazellulären Azidose beigetragen haben, der gegenläufige Einstrom von Cl^- -Ionen zur Azidose-induzierten Zellschwellung. Daraus kann gefolgert werden, dass die Regelgröße des Antiporters möglicherweise ein konstanter Quotient der intra-/extrazellulären Bikarbonatkonzentration ist bzw. des intra- zu extrazellulären pH. Die mögliche Bedeutung eines konstanten pH_e/pH_i -Quotienten als Zielgröße von pH-regulierenden Membrantransportern ist bereits angesprochen worden.

Diese Hypothese wird durch die wirksame Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung nach Suspension von Zellen in Chlorid-freiem Medium gestützt und die dabei gefundene Abschwächung der intrazellulären Ansäuerung. Auch Niflummat hatte eine inhibitorische Wirkung auf den Cl^- -Ionen-Antiporter. Dies geht ebenfalls aus der deutlichen Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung hervor. Der Befund kann allerdings nicht durch die geringere intrazelluläre Ansäuerung erklärt werden, weil Niflummat *per se* bereits zum Absinken des intrazellulären pH geführt hat.

Die zu fordernde Bikarbonat-Abhängigkeit der Azidose-induzierten Schwellung bzw.

der intrazellulären pH-Veränderungen kann die Hypothese einer Aktivitätszunahme des Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters durch Azidose nicht stützen. Bikarbonationen befinden sich mit CO_2 im Gleichgewicht, weshalb Veränderungen dieses Gleichgewichts durch verschiedene Mechanismen zur Azidose-induzierten Schwellung und intrazellulären Azidose beitragen können. Kempfski et al. (1988) haben vermutet, dass die intrazelluläre Ansäuerung unter diesen Bedingungen durch Veränderungen des Bikarbonat/ CO_2 -System hervorgerufen wird (Kempfski et al., 1988). Diese Hypothese wird allerdings durch die vorliegenden Befunde der Experimente mit Suspension von C6 Gliomzellen in HEPES-Medium (d.h. Bikarbonatfrei) nicht bestätigt. Die intrazelluläre Azidose nach Zugabe von Milchsäure war nur geringfügig gemildert im Gegensatz zu den Kontrollversuchen mit Bikarbonat/ CO_2 als Puffersystem.

4.3.3 Die Inhibition des Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransports

Chassande et al. (1988) haben bei C6 Gliomzellen einen Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransporter gefunden (Chassande et al., 1988), der durch Bumetanid bzw. Furosemid hemmbar ist. Unter physiologischen Bedingungen findet ein Bumetanid-hemmbarer K^+ -Flux durch die Zellmembran statt. Wie in den vorliegenden Untersuchungen werden allerdings keine Veränderungen des Zellvolumens durch Bumetanid unter physiologischen Bedingungen beobachtet. Aus diesen Ergebnissen kann somit gefolgert werden, dass bei C6 Gliomzellen kein Nettotransport dieser Ionen mit Hilfe des Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransporters unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Auch Furosemid oder die Suspension von C6-Gliomzellen in Chlorid-freiem Medium hatte keinen Einfluss auf das Zellvolumen unter Kontrollbedingungen. Wie zu erwarten rief der Kotransportinhibitor Bumetanid auch keine Veränderung des intrazellulären pH vor Ansäuerung des Mediums hervor.

Die Azidose-induzierte Schwellung von Gliazellen wird hingegen durch den Kotransport Inhibitor Bumetanid signifikant gehemmt, während keine Unterschiede der intrazellulären Ansäuerung gegenüber der Kontrollgruppe (ohne Bumetanid) gefunden wurde. Die Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch Bumetanid spricht für eine durch den Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransporter vermittelte Netto-Akkumulation von Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionen in der Zelle als Grundlage der Volumenzunahme durch osmotischen Einstrom von Wasser. Diese Schlussfolgerung ist mit der Abschwächung der Azidose-induzierten Zellschwellung in Chlorid-freiem Medium vereinbar. Staub et al. (1993) haben eine Hemmung der Azidose-induzierten Zellschwellung durch das Schleifendiuretikum Torasemid beobachtet (Staub et

al., 1993b). Diese Untersuchungen wurden allerdings ohne Kenntnisse des intrazellulären pH durchgeführt, weshalb die Autoren eine durch das Diuretikum bedingte Hemmung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters annahmen.

Im intrazellulären pH-Bereich von 7,7 bis 7,0 konnten Chassande et al. (1988) eine pH-Abhängigkeit des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporters nicht entdecken (Chassande et al., 1988). Allerdings tritt die Zellschwellung durch Azidose erst ab $\text{pH}_e < 7,0$ auf. Eine Aktivierung des Kotransporters bei einem pH unterhalb des von Chassande untersuchten Bereichs ist deshalb möglich. Tobey et al. (1995) haben eine den vorliegenden Ergebnissen entsprechende, Bumetanid-hemmbar, von Na^+ , K^+ - und Cl^- -Ionen abhängige Schwellung von Kaninchen-Epithelzellen des Ösophagus durch Azidose hervorrufen können (Tobey et al., 1995). Der Grenzwert des intrazellulären pH für den Eintritt der Zellschwellung war $< 6,5$. Allerdings ist unklar, welcher Stimulus, Azidose oder die Zellschwellung selbst zur Aktivierung des Kotransporters geführt haben. Von Mongin und Mitarbeitern (1994, 1996) wurden dazu aus Experimenten mit Astrozyten und C6 Gliomzellen interessante Befunde veröffentlicht (Mongin et al., 1994; Mongin et al., 1996). Ihre Ergebnisse sprechen dafür, dass die Zellschwellung den Kotransporter durch einen Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Mechanismus aktiviert. Auch Tobey et al. (1997) hat bei Versuchen mit Ösophagusepithel eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bumetanid-hemmbar, Schwellung beobachtet (Tobey et al., 1997).

Die von mir durchgeführten Experimente über die Rolle von Ca^{2+} -Ionen bei der Azidose-induzierten Schwellung von Gliazellen bestätigen deren Funktion, wenngleich die intrazelluläre Ansäuerung nach Zugabe von Milchsäure durch die Elimination von Ca^{2+} -Ionen aus dem Medium nicht verhindert wurde. Dies könnte ein Hinweis sein auf die Aktivierung des Kotransporters durch Ca^{2+} -Ionen.

Die Ergebnisse der Bumetanid-Versuche werden im Prinzip durch die Versuche mit dem Kotransport-Inhibitor Furosemid bestätigt. Obwohl Furosemid nach Kimelberg und Frangakis (1985) auch eine inhibitorische Wirkung auf den Chlorid-Austausch von Astrozyten hat (Kimelberg, Frangakis, 1985), wurde in den eigenen Untersuchungen keine Wirkung auf die intrazelluläre Ansäuerung von Gliomzellen nach Zugabe von Milchsäure beobachtet. Auf eine zu geringe Furosemiddosis kann diese Beobachtung nicht zurückgeführt werden. Die gleiche Konzentration bewirkt bei primär kultivierten Astrozyten bereits eine maximale Inhibition von transmembranären Kaliumfluxen (Kimelberg, Frangakis, 1985). Allerdings konnte in diesen Versuchen von Kimelberg und Frangakis (1985) auch ein deutlicher Hinweis für die Beteiligung der Chlorid-Antiporter erhalten werden.

4.3.4 Die Inhibition von Chlorid-Kanälen

Im Gegensatz zur hypotonen Zellschwellung geht die Azidose-induzierte Schwellung nicht mit einer spontanen Erholung des Zellvolumens einher. Selbst unter der Annahme, dass Mechanismen zur Erholung des Zellvolumens aktiviert werden, z.B. die Öffnung von Chlorid- oder Kalium-Kanälen, könnte der kontinuierliche intrazelluläre Einstrom von osmotisch wirksamen Ionen mit Hilfe der oben genannten Transporter die Erholung des Zellvolumens verhindern. Allerdings spricht die von Pasantes-Morales und Mitarbeitern (1994) gefundene Inhibition der regulatorischen Volumenerholung nach hypotoner Exposition bei einer zellulären Azidose gegen die Aktivierung bzw. Öffnung von Chlorid-Kanälen (Pasantes Morales et al., 1994).

Auch der in der vorliegenden Arbeit erhobene Befund – die Hemmung der Azidose-induzierten Schwellung durch NPPB - spricht gegen die Aktivierung Volumen-sensitiver Chlorid-Kanäle. Nachdem NPPB neben seiner potenten inhibitorischen Wirkung auf Chlorid-Kanäle auch Chlorid-Antiporter beeinflussen kann, darf vermutet werden, dass die Abschwächung der Azidose-induzierten Schwellung auf eine Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters zurückgeht. Die gleichzeitig gefundene Beeinflussung des intrazellulären pH kann aufgrund der oben angesprochenen protonophorischen Wirkung von NPPB jedoch nicht zur Klärung des beteiligten Mechanismus beitragen. Gleiches gilt für Niflummat, das Chlorid-Kanäle blockiert. Die mit NPPB vergleichbaren Befunde sprechen auf jeden Fall für eine Inhibition des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters.

Die Abbildung 4.3 soll einen Überblick über die bisher diskutierten Befunde geben.

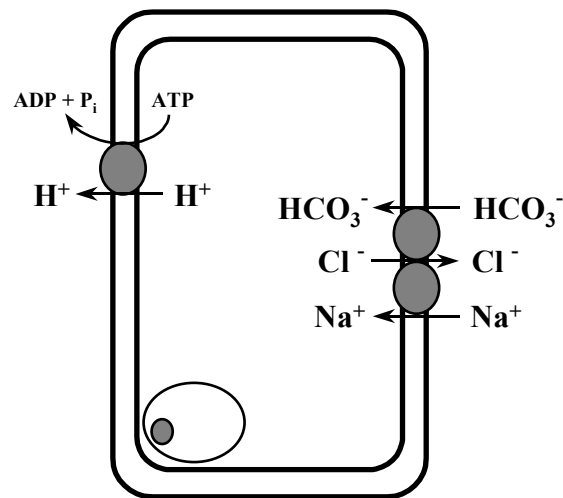
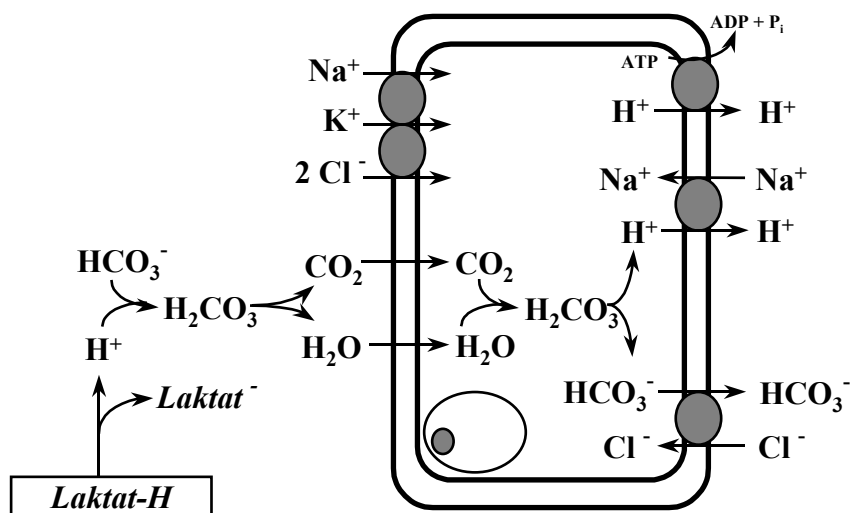
A**B**

Abb. 4.3: Zusammenfassende Darstellung der diskutierten Transportprozesse

A: Die Regulation des intrazellulären pH (pH_i) wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch zwei Transporter gewährleistet, einer aktiven ATP-abhängigen H^+ -Ionen-Pumpe und einem Na^+ -abhängigen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter.

B: Die durch extrazelluläre Azidose aktivierten Membrantransporter bzw. -austauscher sind komplexer. Durch Pufferung von H^+ -Ionen mit Bikarbonationen im Extrazellulärraum entsteht Kohlensäure, die sofort in CO_2 und H_2O zerfällt – CO_2 diffundiert ungehindert in die Zelle, wo durch Carboanhydrase erneut Kohlensäure entsteht, die sogleich in Bikarbonationen und H^+ -Ionen dissoziiert. Dieser Prozess wird durch den relativ hohen intrazellulären pH (~ 7.0) erleichtert. Die Akkumulation von H^+ -Ionen aktiviert den Na^+/H^+ -Antiporter, die Akkumulation von Bikarbonat den $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter. Beide Antiporter wirken mit an der Azidose-induzierten Zellschwellung. Weiterhin trägt bei der Azidose-induzierten Schwellung die Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Transporters zur Nettoverschiebung osmotisch wirksamer Solute in die Zelle bei.

4.4 Versuche zur Bedeutung von Kalziumionen

Fast alle wichtigen zellulären Reaktionen im Gehirn und anderen Organen, z.B. metabolische Prozesse, Genexpression oder Ionentransport werden durch vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} -Ionen als 'second messenger' aktiviert. Durch Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen, z.B. Proteinkinase C oder Ca^{2+} /Calmodulin-empfindliche Kinasen und Phosphatasen, vermitteln Ca^{2+} -Ionen die zelluläre Signaltransduktion (Clapham, 1995). Wohl aus diesem Grund ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Ca^{2+}_i) unter Ruhebedingungen nicht nur sehr niedrig (~30 nM) sondern auch in engen Grenzen reguliert.

4.4.1 Kalziumhomöostase und ihre Störung durch Azidose

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von Gliazellen ist wie bei anderen eukaryontischen Zellen um 4-5 Zehnerpotenzen kleiner als die extrazelluläre Konzentration. Somit besteht ein steiler elektrochemischer Gradient, der den Eintritt von Kalziumionen und deren Nettoakkumulation im Zytosol begünstigt, z.B. nach einem kurzfristigen Anstieg der Membranpermeabilität für dieses Ion. Darüber hinaus bestehen intrazelluläre Speicher, die durch Freisetzung von Kalziumionen einen zytosolischen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration vermitteln. Die Kalziumkonzentration im Zytosol wird durch ein System von Ca^{2+} -permeablen Membrankanälen, -transportern, zytoplasmatischen Puffern und intrazellulären Speichern kontrolliert, die den Überschuss von Kalziumionen aus dem Zytosol aufnehmen können.

Eine transitorische Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Spannungsabhängige Kalziumkanäle werden durch Depolarisation der Zellmembran geöffnet; sie ermöglichen einen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum. Eine entsprechende Funktion hat die Öffnung Liganden-aktivierbarer Kalziumkanäle. Ein Beispiel ist der Glutamat-Rezeptor vom NMDA-Typ, der nach Bindung von Glutamat einen massiven Kalziueinstrom bewirken kann. Vom extrazellulären Einstrom abgesehen führt die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, z.B. dem endoplasmatischen Retikulum zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma. Ein zentraler Mechanismus hierfür ist die Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat u.a. durch Phospholipase C. Zur Normalisierung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach transitorischer Erhöhung stehen aktive Pumpen der Zellmembran sowie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter zur Verfügung. Die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in das endoplasmatische

Retikulum erfolgt mit Hilfe einer ATPase unter Verbrauch von ATP.

Eine zelluläre Azidose ruft abhängig vom Zelltyp unterschiedliche oder gar keine Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor. Während Neurone in Kultur mit einem Anstieg reagieren (Nedergaard, 1995; OuYang et al., 1994), wurde bei Gliazellen kein intrazellulärer Kalziumstrom beobachtet (Neary et al., 1993). Bei ausschliesslich intrazellulärer Ansäuerung von Gliazellen von *Hirudo medicinalis* kann ein Anstieg beobachtet werden - allerdings als Folge der gleichzeitigen Membrandepolarisation (Deitmer et al., 1993). Im Gegensatz zu der ausschliesslich intrazellulären Azidose durch 'ammonia prepulse' (Deitmer et al., 1993) kommt es nach extrazellulärer Ansäuerung zu keinen signifikanten Veränderungen des Membranpotentials (d.h. Depolarisation), wodurch z.B. spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet würden (Walz, Wuttke, 1989; Erecinska et al., 1995).

4.4.2 Die Bedeutung von Kalziumionen für die Regulation des Zellvolumens

Obwohl die der regulatorischen Volumenerholung nach hypotoner Suspension zugrundeliegenden zellulären Signalmechanismen nicht endgültig aufgeklärt sind, gibt es Indizien, dass Kalziumionen dabei eine Rolle spielen (McCarty, O'Neil, 1992). Dies gilt auch für kultivierte Astrozyten. Allerdings sind bisher veröffentlichte Ergebnisse widersprüchlich. Einerseits haben O'Connor und Kimelberg eine klare Abhängigkeit der Zellvolumenregulation von Astrozyten von der extrazellulären Kalziumkonzentration gefunden, andererseits berichten Sanchez-Olea et al. (1995) und Morales-Mulia (1998), dass die Volumenerholung nach hypotoner Schwellung Ca^{2+} -unabhängig sei (O'Connor, Kimelberg, 1993; Sanchez Olea et al., 1995; Morales-Mulia et al., 1998). Die 'regulatorische Volumenabnahme' (RVD) bei hypoton suspendierten C6 Gliomzellen kann durch Kalzium-freies Medium verhindert werden. Bei der Volumenerholung nach hypotoner Schwellung wird in Gegenwart von Kalziumionen im Medium gleichwohl kein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet (Lohr, Yohe, 1994). Dennoch finden Olson et al. (1990) eine Abhängigkeit des 'steady state'-Zellvolumens von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Olson et al., 1990).

Abgesehen von den massgeblich an der regulatorischen Volumenabnahme beteiligten Ca^{2+} -abhängigen Cl^- - und K^+ -Kanälen konnte auch für andere Membrantransporter eine Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen gezeigt werden. Für den Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransport werden abhängig vom Zelltyp sehr unterschiedliche Regulationsmechanismen berichtet. Bei C6

Gliomzellen wurde bei Suspension in hypotonem Medium eine Ca^{2+} /Calmodulin-Abhängigkeit dieses Kcotransporters gefunden (Mongin et al., 1996).

4.4.3 Die Azidose-induzierte Schwellung in Kalzium-freiem Medium bzw. unter Applikation des Kalzium-Chelators BAPTA-AM

Die Versuche mit Kalzium-freiem Medium haben eine klare Abhängigkeit der Azidose-induzierten Zellschwellung von der Gegenwart extrazellulärer Kalziumionen ergeben. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration *per se* scheint hingegen keine Rolle zu spielen - BAPTA-AM bzw. die Kombination von BAPTA-AM und Kalzium-freiem Medium hatte keine zusätzlichen Wirkung. Da keine dieser Versuchsbedingungen den intrazellulären pH beeinflusst, kann gefolgert werden, dass extrazelluläre Kalziumionen für die Zellschwellung zwar von Bedeutung sind, den intrazellulären pH jedoch nicht verändern. Nachdem die vorliegenden Ergebnisse gegen einen zellulären Einstrom von Kalziumionen bei der Azidose-induzierten Schwellung sprechen – der intrazellulär wirkende Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM war ohne Einfluss auf die Schwellung – und es auch in der Literatur keinen Hinweis auf einen Einstrom von Kalzium in Astrozyten bei der extrazellulären Azidose gibt (Neary et al., 1993), bleibt die Frage offen, wie extrazelluläre Kalziumionen die Schwellung von Gliazellen durch Azidose beeinflussen/vermitteln. Lohr und Mitarbeiter (1994) haben bei C6 Gliomzellen beobachtet, dass die regulatorische Volumenabnahme nach hypotoner Schwellung von der Gegenwart von Kalziumionen im Medium abhängig ist. In diesen Untersuchungen wurde kein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration festgestellt. Es ist deshalb naheliegend, dass Kalziumionen im Extrazellulärraum zur Aktivierung von hier beteiligten Iontentransportern erforderlich sind.

Ein Defizit der Aufklärung der Rolle von Kalziumionen bei der Azidose-induzierten Zellschwellung betrifft die fehlende Kenntnis des Membranpotentials unter diesen Bedingungen. Bei neutralem pH konnte beobachtet werden, dass die Suspension in Kalzium-freiem Medium Astrozyten oder Gliomzellen depolarisiert (Brismar, Collins, 1993; Brismar et al., 1995). Eine Membrandepolarisation könnte die Funktion verschiedener Ionenkanäle verändern und dadurch die Azidose-induzierte Zellschwellung abschwächen oder verhindern.

Zur weiteren Charakterisierung des Phänomens müssen ergänzende Untersuchungen durchgeführt werden, u.a. zur Identifizierung von beteiligten Ionenkanälen/-transportern die für die Hemmung der Zellschwellung in Kalzium-freiem Medium verantwortlich sind – unter Einbeziehung des Membranpotentials.

E) Zusammenfassung

Das Hirnödem ist nach wie vor eine schwer zu beherrschende Komplikation zerebraler Insulte durch Ischämie oder bei Hirnverletzungen. Für betroffene Patienten gibt es bisher keine kausal wirkende spezifische Therapie, d.h. die Behandlung ist symptomatisch, sie beschränkt sich weitgehend auf die Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen und der Kontrolle bzw. Senkung des intrakraniellen Drucks. Dieser Bemühung ungeachtet ist die Therapie-refraktäre intrakranielle Hypertension die wichtigste Todesursache bei Patienten mit schwerem Schädel-Hirntrauma in der Klinik. Der Einsatz von spezifisch wirkenden therapeutischen Methoden bzw. zur Prävention setzt weitergehende Kenntnisse über die zugrunde liegenden Mechanismen, auch auf molekularer Ebene voraus, die beim vasogenen wie zytotoxischen Hirnödem eine Rolle spielen.

Die vorliegenden Untersuchungen sind eine Fortsetzung eines langjährigen Forschungsprogramms des Instituts für Chirurgische Forschung, um die zellbiologischen Grundlagen der zytotoxischen Zellschwellung, einer wichtigen Komponente des Hirnödems, aufzuklären. Wesentliches Element hierfür war die Entwicklung eines leistungsfähigen *in vitro* Modells mit Verwendung suspendierter Gliazellen, deren Größenveränderung (Schwellung) mit hoher Empfindlichkeit volumetrisch bestimmt werden kann. Schädel-Hirntrauma- oder zerebrale Ischämie- relevante Bedingungen werden *in vitro* simuliert, z.B. durch Exposition von suspendierten Zellen mit bekannten Mediatorsubstanzen oder Ansäuern des Mediums durch Milchsäure. In diesen Untersuchungen konnte z.B. bei der Azidose-induzierten Zellschwellung eine Mitwirkung des Na^+/H^+ -Antiporters als auch von Cl^- - und Bikarbonat-abhängigen Transportsystemen beobachtet werden, welche die Akkumulation osmotisch wirksamer Solute in der Zelle vermitteln.

Die vorliegenden Experimente betrafen die weitere Aufklärung der durch eine Azidose hervorgerufenen Zellschwellung, insbesondere den Beitrag von Membrantransportsystemen und Ionenkanälen. Ein Schwerpunkt war die Funktion von Anionen-Transportern, sowie die Rolle von Ca^{2+} -Ionen. Die Experimente wurden wie zuvor unter Verwendung des o.g. *in vitro* Modells mit suspendierten C6 Gliomzellen durchgeführt. C6 Glioma ist eine Astrozyten verwandte geeignete Modell-Zelllinie für diese Fragestellungen. Das Volumen der suspendierten Zellen wurde zellvolumetrisch bestimmt mit Hilfe der Durchflußzytometrie mit einer Empfindlichkeit, die es gestattet Veränderungen von nicht mehr als 1-2% zu erfassen. Hinzu kam die Messung des intrazellulären pH durch Verwendung eines pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes (BCECF).

Aus diesen Untersuchungen sind folgende Ergebnisse hervorgegangen. Die Exposition suspendierter C6 Gliomzellen bei pH 6,2 im Medium geht mit einer prompten Schwellung der Zellen einher mit einem Maximum von über 120% des Kontrollwerts nach 60 Minuten. Parallel dazu fällt der intrazelluläre pH (pH_i) signifikant ab. In weiteren Versuchen zur Aufklärung der Funktion von Cl^- und Bikarbonat wurden Versuche nach Elimination dieser Ionen aus dem Suspensionsmedium durchgeführt, erneut unter Ansäuerung des Mediums. Unter diesen Bedingungen war die Azidose-induzierte Schwellung von C6 Gliomzellen deutlich abgeschwächt. Auch die Ansäuerung der suspendierten Zellen (Abnahme von pH_i) war deutlich geringer ausgeprägt. Ähnliche Ergebnisse konnten erzielt werden in Versuchen mit Zugabe der Inhibitoren des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters DIDS oder Niflumate. Die Ergebnisse lassen zusammengenommen die Schlussfolgerung zu, dass der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter bei der Azidose-induzierten Zellschwellung aktiviert wird und qua Akkumulation von Cl^- -Ionen in der Zelle am Schwellungsvorgang beteiligt ist. Unter physiologischen Bedingungen hingegen ist nur der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter aktiv zur Aufrechterhaltung eines steady state pH_i .

Weiterhin konnte erstmals unter Verwendung der Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransport-Inhibitoren Bumetanid und Furosemid eine Mitwirkung dieses Kotransporters bei der Azidose-induzierten Zellschwellung beobachtet werden. Beide Inhibitoren gewährleisteten eine eindrucksvolle Abschwächung der Zellschwellung nach Ansäuerung des Mediums durch Milchsäure, allerdings ohne den Abfall des intrazellulären pH zu verhindern. Die Aktivierung dieses Transporters durch Milchsäure-Azidose bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation von Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionen, die als osmotisch wirksame Solute zum intrazellulären Wassereinstrom führen.

Weiterhin haben wir beobachten können, dass die Azidose-induzierte Schwellung von Gliazellen von der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen im Medium abhängig ist. Bei Verwendung von Ca^{2+} -Ionen-freiem Medium war der Schwellungsvorgang durch Zugabe von Milchsäure deutlich eingeschränkt, während das Absinken des intrazellulären pH (pH_i) der zellulären Ansäuerung in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen im Medium entsprach. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Ca^{2+} -Ionen im Extrazellulärraum offenbar an der Aktivierung eines pH-unabhängigen Ionentransporters, z.B. des Na^+ - K^+ - Cl^- -Kotransporters beteiligt sind. Auf der anderen Seite hatte die Chelierung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen im Zytosol mit Hilfe von BAPTA weder einen Einfluss auf das Ausmaß der Azidose-induzierten Schwellung noch auf die resultierende zelluläre Ansäuerung.

Die vorliegenden Befunde liefern neue Kenntnisse über die pathophysiologische Funktion des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters sowie des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters bei der Azidose-induzierten Zellschwellung. Die Mitwirkung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters konnte sogar erstmals unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden. Ein ebenso neuer Befund ist, dass extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen an der Azidose-induzierten Zellschwellung substantiell beteiligt sind.

Diese originellen Ergebnisse erweitern nicht nur unser Verständnis der Mechanismen, die der Azidose-induzierten Zellschwellung des Gehirns - dem zytotoxischen Hirnödem unter klinischen Bedingungen - zugrunde liegen, sondern sind darüber hinaus vielversprechend für therapeutische Anwendungen, das Hirnödem unter klinischen Bedingungen, bei Patienten mit akuten zerebralen Insulten spezifischer als bisher zu beeinflussen. Für diesen Zweck würde sich das zytotoxische Hirnödem beim ischämischen Insult oder Schädel-Hirntrauma besonders eignen, wenngleich einschränkend festgestellt werden muss, dass dessen Behandlung mit Furosemid (oder Bumetanid) bei Patienten unter entsprechenden Bedingungen bisher enttäuschend ist. Dies kann damit erklärt werden, dass neben der Azidose auch andere Mediatorsysteme am sekundären Hirnschaden beteiligt sind. Gleichwohl wäre die Verfügbarkeit einer klinisch wirksamen Methode zur spezifischen Hemmung des zytotoxischen Hirnödems ein Fortschritt für das Management zur Unterstützung der bisher ausschließlich symptomatischen Therapie für die Kontrolle und Senkung des erhöhten intrakraniellen Drucks.

F) Literaturverzeichnis

Abercrombie RF, Putnam RW, Roos A (1983) The intracellular pH of frog skeletal muscle: its regulation in isotonic solutions. *J.Physiol.Lond.* 345:175-187.

Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W (1981) Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. *Anal.Chem.* 53:2267-2269.

Andersen BJ, Unterberg AW, Clarke GD, Marmarou A (1988) Effect of posttraumatic hypoventilation on cerebral energy metabolism. *J.Neurosurg.* 68:601-607.

Andersen NE, Gyring J, Hansen AJ, Laursen H, Siesjo BK (1989) Brain acidosis in experimental pneumococcal meningitis. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 9:381-387.

Anderson S, Brismar T, Hansson E (1995) Effect of external K⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺ on membrane potential and ionic conductance in rat astrocytes. *Cell.Mol.Neurobiol.* 15:439-450.

Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW (1975) Immunofluorescence staining of astrocytes in vitro using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 89:363-367.

Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 12:723-725.

Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977) Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 8:51-57.

Baethmann A (1978) Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg.Rev.* 1:85-100.

Baethmann A (1989) Secondary brain damage from severe head injury and cerebral ischemia - the role of glutamate. *Curr.Opin.Anaesthesiol.* 2:567-571.

Baethmann A, Kempster O (1992) Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. In: *Neurochemical correlates of cerebral ischemia* (Bazan NG, Braquet P, Ginsberg MD eds), pp 295-320. New York: Plenum Press.

- Baird AE, Benfield A, Schlaug G, Siewert B, Lovblad KO, Edelman RR, Warach S (1997) Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging [see comments]. *Ann.Neurol.* 41:581-589.
- Behar KL, Rothman DL, Hossmann KA (1989) NMR spectroscopic investigation of the recovery of energy and acid-base homeostasis in the cat brain after prolonged ischemia. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 9:655-665.
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370-371.
- Berger L, Hakim AM (1986) The association of hyperglycemia with cerebral edema in stroke. *Stroke* 17:865-871.
- Bevensee MO, Apkon M, Boron WF (1997a) Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. II. Electrogenic Na/HCO₃ cotransport. *J.Gen.Physiol.* 110:467-483.
- Bevensee MO, Weed RA, Boron WF (1997b) Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus. I. Role Of HCO₃⁻. *J.Gen.Physiol.* 110:453-465.
- Bignami A, Swanson J, Dahl D (1979) GFA expression in aggregation cultures of rat C6 glioma. *Experientia* 35:1170-1171.
- Bissell MG, Rubinstein LJ, Bignami A, Herman MM (1974) Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. *Brain Res.* 82:77-89.
- Bonita R, Stewart A, Beaglehole R (1990) International trends in stroke mortality: 1970-1985 [see comments]. *Stroke* 21:989-992.
- Boron WF, McCormick WC, Roos A (1979) pH regulation in barnacle muscle fibers: dependence on intracellular and extracellular pH. *Am.J.Physiol.* 237:C185-93.
- Boyarsky G, Ransom B, Schlue WR, Davis MB, Boron WF (1993) Intracellular pH regulation in single cultured astrocytes from rat forebrain. *Glia.* 8:241-248.
- Brismar T, Anderson S, Collins VP (1995) Mechanism of high K⁺ and Tl⁺ uptake in cultured human glioma cells. *Cell Mol.Neurobiol.* 15:351-360.

- Brismar T, Collins VP (1993) Effect of external cation concentration and metabolic inhibitors on membrane potential of human glial cells. *J.Physiol.(Lond.)* 460:365-83:365-383.
- Brown CD, Dudley AJ (1996) Chloride channel blockers decrease intracellular pH in cultured renal epithelial LLC-PK1 cells. *Br.J.Pharmacol.* 118:443-444.
- Brune T, Fetzer S, Backus KH, Deitmer JW (1994) Evidence for electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in cultured rat cerebellar astrocytes. *Pflugers.Arch.* 429:64-71.
- Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM, Adams JH (1991) Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J.Neuro.Neurosurg.Psych.* 54:427-434.
- Cabantchik ZI, Greger R (1992) Chemical Probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am.J.Physiol.* 262:C803-C827
- Cammer W, Tansey FA (1988) Carbonic anhydrase immunostaining in astrocytes in the rat cerebral cortex. *J.Neurochem.* 50:319-322.
- Chan PH (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27:1124-1129.
- Chan PH, Fishman RA (1978) Brain edema: induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* 201:358-360.
- Chassande O, Frelin C, Farahifar D, Jean T, Lazdunski M (1988) The Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport in C6 glioma cells. Properties and role in volume regulation. *Eur.J.Biochem.* 171:425-433.
- Chesler M (1990) The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog.Neurobiol.* 34:401-427.
- Chesler M, Kraig RP (1989) Intracellular pH transients of mammalian astrocytes. *J.Neurosci.* 9:2011-2019.
- Chopp M, Frinak S, Walton DR, Smith MB, Welch KM (1987) Intracellular acidosis during and after cerebral ischemia: in vivo nuclear magnetic resonance study of hyperglycemia in cats. *Stroke.* 18:919-923.
- Chow SY, Yen Chow YC, White HS, Woodbury DM (1991) pH regulation after acid load in primary cultures of mouse astrocytes. *Brain.Res.Dev.Brain.Res.* 60:69-78.

- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259-268.
- Coulter, WH (1953) Means for counting particles in a fluid. US Patent No 2,656,508.
- Davies DL, Vernadakis A (1986) Responses in astrocytic C6 glioma cells to ethanol and dibutyryl cyclic AMP. *Brain Res.* 389:253-260.
- Deitmer JW (1991) Electrogenic sodium-dependent bicarbonate secretion by glial cells of the leech central nervous system. *J.Gen.Physiol.* 98:637-655.
- Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog.Neurobiol.* 48:73-103.
- Deitmer JW, Schneider HP, Munsch T (1993) Independent changes of intracellular calcium and pH in identified leech glial cells. *Glia.* 7:299-306.
- Drejer J, Larsson OM, Schousboe A (1983) Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. *Neurochem.Res.* 8:231-243.
- Dringen R, Peters H, Wiesinger H, Hamprecht B (1995) Lactate transport in cultured glial cells. *Dev.Neurosci.* 17:63-69.
- Emma F, McManus M, Strange K (1997) Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC. *Am.J.Physiol.* 272:C1766-C1775
- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28:351-354.
- Erecinska M, Deas J, Silver IA (1995) The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes. *J.Neurochem.* 65:2765-2772.
- Erecinska M, Silver IA (1986a) The role of glial cells in regulation of neurotransmitter amino acids in the external environment. I. Transmembrane electrical and ion gradients and energy parameters in cultured glial-derived cell lines. *Brain Res.* 369:193-202.

- Erecinska M, Troeger MB, Wilson DF, Silver IA (1986b) The role of glial cells in regulation of neurotransmitter amino acids in the external environment. II. Mechanism of aspartate transport. *Brain Res.* 369:203-214.
- Eriskat J, Schurer L, Kempinski O, Baethmann A (1994) Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta.Neurochir.Suppl.Wien.* 60:425-427.
- Falke JJ, Chan SI (1986a) Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors. *Biochemistry* 25:7888-7894.
- Falke JJ, Chan SI (1986b) Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 3. Translocation inhibitors. *Biochemistry* 25:7899-7906.
- Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur.J.Biochem.* 174:3-14.
- Giffard RG, Monyer H, Choi DW (1990) Selective vulnerability of cultured cortical glia to injury by extracellular acidosis. *Brain Res.* 530:138-141.
- Goldman SA, Pulsinelli WA, Clarke WY, Kraig RP, Plum F (1989) The effects of extracellular acidosis on neurons and glia in vitro. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 9:471-477.
- Graham DI, Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, McLellan DR (1989a) Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 52:346-350.
- Graham DI, Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, McLellan DR (1989b) Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 52:346-350.
- Grossman RG, Lynch L, Shires GT (1968) Ionic content and membrane potentials of cortical neurons and glia. *Neurology* 18:292
- Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S, Doljanski F (1969) Electrical sizing of particles in suspensions. I. Theory. *Biophys.J.* 9:1398-1414.
- Haas M (1994) The Na-K-Cl cotransporters. *Am.J.Physiol.* 267:C869-C885
- Haberstok, J. (1999) Personal Communication.

- Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R (1996) 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch.Neurol.* 53:309-315.
- Hansson E (1986) Primary cultures from defined brain areas. III. Effects of seeding time on [3H]L-glutamate transport and glutamine synthetase activity. *Brain.Res.* 389:203-209.
- Hansson E, Ronnback L, Lowenthal A, Noppe M, Alling C, Karlsson B, Sellstrom A (1982) Brain primary culture-- a characterization (part II). *Brain.Res.* 231:173-183.
- Harris RJ, Symon L (1984) Extracellular pH, potassium, and calcium activities in progressive ischaemia of rat cortex. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 4:178-186.
- Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, Wagner R, Wienhard K (1992) Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 12:193-203.
- Hertz L, Wu PH, Schousboe A (1978) Evidence for net uptake of GABA into mouse astrocytes in primary cultures--its sodium dependence and potassium independence. *Neurochem.Res.* 3:313-323.
- Hoffmann EK (1992) Cell swelling and volume regulation. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70 Suppl:S310-3:S310-S313
- Hossmann KA (1989) The pathophysiology of experimental brain edema. *Neurosurg.Rev.* 12:263-280.
- Hossmann KA (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc.Brain.Metab.Rev.* 8:195-208.
- Hossmann KA, Kleihues P (1973) Reversibility of ischemic brain damage. *Arch.Neurol.* 29:375-384.
- Inao S, Marmarou A, Clarke GD, Andersen BJ, Fatouros PP, Young HF (1988) Production and clearance of lactate from brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum following experimental brain injury. *J.Neurosurg.* 69:736-744.
- Jackson PS, Strange K (1995) Characterization of the voltage-dependent properties of a volume- sensitive anion conductance. *J.Gen.Physiol.* 105:661-676.

- Jakubovicz DE, Grinstein S, Klip A (1987) Cell swelling following recovery from acidification in C6 glioma cells: an in vitro model of postischemic brain edema. *Brain.Res.* 435:138-146.
- Jakubovicz DE, Klip A (1989) Lactic acid-induced swelling in C6 glial cells via Na⁺/H⁺ exchange. *Brain.Res.* 485:215-224.
- Jean T, Frelin C, Vigne P, Lazdunski M (1986) The Na⁺/H⁺ exchange system in glial cell lines. Properties and activation by an hyperosmotic shock. *Eur.J.Biochem.* 160:211-219.
- Jennett B (1992) Minimising brain damage from head injury by appropriate early management. In: *Neuropsychological Rehabilitation* (v.Steinbüchel N, v.Cramon DY, Pöppel E eds), pp 139-145. Berlin: Springer.
- Jennett B (1996) Epidemiology of head injury. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 60:362-369.
- Juurlink BH (1982) Glutamine synthetase and glutamyltransferase activities in the mouse astrocyte in vitro. *Neurochem.Res.* 7:905-910.
- Kachel V (1976) Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument "Metricell". *J.Histochem.Cytochem.* 24:211-230.
- Kaila K, Saarikoski J, Voipio J (1990) Mechanism of action of GABA on intracellular pH and on surface pH in crayfish muscle fibres. *J.Physiol.(Lond.)* 427:241-60:241-260.
- Kalimo H, Rehncrona S, Soderfeldt B, Olsson Y, Siesjo BK (1981) Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 1:313-327.
- Katsura K, Kristian T, Smith ML, Siesjo BK (1994) Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 14:243-250.
- Kempinski O, Chaussy L, Gross U, Zimmer M, Baethmann A (1983) Volume regulation and metabolism of suspended C6 glioma cells: an in vitro model to study cytotoxic brain edema. *Brain.Res.* 279:217-228.
- Kempinski O, Gross U, Baethmann A (1982) An in vitro model of cytotoxic brain edema: cell volume and metabolism of cultivated glial- and nerve-cells. In: *Advances in Neurosurgery* (Driesen W, Brock M, Klinger M eds), pp 254-258. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Kempski O, Staub F, Jansen M, Schodel F, Baethmann A (1988) Glial swelling during extracellular acidosis in vitro. *Stroke*. 19:385-392.
- Kempski O, Staub F, Schneider GH, Weigt H, Baethmann A (1992) Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high K⁺ concentrations or acidosis. In: *Progress in Brain Research* (Yu ACH, Hertz L, Norenberg MD, Sykova E, Waxman SG eds), pp 69-75. Elsevier Science Publishers B.V.
- Kempski O, Zimmer M, Neu A, von Rosen F, Jansen M, Baethmann A (1987) Control of glial cell volume in anoxia. In vitro studies on ischemic cell swelling. *Stroke*. 18:623-628.
- Kimelberg HK (1987) Anisotonic media and glutamate-induced ion transport and volume responses in primary astrocyte cultures. *J.Physiol.(Paris.)* 82:294-303.
- Kimelberg HK (1995) Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J.Neurosurg.* 83:1051-1059.
- Kimelberg HK (1998) Methodological concerns: commentary on forum position paper. *Neurotoxicology*. 19:27-34.
- Kimelberg HK, Biddlecome S, Bourke RS (1979) SITS-inhibitable Cl⁻ transport and Na⁺-dependent H⁺ production in primary astroglial cultures. *Brain Res.* 173:111-124.
- Kimelberg HK, Cragoe EJ, Jr., Nelson LR, Popp AJ, Szarowski D, Rose JW, Woltersdorf OW, Jr., Pietruszkiewicz AM (1987) Improved recovery from a traumatic-hypoxic brain injury in cats by intracisternal injection of an anion transport inhibitor. *Cent.Nerv.Syst.Trauma*. 4:3-14.
- Kimelberg HK, Frangakis MV (1985) Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res.* 361:125-134.
- Kimelberg HK, O'Connor E (1988) Swelling of astrocytes causes membrane potential depolarization. *Glia*. 1:219-224.
- Kimelberg HK, O'Connor ER, Sankar P, Keese C (1992) Methods for determination of cell volume in tissue culture. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70 Suppl:S323-33.

- Kimelberg HK, Ransom BR (1986) Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: Astrocytes (Fedoroff S, Vernadakis A eds), pp 129-166. San Diego: Academic Press.
- Kimelberg HK, Stieg PE, Mazurkiewicz JE (1982) Immunocytochemical and biochemical analysis of carbonic anhydrase in primary astrocyte cultures from rat brain. *J.Neurochem.* 39:734-742.
- Klatzo I (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 26:1-14.
- Kohut JJ, Bednar MM, Kimelberg HK, McAuliffe TL, Gross CE (1992) Reduction in ischemic brain injury in rabbits by the anion transport inhibitor L-644,711. *Stroke.* 23:93-97.
- Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, von Stockert TR (1998) A prospective community-based study of stroke in germany--The Erlangen stroke project (ESPro) : incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months. *Stroke* 29:2501-2506.
- Kraig RP, Chesler M (1990) Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 10:104-114.
- Kraig RP, Petito CK, Plum F, Pulsinelli WA (1987) Hydrogen ions kill brain at concentrations reached in ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 7:379-386.
- Kraig RP, Pulsinelli WA, Plum F (1985) Heterogeneous distribution of hydrogen and bicarbonate ions during complete brain ischemia. *Prog.Brain.Res.* 63:-1990
- Krebs H, Woods H, Alberti K (1975) Hyperlactataemia and lactic acidosis. *Essays.Med.Biochem.* 1:81-103.
- Kristian T, Siesjo BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29:705-718.
- Kukes G, Elul R, de Vellis J (1976) The ionic basis of the membrane potential in a rat glial cell line. *Brain Res.* 104:71-92.

- LaManna JC, Griffith JK, Cordisco BR, Bell HE, Lin CW, Pundik S, Lust WD (1995) Rapid recovery of rat brain intracellular pH after cardiac arrest and resuscitation. *Brain Res.* 687:175-181.
- Le Bars E, Roussel S, Remy C, Loubinoux I, Devoulon P, Méric P, Pinard E, Dupeyre R, Decorps M, Massarelli R (1996) Delayed progression of cytotoxic oedema in focal cerebral ischemia after treatment with a torasemide derivative: a diffusion-weighted magnetic resonance imaging study. *Neurosci.Lett.* 213:123-126.
- Liao CL, Eng LF, Herman MM, Bensch KG (1978) Glial fibrillary acidic protein-solubility characteristics, relation to cell growth phases and cellular localization in rat C-6 glioma cells: an immunoradiometric and immunohistologic study. *J.Neurochem.* 30:1181-1186.
- Ljunggren B, Norberg K, Siesjö BK (1974) Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. *Brain.Res.* 77:173-186.
- Lohr JW, Yohe LA (1994) Mechanisms of hypoosmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 667:263-268.
- Lukacs GL, Nanda A, Rotstein OD, Grinstein S (1991) The chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (NPPB) uncouples mitochondria and increases the proton permeability of the plasma membrane in phagocytic cells. *FEBS.Lett.* 288:17-20.
- Lynch DR, Dawson TM (1994) Secondary mechanisms in neuronal trauma [see comments]. *Curr.Opin.Neurol.* 7:510-516.
- Mackert B (1994) Zytotoxische Schwellung und Schädigung neuronaler Zellen bei zerebraler Ischämie. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Marmarou A (1992) Intracellular acidosis in human and experimental brain injury. *J.Neurotrauma.* 9 Suppl 2:S551-62.
- McCarty NA, O'Neil RG (1992) Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol.Rev.* 72:1037-1061.
- McIntosh TK, Faden AI, Bendall MR, Vink R (1987) Traumatic brain injury in the rat: alterations in brain lactate and pH as characterized by ¹H and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J.Neurochem.* 49:1530-1540.

- McManus M, Fischbarg J, Sun A, Hebert S, Strange K (1993) Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am.J.Physiol.* 265:C562-C570
- Mellergard P, Ou Yang Y, Siesjo BK (1994) Relationship between intra- and extracellular pH in primary cultures of rat astrocytes. *Am.J.Physiol.* 267:C581-9.
- Mellergard P, OuYang YB, Siesjo BK (1993) Intracellular pH regulation in cultured rat astrocytes in CO₂/HCO₃⁻-containing media. *Exp.Brain.Res.* 95:371-380.
- Mellergard PE, OuYang YB, Siesjo BK (1992) The regulation of intracellular pH in cultured astrocytes and neuroblastoma cells, and its dependence on extracellular pH in a HCO₃⁻-free solution. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70 Suppl:S293-300.
- Mellergard PE, Siesjo BK (1991) Astrocytes fail to regulate intracellular pH at moderately reduced extracellular pH. *Neuroreport.* 2:695-698.
- Miller JD, Becker DP, Ward JD, Sullivan HG, Adams WE, Rosner MJ (1977) Significance of intracranial hypertension in severe head injury. *J.Neurosurg.* 47:503-516.
- Mongin AA, Aksentsev SL, Orlov SN, Kvacheva ZB, Mezen NI, Fedulov AS, Konev SV (1996) Swelling-induced activation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport in C6 glioma cells: kinetic properties and intracellular signalling mechanisms. *Biochim.Biophys.Acta* 1285:229-236.
- Mongin AA, Aksentsev SL, Orlov SN, Slepko NG, Kozlova MV, Maximov GV, Konev SV (1994) Swelling-induced K⁺ influx in cultured primary astrocytes. *Brain Res.* 655:110-114.
- Morales-Mulia S, Vaca L, Hernandez-Cruz A, Pasantes-Morales H (1998) Osmotic swelling-induced changes in cytosolic calcium do not affect regulatory volume decrease in rat cultured suspended cerebellar astrocytes. *J.Neurochem.* 71:2330-2338.
- Morimoto Y, Yamamura T, Kemmotsu O (1993) Influence of hypoxic and hypercapnic acidosis on brain water content after forebrain ischemia in the rat. *Crit.Care Med.* 21:907-913.
- Muizelaar JP, Marmarou A, Ward JD, Kontos HA, Choi SC, Becker DP, Gruemer H, Young HF (1991) Adverse effects of prolonged hyperventilation in patients with severe head injury: a randomized clinical trial. *J.Neurosurg.* 75:731-739.

- Munekata K, Hossmann KA (1987) Effect of 5-minute ischemia on regional pH and energy state of the gerbil brain: relation to selective vulnerability of the hippocampus. *Stroke*. 18:412-417.
- Mutch WA, Hansen AJ (1984) Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 4:17-27.
- Myers RE (1979) Lactic acid accumulation as cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. In: *Advances in perinatal neurology* (Korobkin and R, Guilleminault G eds), pp 85-114. New York: Spectrum.
- Myers RE, Yamaguchi S (1977) Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys. *Arch.Neurol*. 34:65-74.
- Nakai H, Yamamoto YL, Diksic M, Worsley KJ, Takara E (1988) Triple-tracer autoradiography demonstrates effects of hyperglycemia on cerebral blood flow, pH, and glucose utilization in cerebral ischemia of rats. *Stroke* 19:764-772.
- Neary JT, Fu Q, Bender AS, Norenberg MD (1993) Effect of external acidosis on basal and ATP-evoked calcium influx in cultured astrocytes. *Brain.Res*. 604:211-216.
- Nedergaard M (1987) Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res*. 408:79-85.
- Nedergaard M (1995) Intracellular Ca²⁺ transients evoked by lactic acid in cultured mammalian neurons. *Am.J.Physiol*. 268:R506-R513
- Nedergaard M, Goldman SA (1993) Carrier-mediated transport of lactic acid in cultured neurons and astrocytes. *Am.J.Physiol*. 265:R282-9.
- Nedergaard M, Goldman SA, Desai S, Pulsinelli WA (1991a) Acid-induced death in neurons and glia. *J.Neurosci*. 11:2489-2497.
- Nedergaard M, Kraig RP, Tanabe J, Pulsinelli WA (1991b) Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am.J.Physiol*. 260:R581-8.

- Nett W, Deitmer JW (1996) Simultaneous measurements of intracellular pH in the leech giant glial cell using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein and ion-sensitive microelectrodes. *Biophys.J.* 71:394-402.
- Nicklas WJ, Browning ET (1983) Glutamate uptake and metabolism in C-6 glioma cells: alterations by potassium ion and dibutyryl cAMP. *J.Neurochem.* 41:179-187.
- Norenberg MD, Mozes LW, Gregorios JB, Norenberg LO (1987) Effects of lactic acid on astrocytes in primary culture. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 46:154-166.
- O'Connor ER, Kimelberg HK (1993) Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J.Neurosci.* 13:2638-2650.
- Olson JE, Fleischhacker D, Murray WB, Holtzman D (1990) Control of astrocyte volume by intracellular and extracellular Ca²⁺. *Glia* 3:405-412.
- Olson JE, Sankar R, Holtzman D, James A, Fleischhacker D (1986) Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *J.Cell Physiol.* 128:209-215.
- Ou Yang Y, Mellergard P, Siesjo BK (1993) Regulation of intracellular pH in single rat cortical neurons in vitro: a microspectrofluorometric study. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 13:827-840.
- OuYang YB, Mellergard P, Kristian T, Kristianova V, Siesjo BK (1994) Influence of acid-base changes on the intracellular calcium concentration of neurons in primary culture. *Exp.Brain.Res.* 101:265-271.
- Pappius HM (1974) Fundamental aspects of brain edema. In: Tumors of the brain and skull (Vinken PJ, Bruyn GW eds), pp 167-185. New York: North Holland Publ., Amsterdam American Elsevier.
- Parker KK, Norenberg MD, Vernadakis A (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* 208:179-181.
- Pasantes Morales H, Murray RA, Lilja L, Moran J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am.J.Physiol.* 266:C165-71.
- Paul J (1975) Cell and tissue culture. Churchill Livingstone, Edinburgh.

- Petito CK, Kraig RP, Pulsinelli WA (1987) Light and electron microscopic evaluation of hydrogen ion- induced brain necrosis. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 7:625-632.
- Pishak MR, Phillips AT (1980) Glucocorticoid stimulation of glutamine synthetase production in cultured rat glioma cells. *J.Neurochem.* 34:866-872.
- Plesnila N, Haberstock J, Peters J, Kölbl I, Baethmann A, Staub F (1999) Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes. *J.Neurotrauma* 16:831-841.
- Plum F (1983) What causes infarction in ischemic brain?: The Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 33:222-233.
- Plum F, Posner JB (1980) *Diagnosis of stupor and coma.* 3. Auflage, F.A. Davis Co., Philadelphia.
- Poeck K (1990) *Neurologie.* 8. Auflage, Springer, Berlin.
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F (1982a) Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32:1239-1246.
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F (1982b) Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32:1239-1246.
- Rehncrona S, Hauge HN, Siesjo BK (1989) Enhancement of iron-catalyzed free radical formation by acidosis in brain homogenates: differences in effect by lactic acid and CO₂. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 9:65-70.
- Rehncrona S, Siesjo BK, Smith DS (1980) Reversible ischemia of the brain: biochemical factors influencing restitution. *Acta.Physiol.Scand.Suppl.* 492:135-140.
- Reichhardt M (1905) *Deutsche Ztschr Nervenheilk* 28:306-355.
- Reilly PL, Graham DI, Adams JH, Jennett B (1975) Patients with head injury who talk and die. *Lancet* 2:375-377.
- Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T (1982) Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *J Cell Biol* 95:189-196.
- Roos A, Boron WF (1981) Intracellular pH. *Physiol.Rev.* 61:296-434.

- Ropper AH, Shafran B (1984) Brain edema after stroke. Clinical syndrome and intracranial pressure. *Arch.Neurol.* 41:26-29.
- Rose CR, Ransom BR (1996) Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. *J.Physiol.Lond.* 491:291-305.
- Rosner MJ, Becker DP (1984) Experimental brain injury: successful therapy with the weak base, tromethamine. With an overview of CNS acidosis. *J.Neurosurg.* 60:961-971.
- Salford LG, Plum F, Siesjo BK (1973) Graded hypoxia-oligemia in rat brain. I. Biochemical alterations and their implications. *Arch.Neurol.* 29:227-233.
- Salford LG, Siesjo BK (1974) The influence of arterial hypoxia and unilateral carotid artery occlusion upon regional blood flow and metabolism in the rat brain. *Acta.Physiol.Scand.* 92:130-141.
- Sanchez Olea R, Fuller C, Benos D, Pasantes Morales H (1995) Volume-associated osmolyte fluxes in cell lines with or without the anion exchanger. *Am.J.Physiol.* 269:C1280-6.
- Schneider GH (1998) Molekulare Mechanismen der Glutamat-induzierten Gliazellschwellung. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O (1992) Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70 Suppl:S334-43.
- Schousboe A, Svenneby G, Hertz L (1977) Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J.Neurochem.* 29:999-1005.
- Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A (1980) Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells: effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments. *Differentiation.* 17:51-61.
- Shrode LD, Putnam RW (1994) Intracellular pH regulation in primary rat astrocytes and C6 glioma cells. *Glia.* 12:196-210.
- Siemkowicz E, Hansen AJ (1981) Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke* 12:236-240.

- Siesjo BK (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 1:155-185.
- Siesjo BK (1988) Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem.Pathol.* 9:31-88.
- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J.Neurosurg.* 77:169-184.
- Siesjo BK, Bendek G, Koide T, Westerberg E, Wieloch T (1985) Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 5:253-258.
- Siesjo BK, Katsura K, Kristian T (1996) Acidosis-related damage. *Adv.Neurol.* 71:
- Siesjo BK, Katsura K, Mellergard P, Ekholm A, Lundgren J, Smith ML (1993) Acidosis-related brain damage. *Prog.Brain.Res.* 96:
- Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T, Li PA, Siesjo P (1996) Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta.Neurochir.Suppl.Wien.* 66:8-14.
- Siesjo BK, 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.
- Smith ML, von Hanwehr R, Siesjo BK (1986) Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 6:574-583.
- Staub F (1992) Schwellung und Schädigung von Gliazellen durch Azidose. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H, Kempfski O (1990) Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 10:866-876.
- Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J, Baethmann A (1993a) Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J.Neurol.Sci.* 119:79-84.
- Staub F, Peters J, Kempfski O, Schneider GH, Schurer L, Baethmann A (1993b) Swelling of glial cells in lactacidosis and by glutamate: significance of Cl(-)-transport. *Brain.Res.* 610:69-74.

- Staub F, Stoffel M, Berger S, Eriskat J, Baethmann A (1994a) Treatment of vasogenic brain edema with the novel Cl⁻ transport inhibitor torasemide. *J.Neurotrauma*. 11:679-690.
- Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A (1994b) Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab*. 14:1030-1039.
- Stein SC, Spettell C, Young G, Ross SE (1993) Delayed and progressive brain injury in closed-head trauma: radiological demonstration. *Neurosurgery* 32:25-30.
- Strange K, Emma F, Jackson PS (1996) Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am.J.Physiol*. 270:C711-30.
- Strange K, Jackson PS (1995) Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int*. 48:994-1003.
- Tas PWL, Massa PT, Kress HG, Koschel K (1987) Characterization of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ co-transport in primary cultures of astrocytes. *Biochim.Biophys.Acta*. 903:411-416.
- Thom TJ (1993) Stroke mortality trends. An international perspective. *Ann.Epidemiol*. 3:509-518.
- Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18:2210-2218.
- Tildon JT, McKenna MC, Stevenson J, Couto R (1993) Transport of L-lactate by cultured rat brain astrocytes. *Neurochem.Res*. 18:177-184.
- Tobey NA, Cragoe EJ, Jr., Orlando RC (1995) HCl-induced cell edema in rabbit esophageal epithelium: a bumetanide-sensitive process. *Gastroenterology*. 109:414-421.
- Tobey NA, Koves G, Orlando RC (1997) HCl-induced cell edema in primary cultured rabbit esophageal epithelium. *Gastroenterology* 112:847-854.
- Tombaugh GC, Sapolsky RM (1993) Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. *J.Neurochem*. 61:793-803.

- Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396-2404.
- Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*. 290:527-528.
- Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Muller Esterl W (1986) The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J.Neurosurg.* 64:269-276.
- Van Harreveld A, Fifkova E (1971) Light- and electron-microscopic changes in central nervous tissue after electrophoretic injection of glutamate. *Exp.Mol.Pathol.* 15:61-81.
- Volk C, Albert T, Kempinski OS (1998) A proton-translocating H⁺-ATPase is involved in C6 glial pH regulation. *Biochim.Biophys.Acta* 1372:28-36.
- von Hanwehr R, Smith ML, Siesjo BK (1986) Extra- and intracellular pH during near-complete forebrain ischemia in the rat. *J.Neurochem.* 46:331-339.
- Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L (1988) Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 8:621-634.
- Walz W (1992) Role of Na/K/Cl cotransport in astrocytes. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 70 Suppl:S260-2.
- Walz W, Hertz L (1983) Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Prog.Neurobiol.* 20:133-183.
- Walz W, Hinks EC (1986) A transmembrane sodium cycle in astrocytes. *Brain.Res.* 368:226-232.
- Walz W, Mukerji S (1988) KCl movements during potassium-induced cytotoxic swelling of cultured astrocytes. *Exp.Neurol.* 99:17-29.
- Walz W, Mukerji S (1990) Simulation of aspects of ischemia in cell culture: changes in lactate compartmentation. *Glia* 3:522-528.

- Walz W, Wuttke WA (1989) Resistance of astrocyte electrical membrane properties to acidosis changes in the presence of lactate. *Brain.Res.* 504:82-86.
- Warner DS, Smith ML, Siesjo BK (1987) Ischemia in normo- and hyperglycemic rats: effects on brain water and electrolytes. *Stroke.* 18:464-471.
- Wass CT, Lanier WL (1996) Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clin.Proc.* 71:801-812.
- Weir CJ, Murray GD, Dyker AG, Lees KR (1997) Is hyperglycaemia an independent predictor of poor outcome after acute stroke? Results of a long-term follow up study [see comments]. *BMJ.* 314:1303-1306.
- Welsh FA, Sims RE, McKee AE (1983) Effect of glucose on recovery of energy metabolism following hypoxia- oligemia in mouse brain: dose-dependence and carbohydrate specificity. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 3:486-492.
- Yoshida K, Marmarou A (1991) Effects of tromethamine and hyperventilation on brain injury in the cat. *J.Neurosurg.* 74:87-96.
- Zimmer M (1989) Zellvolumen und intrazelluläre Elektrolyte von Gliomzellen in Anoxie. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.

G) Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann für die Überlassung des interessanten Themas und die Aufnahme in das 'Hirnteam'. Seine konstruktiv kritischen Anmerkungen und Ratschläge haben mir essentiell geholfen dieses Projekt zu Ende zu führen.

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer für die Aufnahme in das Institut.

Herrn Dr. med. Nikolaus Plesnila für die freundschaftliche Betreuung in allen Belangen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Raymond Chuen Chung Chang für seine Hilfestellungen und Anregungen in der Durchführung der Versuche.

Herr Dr. Jürgen Peters für die geduldigen Erklärungen bei statistischen Problemen und Fragen der elektronischen Datenverarbeitung.

Frau Ingrid Kölbl für die hervorragende Unterstützung bei der Aufrechterhaltung der Zellkultur.

H) Veröffentlichungen

Publizierte Abstracts

1. F. Ringel, N. Plesnila, R.C.C. Chang, A. Baethmann. (1996) Role of anion transport in intracellular acidosis and swelling of glial cells from lactic acid. *Cerebrovasc Dis* 6 (Suppl. 2), 120
2. F. Ringel, N. Plesnila, R.C.C. Chang, A. Baethmann. (1998) Acidosis-induced glial swelling in vitro - role of anion transport. *J Neurotrauma* 15

Buchbeiträge

1. F. Ringel, N. Plesnila, R.C.C. Chang, J. Peters, F. Staub, A. Baethmann. (1997) Role of calcium ions in acidosis-induced glial swelling. *Acta Neurochir [Suppl]* 70: 144-147
2. N. Plesnila, F. Ringel, R.C.C. Chang, F. Staub, A. Baethmann (1998) Relevance of calcium homeostasis in glial cell swelling from acidosis. *Acta Neurochir [Suppl]* 71: 203-205

Originalarbeiten

1. F. Ringel, R.C.C. Chang, F. Staub, A. Baethmann, N. Plesnila (2000) The contribution of anion transporters to acidosis-induced swelling and intracellular acidification of C6 glial cells. *J Neurochem* 75: 125-132.

Vorträge

1. F. Ringel, N. Plesnila, R.C.C. Chang, J. Peters, F. Staub, A. Baethmann. (1996) Role of calcium ions in acidosis-induced glial swelling. Vorgestellt anlässlich des 10. Internationalen Brain Edema Symposiums, 20.-23. Oktober 1996 in San Diego, U.S.A.
2. F. Ringel, N. Plesnila, R.C.C. Chang, J. Peters, F. Staub, A. Baethmann. (1996) Role of calcium ions in acidosis-induced glial swelling. Vorgestellt anlässlich der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 27.-30. April 1997 in Berlin

I) Lebenslauf

Florian Alexander Ringel
Erste Fährgasse 5
53113 Bonn

16. Februar 1971 geboren in München;
Sohn von Dr.med. Kurt Ringel, Arzt
und Brigitte Ringel, geb. Schablowski, Sozialpädagogin.

Schulausbildung

1977-81 Droste-Hülshoff Grundschule, München.
1981-90 Erasmus-Grasser Gymnasium, München.

Zivildienst

1990-1991 Zivildienstleistender im hämodynamischen Forschungslabor der
Arbeitsgruppe Hepatologie der II. Medizinischen Klinik, Klinikum
Großhadern der Universität München (Leiter: Prof. Dr. A. Gerbes).

Studium

Nov. 1991 - Mai 98 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians
Universität München.

Famulaturen:
Chirurgie Bezirksspital Langnau, Schweiz
Häm./Onkolog. Hitchcock Medical Center, Dartmouth Medical School, U.S.A.
Neuroanästhesie Klinikum Großhadern der LMU, München
Neurochirurgie University of California at San Diego, U.S.A.

Praktisches Jahr:
Chirurgie Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. F.W. Schildberg).
Neurochirurgie Department of Neurological Surgery, Barrow Neurological
Institute, University of Arizona, Phoenix, U.S.A.
(Chairman: Prof. Dr. R.F. Spetzler)
Neurologie Department of Neurology, New York Hospital, Cornell Medical
College, New York (Chairman: Prof. Dr. F. Plum).
Department of Neurology, Memorial Sloan Kettering Cancer
Center, Cornell Medical College (Chairman: Prof. Dr. J.B. Posner).

Innere Medizin Medizinische Klinik des Klinikum Innenstadt, Ludwig-
Maximilians-Universität, München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. P.C. Scriba).

Berufliche Tätigkeit

Jan. '99 – Juni '01 Arzt im Praktikum am Institut für Chirurgische Forschung,
Klinikum Großhadern der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer)

 Juli '00 Approbation als Arzt

 Juli '00 – Jan. '01 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Chirurgische
Forschung, Klinikum Großhadern der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer)

 seit Feb. '01 Wissenschaftlicher Assistent an der Neurochirurgischen Klinik
und Poliklinik der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. J. Schramm)