

Aus der Neurologischen Klinik Großhadern der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt, FRCP

Toxizität von Chinidin:

Untersuchungen an vestibulären Haarzellen mit der Patch-Clamp-Technik und an pialen  
Gefäßen mit der Kranielle-Fenster-Technik

Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Otto Fortunatus Schwark

aus

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Strupp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Konnerth

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

Tag der mündlichen

Prüfung: 11.11.2004

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	3
1.1	Kasuistik .....	3
1.2	Anatomie und Physiologie des peripheren vestibulären Nervensystems .....	4
1.3	Chinidin: Übersicht über Geschichte und frühere Anwendungsgebiete .....	5
1.4	Heutige Anwendungsgebiete von Chinidin .....	7
1.5	Unerwünschte Wirkungen von Chinidin .....	8
2	Fragestellung .....	10
3	Material und Methoden .....	12
3.1	Material .....	12
3.1.1	Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterial .....	12
3.1.2	Chemische Substanzen .....	13
3.1.3	Lösungen für die <i>Patch-clamp</i> und Kranielle-Fenster-Technik Versuche .....	14
3.2	Ableitungen an vestibulären Haarzellen mittels <i>Patch-Clamp</i> -Technik .....	17
3.2.1	Präparation der Cristae ampullares und der vestibulären Haarzellen .....	17
3.2.2	<i>Patch-Clamp</i> -Messmethoden .....	18
3.3	Kranielle-Fenster-Methode .....	22
3.3.1	Präparation des kraniellen Fensters und Versuchsaufbau .....	23
3.3.2	Messmethode und Auswertung .....	24
4	Ergebnisse .....	26
4.1	Patch-Clamp-Untersuchungen .....	26
4.1.1	Elektrophysiologische Charakterisierung vestibulärer Haarzellen .....	26
4.1.2	Pharmakologische Charakterisierung des dominierenden Kaliumstromes .....	31
4.1.3	Der Einfluss von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen .....	36
4.2	Reaktion pialer Gefäße auf Chinidin .....	44
5	Diskussion .....	46
5.1	Patch-Clamp-Messungen .....	46
5.1.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der vestibulären Zellen .....	46
5.1.2	Wirkung von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen .....	47
5.2	Kranielle-Fenster-Untersuchungen .....	50
5.2.1	Beurteilung der Methodik .....	50
5.2.2	Wirkungen von Chinidin auf piale Gefäße .....	50
5.3	Schlussfolgerungen .....	52
	Zusammenfassung .....	53
	Literaturverzeichnis .....	55

# 1 Einleitung

Der therapeutische Einsatz von Pharmaka wird oft durch deren unerwünschte Wirkungen eingeschränkt. Häufig kommt es zu Schwindel und Gangunsicherheit. Da diese unerwünschte Wirkung und deren klinisches Bild sehr uneinheitlich sind und darüber hinaus der Wirkungsmechanismus in bezug auf die Auslösung von Schwindel unklar ist, gibt es derzeit keine befriedigende Klassifizierung des pharmakogenen Schwindels (Brandt et al., 2004). Auf der einen Seite stehen Pharmaka mit bekannten ototoxischen Wirkungen, wie z.B. Aminoglykoside, die zu einer direkten Schädigung der Haarzellen führen, auf der anderen Seite gibt es Pharmaka wie die Antikonvulsiva, die zu zentralen Okulomotorik-Störungen führen, obwohl sie nach ihrem Wirkprinzip auf praktisch alle Neurone des ZNS einwirken. Eine Substanz, die in höherer Dosierung häufig Schwindel verursacht, ist Chinin.

## 1.1 Kasuistik

In der Neurologischen Klinik des Klinikums Großhadern stellte sich ein 81jähriger Patient mit Schwankschwindel, Amaurosis, Hypakusis und hochfrequentem Tinnitus vor. Die Anamnese ergab, dass sich diese Symptome etwa zwei Stunden nach der lokalen Applikation Chininhaltiger Lösung zur Therapie beiderseits bestehender Hydrozeles testis entwickelt hatten. In den technischen Untersuchungen zeigten sich im Elektronystagmogramm eine kalorische Untererregbarkeit des rechten Vestibularorgans, im Audiogramm eine beidseitige Hochtonschwerhörigkeit, bei den otoakustischen Emissionen Hinweise auf eine Störung der äußeren cochleären Haarzellen und bei den visuell evozierten Potenzialen eine beidseitige Latenzverzögerung. Zum Nachweis einer möglichen Intoxikation wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität München die Chinin-Konzentration im Blut bestimmt. In der Serumprobe fand sich 24 Stunden nach der Gabe noch eine Konzentration von 3,2 mg/l Chinin. Berücksichtigt man die Halbwertszeit der Elimination von Chinin von neun bis dreizehn Stunden, so errechnet sich für den Zeitpunkt der ersten Symptome eine Konzentration von ca. 9 bis 20 mg/l Chinin im Serum. Dies liegt deutlich über dem therapeutischen Bereich des Chinins von 0,2 mg/l und auch deutlich über der toxischen Konzentration von 2-5

mg/l (Benent et al., 1996). Der Fall wurde als sog. Cinchonismus nach Applikation von Chinin-haltiger Lösung eingeordnet (Strupp et al., 1998).

Im folgenden Abschnitt der Einleitung wird zunächst auf die spezielle Anatomie des Innenohres eingegangen. Es folgt eine Übersicht über die Geschichte der Entdeckung des Chinidin. Abschließend werden die Anwendungsgebiete und die bekannten unerwünschten Wirkungen von Chinin und Chinidin beschrieben.

## **1.2 Anatomie und Physiologie des peripheren vestibulären Nervensystems: eine Übersicht**

Informationen über die Lage des Kopfes bzw. des Körpers im Raum werden dem Zentralnervensystem über visuelle, somatosensorische und vestibuläre Afferenzen vermittelt. Das Gleichgewichtsorgan liegt im Innenohr, eingebettet in das Felsenbein. Es besteht aus zwei unterschiedlichen Rezeptorsystemen: Zum einen Rezeptoren für lineare Beschleunigung in Sacculus und Utriculus, zum anderen Rezeptoren für Drehbeschleunigung in den drei Bogengängen.

Die drei Bogengänge stehen senkrecht zueinander und machen es so möglich, Beschleunigungen in allen drei Achsen des Raumes zu registrieren. Jeder Bogengang mündet in eine Aufweitung, die Ampulle. Hier liegen, eingebettet in die Cupula, eine gallertartige Masse von gleichem spezifischem Gewicht wie die umgebende Endolymphe, die Haarzellen. Die Haarzellen werden in zwei Klassen eingeordnet: Typ I Haarzellen und Typ II Haarzellen (Wersall, 1956).

Typ I Haarzellen sind amphorenförmig, mit einem schmalen Hals am apikalen Ende. Sie werden von afferenten Nervenfasern an der basalen Seite kelchartig umschlossen. Typ II Haarzellen weisen eine Zylinderform auf. Die sie kontaktierenden Synapsen sind boutonartig. Suighara und Furukawa vermuten ein unterschiedliches Ansprechen auf hochfrequente (Typ II Zellen) und niedrigfrequente (Typ I Zelle) Impulse (Sugihara und Furukawa, 1989).

Die Umwandlung des mechanischen Impulses in ein elektrisches Signal (mechanoelektrische Transduktion) ist bei beiden Zelltypen gleich. Am apikalen Ende der Haarzellen liegen, eingebettet in eine dünne Platte, je 40-70 Stereozilien und ein langes Kinozilium. Die Stereozilien sind auf einer Seite des Kinoziliums so angeordnet, dass sie gleichmäßig in Richtung auf das Kinozilium an Länge zunehmen, dessen Länge allerdings nicht erreichen. In Richtung von den kürzeren zu den längeren Stereozilien sind deren Spitzen untereinander und mit dem Kinozilium verbunden. Orthogonal dazu sind gleich lange Stereozilien nicht miteinander verbunden (Hudspeth, 2000). So entsteht die für die Funktion wichtige morphologische Polarisierung der Zelle. An der Spitze der Stereozilien befinden sich mechanosensitive, unspezifische Kationenkanäle (Jaramillo und Hudspeth, 1991; Hudspeth 1989b; Markin und Hudspeth, 1995). Diese werden durch eine Bewegung auf das Kinozilium hin geöffnet und durch eine Bewegung vom Kinozilium weg geschlossen (Hudspeth, 1989a). Entsprechend führt eine Auslenkung in Richtung des Kinoziliums zu einer Depolarisation, eine Auslenkung weg von diesem zu einer Hyperpolarisation der Haarzelle.

Der Kaliumstrom  $I_{KI}$  spielt eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung durch die vestibulären Haarzellen (Rennie et al., 1996; Soto et al., 2002). Nach einem Reiz wird vor allem durch den Kaliumstrom  $I_{KI}$  das Ausgangspotenzial der Zelle wiederhergestellt.

Depolarisation führt zu vermehrter, Hyperpolarisation zu verminderter Freisetzung von Neurotransmittern, wobei es sich vermutlich um Glutamat handelt (Guth und Aubert, 1991; Kataoka und Ohmori, 1996; Ishiyama et al., 2002). Die afferenten vestibulären Axone besitzen bereits eine Ruhetonusfrequenz, die durch eine Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Haarzellen erhöht bzw. erniedrigt wird. Beschleunigung wird also in Änderung der Aktionspotenzialfrequenz übersetzt, dies ist die sogenannte Frequenzkodierung der eingehenden Signale (Flock, 1965).

### **1.3 Chinidin: Übersicht über Geschichte und frühere Anwendungsgebiete**

Chinidin, das Stereoisomer von Chinin, ist ein Alkaloid aus der Rinde von Bäumen der *Cinchona species*. Nach Gramiccia (1987) sollen spanische Jesuitenpater in Loxa, dem heutigen Equador, erstmals ein fiebersenkendes Pulver aus der Rinde dieser Bäume zur

Therapie der Malaria eingesetzt haben. Die Jesuiten sollen nämlich beobachtet haben, wie einheimische Minenarbeiter dieses Pulver gegen Kältezittern nach der Arbeit in den feuchten Minen benutzten - eine Wirkung, die heute bei der Behandlung muskulärer Übererregbarkeit zum Einsatz von Chinin geführt hat (Leclerc und Landry, 1996; Man Son Hing und Wells, 1995). Da das Fieber der Malaria tertiana und quartana von Schüttelfrost der Patienten eingeleitet wurde, gaben die Pater das Pulver zur Therapie dieses Zitterns. Sie folgten damit der Doktrin der Analogie Hippokrates' und Galens, Krankheiten mit gleichartigen Symptomen auch mit den gleichen Medikamenten zu behandeln. So behandelten sie neben dem Symptom Schüttelfrost auch das Fieber bei Malaria.

Von den Jesuiten wurde das Pulver dann nach Lima gebracht, wo es auch Juan de Vega, der Arzt des Grafen von Chinchon, bei der Behandlung der Malaria benutzte. Einer Überlieferung nach habe Vega die Gräfin Chinchon mit dem Pulver erfolgreich behandelt (Gramiccia, 1987). Der Name der Gräfin hat das Pulver der Rinde so berühmt gemacht, dass Linnaeus 1743 den Baum, von dem es viele Unterarten gibt, in seinen „Genera Plantarum“ als *Cinchona species* (die Gräfin hieß *Chinchona*, der Schreibfehler ist bis heute bestehen geblieben) und später als *Cinchona officinalis* bezeichnete.

1820 gelang es Pelletier und Caventou, Chinin aus der Rinde des Cinchona-Baumes zu isolieren; 1853 fand Pasteur das Chinidin (Haas, 1994; Hollman, 1991; Kyle und Shampe, 1974). Chinin ist in der Rinde des Baumes ungefähr sieben Mal so konzentriert wie Chinidin [3-5% des Extraktes ist Chinin und 0,4-0,75% Chinidin (Smit, 1987)].

Seit der Einführung des Cinchona-Rinden-Pulvers in die medizinische Therapie Ende des 17. Jahrhunderts sind auch Wirkungen auf den Herzschlag bekannt (Prinz, 1990), und Chinin wurde nach seiner Isolierung 1820 auch zur Therapie von Herzerkrankungen eingesetzt (Haas, 1994). Chinin war dann Anfang dieses Jahrhunderts nicht nur als Malaria- und Fiebermittel in Gebrauch, sondern auch ähnlich beliebt bei „kleinerem Unwohlsein“ wie heute die Acetylsalicylsäure (Hollman, 1991). Diese vergleichsweise unkritische Anwendung von Chinin bei den verschiedensten Symptomen führte dann auch zur Entdeckung seiner eigentlichen antiarrhythmischen Eigenschaften: Wenckebach berichtete 1914 von einem Patienten, den er 1912 wegen Herzrhythmusstörungen behandelte. Dieser habe, da er es sich als Kaufmann nicht habe leisten können, dass sein Herz „nicht in Ordnung“ wäre, einfach auf das „Hausmittel“ Chinin zurückgegriffen. Nach Einnahme eines Gramms hätte sich sein Herz

bereits nach 25 Minuten in Ordnung befunden, was ohne diese Therapie bis zu 14 Tagen gedauert hätte. Wenckebach selbst war dann nur noch bei einem weiteren Patienten mit der Chinin-Therapie erfolgreich (Malcolm und David, 1987). Frey berichtete 1918, dass Chinidin, das Stereoisomer des Chinin, besser und zuverlässiger wirke (Frey, 1918). Der Therapieerfolg bei der Behandlung von Vorhofflimmern wurde von Frey und Clark-Kennedy in den folgenden Jahren durch klinische Studien bestätigt (Malcolm und David, 1987).

#### **1.4 Heutige Anwendungsgebiete von Chinidin**

Chinidin wird heute hauptsächlich als Antiarrhythmikum eingesetzt (Williams, 1974) und wurde in die Gruppe 1A der Antiarrhythmika eingeordnet. Dies beruht auf seiner Eigenschaft, die Natriumleitfähigkeit an der Myokardzelle während des Aktionspotenzials zu verringern und so die Fortleitungsgeschwindigkeit der Erregung zu verlangsamen (Snyders und Hondeghem, 1990). Durch Chinidin werden neben Natriumkanälen aber vor allem verschiedene Arten von Kalium-Kanälen geblockt (Illek et al., 1993; Strupp et al., 1993; Wong, 1989; Undrovinas et al., 1990; Grace and Camm, 1998), insbesondere auch die Klasse der sogenannten „Verzögerten Gleichrichter“  $I_K$  (Balsler et al., 1991; Roden et al., 1988; Yao et al., 1996). Die „Verzögerten Gleichrichter“ dienen unter anderem dazu, das Ruhepotenzial nach einem Aktionspotenzial schnell wieder herzustellen (Hille, 1992). Die Blockade dieser Kanäle führt am Herzen zu einer verlängerten Repolarisationsdauer (Malcolm und David, 1987; Roden und Hoffman, 1985; Yao et al., 1996).

Neben seinem Einsatz in der Therapie von Herzrhythmusstörungen wird Chinidin heute auch noch auf anderen Gebieten eingesetzt: Zur Therapie der gegen die üblichen Medikamente resistenten oder auch der schwer verlaufenden Malaria ist Chinidin wirksam (Currie und Krause, 1989; Schubarth, 1993; Verhave, 1995). Chinidin wie Chinin werden bei der Behandlung von Erkrankungen eingesetzt, die mit einer neuromuskulären Übererregbarkeit wie z.B. nächtlichen Krämpfen einhergehen (Man Son Hing und Wells, 1995; Jansen et al., 1997). Ein neuer Ansatz bei der Therapie maligner Tumoren ist die Kombination von Chemotherapeutika mit Chinidin oder Chinin: In der Zellkultur wurde ein besseres Ansprechen von Nierenzellkarzinomzellen auf Chemotherapeutika erreicht (Agarwala et al., 1995). Bei leukämischen Zellen wurde nach Gabe von Chinin 24 bis 36 Stunden vor der



Chemotherapie eine auf mehr als das Doppelte erhöhte Aufnahme von Doxorubicin in diese Zellen festgestellt (Solary et al., 1991).

## 1.5 Unerwünschte Wirkungen von Chinidin

Eine Studie an 652 mit Chinidin behandelten Patienten ergab, dass 91 (14%) an unerwünschten Wirkungen litten (Cohen et al., 1977). Hier waren gastrointestinale Symptome am häufigsten (56%), gefolgt von Herzrhythmusstörungen (18%) und Fieber (12%). Die akute Inosikation ist nach dem oben erwähnten Cinchona-Baum, dessen Rinde die Alkaloide enthält, als Chinchonismus bezeichnet worden. Hierbei handelt es sich um eine Intoxikation, die durch Übelkeit, Hör- und Sehstörungen sowie Schwindel gekennzeichnet ist (Schonwald und Shannon, 1991; Wolf et al., 1992).

Die Wirkungen von Chinin und Chinidin auf das Hörvermögen sind in audiologischen Untersuchungen geprüft worden (Alvan et al., 1989). Eine direkte Wirkung auf cochleäre Haarzellen konnte durch Messung der otoakustischen Emissionen gezeigt werden (Alvan et al., 1991). Alvan und Mitarbeiter (1989 und 1991) konnten sowohl im Tierversuch als auch bei Versuchen mit freiwilligen Probanden eine konzentrationsabhängige Verminderung des Hörvermögens durch Audiogramm und akustisch evozierte Potenziale objektivieren. Karlsson (1991a) fand eine qualitative und quantitative Veränderung der otoakustischen Emissionen nach Chinin-Gabe, was ihn auf eine Beeinflussung der Funktion der äußeren Haarzellen durch Chinin schließen ließ. Die Konstanz und Dosisabhängigkeit der Hörminderung durch Chinin führten zu dem Vorschlag, die Audiometrie als Kontrolle des Chinin-Plasmaspiegels bei der Malariatherapie zu verwenden (Karlsson et al., 1990b; Paintaud et al., 1994). Die fatalen Auswirkungen des Genusses von *Tonic water* (das Chinin enthält) und den dadurch ausgelösten Gleichgewichtsstörungen bei Piloten zeigt ein Artikel mit dem passenden Namen „The Bite of Jesuit's bark“ (Balfour, 1989). Balfour berichtet, dass bei der Autopsie von Piloten, die in Flugzeugunglücken ums Leben gekommen waren, gehäuft Chinin im Blut gefunden wurde. Untersuchungen von Zajtchuk et al. (1984) konnten zeigen, dass 105 mg Chinin (dies entsprach einem Drittel der von der Food and Drug Administration erlaubten Menge), täglich eingenommen, Veränderungen im Elektronystagmogramm hervorrufen.

Möglicherweise reichten die bei den Piloten gefundenen Mengen an Chinin bereits aus, um der anspruchsvollen Aufgabe, ein Flugzeug zu steuern, nicht mehr gerecht zu werden.

Die bisher genannten durch Chinin oder Chinidin ausgelösten unerwünschten Wirkungen waren sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen voll reversibel. Irreversible unerwünschte Wirkungen nach Chinin- oder Chinidin-Gabe finden sich in der Literatur nur selten. Dyson beschreibt einen Fall von irreversiblen Sehverlust nach Chininintoxikation (Dyson et al., 1985). Überzeugende Hinweise auf die möglichen Ursachen irreversibler Störungen liefern Hawkins und Smith, die in zwei Studien zeigen konnten, dass Chinin an Gefäßen der Stria vascularis Verengungen und Verminderungen der Anzahl an Erythrozyten bewirkte (Hawkins et al., 1972; Smith et al., 1985). Diese Studien lassen eine irreversible Schädigung von Zellen der Stria vascularis möglich erscheinen (Kochar et al., 1995; Phillips et al., 1986). Irreversible Schädigungen der Mitochondrienfunktion nach hohen Dosen von Chinin weisen ebenso auf einen möglichen Schädigungsmechanismus hin (Bachmann und Bickel, 1985; Hiott und Howell, 1971).

Das Spektrum der weniger häufigen unerwünschten Wirkungen umfasst Hautveränderungen (Bruce und Wolf, 1985), Blutbildveränderungen (Barrett et al., 1983; Gottschall et al., 1994; Moss, 1980), hypotensive Krisen (Mariano et al., 1992), rheumatische Erkrankungen (Alloway und Salata, 1995; Bird et al., 1995; West et al., 1984), Pneumonitis (Poukkula und Paakko, 1994), Hepatotoxizität (Guharoy et al., 1991; Katz et al., 1983) und Ösophagusstrikturen (Bonavina et al., 1987; Bott et al., 1987).

## 2 Fragestellung

Zu den unerwünschten Wirkungen der Einnahme von Chinidin und Chinin zählt auch Schwindel (Brandt, 1999; Brandt et al., 2004). Der Entstehungsmechanismus dieses Schwindels ist bislang nicht genau bekannt. Vom cochleären System weiß man, dass es bei Chinin-Einnahme zu objektivierbaren Hörminderungen und Veränderungen der otoakustischen Emissionen kommen kann, was auf eine direkte Beteiligung der äußeren cochleären Haarzellen schließen lässt (Alvan et al., 1991; Jung et al., 1993; Karlsson et al., 1991a; Schonwald und Shannon, 1991). Auf der Basis dieser Befunde befasst sich der erste Teil der vorgelegten Arbeit mit der Wirkung von Chinidin auf das periphere vestibuläre System: Mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik wird der Einfluss von Chinidin auf die Kaliumströme isolierter vestibulärer Haarzellen analysiert. Vestibuläre Haarzellen werden mittels der *Patch-Clamp*-Technik zunächst elektrophysiologisch näher klassifiziert. Dann wird die Wirkung von Chinidin auf diese Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

In den Studien von Hawkins und Smith (Hawkins et al., 1972; Smith et al., 1985) zeigte sich eine Verengung von retinalen Gefäßen und Gefäßen der Stria vascularis. Im Gegensatz dazu gibt es Publikationen, die von einer peripheren Gefäßerweiterung berichten (Davidson et al., 1989; Mariano et al., 1992). Die bisher bekannten Befunde lassen vermuten, dass Chinin und Chinidin an extra- und intrakraniellen Gefäßen unterschiedliche Wirkungen zeigen könnten. Um den Einfluss von Chinidin auf den Durchmesser intrakranieller Gefäße zu analysieren, wird in einem zweiten Ansatz mittels der sog. Kranielle-Fenster-Methode (Haberl, 1993) der Einfluss von Chinidin auf den Durchmesser pialer Arterien untersucht. Diese Methode erlaubt die direkte Beobachtung pialer Gefäße über ein in die Kalotte eingebrachtes Fenster und die gleichzeitige lokale Applikation von Testsubstanzen.

Es sollen die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie verändern sich die elektrophysiologischen Eigenschaften isolierter vestibulärer Haarzellen nach Applikation von Chinidin ?

Gibt es eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Effekte ?

Sind diese Effekte reversibel ?

In dazu notwendigen umfangreichen Voruntersuchungen werden die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des dominanten Kalium-Kanals der vestibulären Haarzellen untersucht.

2. Wie beeinflusst Chinidin bei lokaler Applikation den Durchmesser pialer Arteriolen ?

Gibt es eine Konzentrationsabhängigkeit?

Sind auch diese Effekte reversibel?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterial**

Analog-Digital-Wandler DigiData 1200, Samplingrate 330 kHz, Axon Instruments, USA

Blutgasmessgerät „940“, AVL GmbH, Bad Homburg

Borosilikat-Glaskapillaren GC 150 TF-10, Clark Elektromedical Instruments, Großbritannien

Faradaykäfig, Quasthoff, Pforzheim

Glaselektrodenziehgerät DMZ-Universal-Puller, Zeitz, Augsburg

Harvard small animal respirator, Harvard Apparatus Inc., USA

Infrarot CO<sub>2</sub> Analysator, Heyer, Bad Ems

Interaktives digitales Bildanalysegerät, Stemmer Elektronik, Puchheim

Invertiertes Mikroskop Zeiss Axiovert 135, Carl Zeiss, Göttingen

Kompressor, Condor MDR 2, USA

Lichtquelle Leica KL 1500 Elektronik, Leica Mikrosysteme, Bensheim

Mikrofilter 0,2 µm, Renner GmbH, Dannstadt

Mikromanipulator WR-5, Narishige International, Tokyo

Mikroskop Leica Wild M3C, Leica Mikrosysteme, Bensheim

Oszilloskop HM 205, HAMEG GmbH, Frankfurt

Patch-Clamp-Software Clampex, Version 6.0.1, Axon Instruments, USA

Petrischalen Ø 35 Millimeter, Greiner Labortechnik GmbH, Solingen

Pipetten-Polier-Vorrichtung, Narishige, Tokyo

Pneumatisch gefederter Tisch, Technical Manufacturing Corporation, USA

Programm Clampfit Version 6.0.1, Axon Instruments, USA

Programm STATISTIKA Version 5.1, StatSoft Inc., Tulsa, USA

Programme ORIGIN, ORIGIN p-Clamp Modul Version 3.5, MicroCal Software Inc., USA

Satham P23 ID Druckwandler, Astro-Med GmbH, Rodgau

Verstärker Axopatch 200A, Axon Instruments, USA

### 3.1.2 Chemische Substanzen

**Tabelle 2.1**

Substanz (Abkürzung)	Chemische Bezeichnung	Bezogen von Firma
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat	Sigma, Darmstadt
BSA	Rinderserumalbumin	Sigma, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Deisenhofen
CsCl	Cäsiumchlorid	Merck, Deisenhofen
EGTA	Ethylenglycol-bis(Oxyethylenitril)-Tetraessigsäure	Sigma, Darmstadt
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)	Merck, Deisenhofen
KOH	Kalilauge	Merck, Deisenhofen
K-Gluc.	Kaliumgluconat	Merck, Deisenhofen
L 15	Leibowitz's L 15-Kulturmedium, Zusammensetzung s. Tab 2.2	GIBCO Inc. USA
L-Cystein	L-Cystein	Merck, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Deisenhofen
NaOH	Natronlauge	Merck, Deisenhofen
Papain	Papain	Sigma, Darmstadt
Protease	Protease XXVII	Sigma, Darmstadt
Chinidin	Quinidin	Sigma, Darmstadt
HCl	Salzsäure	Merck, Deisenhofen
Sylgard®	Silikonpolymer plus Härter	Dow Corning, USA
TEA	Tetraethylammonium	Sigma, Darmstadt
Trapanal®	Thiopental-Natrium	BYK-Gulden, Konstanz
4-AP	4-Aminopyridin	Sigma, Darmstadt

### 3.1.3 Zusammensetzung der Lösungen für die *Patch-clamp* und Krianielle-Fenster-Technik Versuche

#### Präparationslösungen

Im folgenden werden alle zur Präparation verwendeten Lösungen aufgelistet. Stammlösung ist Leibovitz's L15-Zellkulturmedium (L15-Zellmedium), die chemischen Substanzen werden in angegebener Konzentration zugegeben.

**Tabelle 2.2**

Leibovitz's L15-Zellmedium

Elektrolyte	CaCl <sub>2</sub>	KCl	KH <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	MgCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl	Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>Konzentration</b>	1,26 mM	5,36 mM	0,44 mM	0,94 mM	0,81 mM	136,9 mM	1,07 mM

Dazu kommen Aminosäuren, genaue Zusammensetzung der L 15-Lösung siehe Leibovitz (Leibovitz, 1963)

**Tabelle 2.3**

Lösung für Makroskopische Präparation: "Hoch-Calcium"-Lösung, Herstellung in L15-Lösung

HEPES	CaCl <sub>2</sub>	pH
5 mM	1 mM	7,35

HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)

pH eingestellt mit NaOH

**Tabelle 2.4**

Lösungen für enzymatische Präparation; Herstellung in L15-Lösung

Lösung mit:	HEPES	EGTA	CaCl <sub>2</sub>	Protease	Papain	L-Cystein	BSA	pH
<b>Protease</b>	5 mM	1,1 mM	1,26 mM	0,3 mM	-	-	-	7,35
<b>Pap./L-Cys.</b>	5 mM	1,1 mM	1,26 mM	-	5 mM	2,5 mM	-	7,35
<b>BSA</b>	5 mM	1,1 mM	1,26 mM	-	-	-	8 mM	7,35

EGTA = Ethylenglycol-bis(Oxyethylenitril)-Tetraessigsäure; BSA = Rinderserumalbumin; HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-(Ethan-Sulfonsäure)

pH eingestellt mit NaOH

## Pipettenlösungen und Perfusionslösungen für *Patch-clamp* Versuche

**Tabelle 2.5**

Pipettenlösung I, verwendet für Ableitungen im *Cell-Attached*-Modus  
 Pipettenlösung II, verwendet für Ganz-Zell-Ableitungen

Lösung	KCL	K-Gluc.	MgCl <sub>2</sub>	EGTA	HEPES	CaCl <sub>2</sub>	ATP	Glucose	pH
<b>PIP I</b>	-	145 mM	1,2 mM	1 mM	5 mM	0,3 µM	-	-	7,2
<b>PIP II</b>	140 mM	-	2 mM	1 mM	10 mM	0,3 µM	5 mM	10 mM	7,2

Angesetzt in Aqua destillata; EGTA = Ethylenglycol-bis(Oxyethylenitril)-Tetraessigsäure;  
 HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)

pH eingestellt mit KOH

**Tabelle 2.6**

Perfusionslösungen, verwendet im *Cell-Attached*-Modus

Lösung	K-Gluc.	MgCl <sub>2</sub>	EGTA	HEPES	CaCl <sub>2</sub>	Glucose	Chinidin	pH
<b>Standard</b>	145 mM	1,2 mM	1 mM	5 mM	0,3 µM	10 mM	-	7,2
<b>Chinidin</b>	145 mM	1,2 mM	1 mM	5 mM	0,3 µM	10 mM	0,1 bis 10 mM	7,2

EGTA = Ethylenglycol-bis(Oxyethylenitril)-Tetraessigsäure; HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-  
 Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)

pH eingestellt mit KOH



**Tabelle 2.7**

Perfusionslösungen, verwendet für Ganz-Zell-Ableitungen

Lösung	CaCl <sub>2</sub>	HEPES	TEA	CsCl	4-AP	Chinidin	pH
Hoch-Calcium II	1 mM	5 mM	-	-	-	-	7,35
TEA	1 mM	5 mM	10 mM	-	-	-	7,35
CsCl	1 mM	5 mM	-	5 mM	-	-	7,35
4-AP	1 mM	5 mM	-		5 mM	-	7,35
Chinidin	1 mM	5 mM	-	-	-	0,01 bis 10mM	7,35

HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure); TEA = Tetraethylammonium; 4-AP = 4-Aminopyridin

pH eingestellt mit NaOH

### Lösungen für die Versuche mit der Kranielle-Fenster-Technik

**Tabelle 2.8**

Künstlicher Liquor und Testlösungen

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Cl <sup>-</sup>	Harnstoff	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Glucose
<b>Konzentration</b>	153 mM	3 mM	1.5 mM	0.6 mM	140 mM	6 mM	25 mM	3.7 mM

Für die Testlösungen wurde Chinidin zu einer Endkonzentration von 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup> mM zugesetzt.

## 3.2 Ableitungen an vestibulären Haarzellen mittels *Patch-Clamp*-Technik

### 3.2.1 Präparation der Cristae ampullares und der vestibulären Haarzellen

Für die Präparation der vestibulären Haarzellen wurden pigmentierte Ratten des Stammes Brown Norway verwandt. Das Alter der Tiere lag zwischen 10 und 20 Tagen. Innerhalb dieser Entwicklungsstufe zeigen die präparierten Haarzellen zum einen eine Stabilität, die der von Haarzellen älterer Tiere deutlich überlegen ist, zum anderen sind in diesem Alter die elektrischen Eigenschaften der Zellen ausreichend differenziert (Rüsch und Eatock, 1994).

Durch eine intraperitoneale Thiopental-Natrium-Narkose (10 mg pro 100 g Körpergewicht) wurden die Tiere betäubt, anschließend dekapitiert und die Felsenbeine herauspräpariert. Die Präparation der Cristae ampullares erfolgte in Leibovitz's L15-Kulturmedium (Zusammensetzung s. Tab. 2.2) unter Zugabe von 5 mMol/l des Puffers N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-*(2-Ethan-Sulfonsäure)* (HEPES) und 1 mMol/l Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) bei einem pH von 7,35 (7,20-7,49), einer Temperatur von ca. 4°C und Begasung mit 100% Sauerstoff. Aus den Ossa temporalia konnte unter dem Leica-Mikroskop das pigmentierte, häutige Labyrinth mit den Cristae ampullares der Bogengänge entnommen werden. Die Membran über den Cristae ampullares wurde geöffnet, um die anschließende enzymatische und mikroskopische Dissoziation zu erleichtern.

Die Cristae ampullares wurden für die enzymatische Dissoziation der vestibulären Haarzellen in Lösungen aus L15-Zellmedium mit niedriger Calcium-Konzentration ( $3 \times 10^{-4}$  mM; Einstellung mit Hilfe des Calcium-Komplexbildners Ethylenglycol-bis[Oxyethylenitril]-Tetraessigsäure) und verschiedenen Enzymen bei 37°C inkubiert. Begonnen wurde mit einer Protease-Lösung (0,3 mM  $\hat{=}$  8-10 Units pro mg, Inkubationszeit 10 min), gefolgt von einer Papain-Lösung (5 mM  $\hat{=}$  1,7 Units pro mg) plus L-Cystein (2,5 mM  $\hat{=}$  3-5 Units pro mg, Inkubationszeit 40 min). Die enzymatischen Reaktionen wurden gestoppt, indem die Ampullen bis zur mechanischen Dissoziation in einer L15-Lösung mit Rinderserumalbumin im Überschuss (8 mM) bei 4°C gelagert wurden.

Die mechanische Dissoziation fand jeweils an einer Ampulle direkt vor den Messungen in „Hoch-Calcium“-Lösung (s. Tab. 2.3) statt. Dazu wurde die Ampulle in einer Petrischale mit einem speziellen Einsatz gelagert, der die spätere Perfusion der Zellen mit verschiedenen

Lösungen ermöglichte. Unter dem Präparationsmikroskop wurden zunächst die Reste des häutigen Labyrinths entfernt. Mit Hilfe einer feinen, in einen mikrochirurgischen Nadelhalter eingespannten menschlichen Wimper war es nun möglich, die vestibulären Haarzellen durch vorsichtiges Streichen über die Cupula aus ihrem Verband zu lösen. Nicht sofort benötigte Ampullen wurden bei 4°C in L15-Lösung gelagert, wodurch stabile elektrophysiologische Ableitungen bis zu 8 Stunden nach der Präparation möglich waren.

### **3.2.2 Patch-Clamp-Messmethoden**

Die Messungen an isolierten vestibulären Haarzellen wurden mit Hilfe der von Neher, Sakmann und Mitarbeitern entwickelten Patch-Clamp-Technik durchgeführt (Hamill et al., 1981; Neher et al., 1978).

#### **3.2.2.1 Glaselektrodenherstellung und Messanordnung**

Die *Patch*-Elektroden wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren einzeln jeweils direkt vor den Messungen hergestellt. Für das Ausziehen der Pipettenspitze wurde ein programmierbares Glaselektrodenziehgerät verwendet. Das Gerät ließ sich so programmieren, dass wir durch Wahl von Schmelztemperatur und Zugkraft Pipetten mit einem Elektrodenwiderstand von 1-3 M $\Omega$  für die Ganzzelleableitungen und 3-5 M $\Omega$  für die *Cell-Attached*-Ableitungen erhielten (gemessen in symmetrischen, i.e. in Bad- und Pipettenlösung identischen 145 mM KCl-Lösungen). Im Anschluss an den Zieh-Vorgang wurden die Pipetten mittels einer besonderen Pipetten-Polier-Vorrichtung „feuerpoliert“, das heißt, die Spitze der Pipette wurde über einem feinen glühenden Platindraht so erhitzt, dass die während des Ziehvorganges abgerissene Pipettenspitze einen abgerundeten Rand erhielt. Mit den so behandelten Pipetten ließ sich ein sog. *Giga-Seal* (i.e. zwischen Pipetten- und Badlösung besteht ein elektrischer Widerstand im Gigaohm-Bereich) erreichen, die Voraussetzung für die späteren Messungen.

Ganz-Zell-Messungen ließen sich ohne weitere Bearbeitung der Pipetten durchführen. Für Ableitungen im *Cell-Attached-Patch* wurde der Hals der Pipettenspitze vor dem Feuerpolieren „sylgardisiert“, also mit einem Silikonpolymer (Sylgard<sup>®</sup> plus Härter) beschichtet und mit Hilfe der Poliereinrichtung gehärtet. Dies war notwendig, um die bei diesen Ableitungen

störenden kapazitiven Ströme zu vermindern und das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Eine ausführliche Anleitung zur Herstellung und Verwendung von *Patch*-Pipetten findet sich bei Corey und Stevens (Corey und Stevens, 1983).

Die Potenzialänderungen innerhalb der Pipette wurden durch den Verstärker Axopatch 200A über einen chlorierten Silberdraht an den Elektrolyten im Inneren der Pipette vermittelt.

Die Experimente wurden in Petrischalen auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskops durchgeführt. Die Versuchsanordnung mit Pipette und Mikroskop war während der Versuche auf einem durch einen Kompressor pneumatisch gefederten Tisch gelagert, um die notwendige Erschütterungsfreiheit zu gewährleisten. Elektromagnetische Störungen wurden durch einen Faradaykäfig um das Mikroskop reduziert.

Für die Applikation der verschiedenen Pharmaka und zum Austausch der Badlösung wurde ein selbsthergestelltes, in die Petrischalen einzupassendes Perfusionssystem verwendet. Dadurch war die sequentielle oder parallele Applikation von bis zu acht Pharmaka und die kontinuierliche Perfusion des Bades möglich (Badvolumen 0,3 ml, Austauschzeit 10 Sekunden). Bad- und Pipettenlösungen wurden durch einen 0,2 µm-Mikrofilter gereinigt.

Die für die Ganz-Zell und Multi-Kanal-Ableitungen verwendeten Pulsprotokolle wurden innerhalb der Arbeitsgruppe selbst erstellt. Dazu wurde *Patch-Clamp*-Software „Clampex“ von Axon Instruments verwendet. Die Protokolle wurden von dem Verstärker generiert. Die Verbindung zwischen Verstärker und Computer sowie die Digitalisierung der Daten erfolgte über einen Analog-Digital-Wandler. Während der Versuche wurden die Strom- und Spannungsspannen auch analog auf einem Oszilloskop dargestellt. Die Überwachung des Andock- (*Seal*-) und Durchbruchvorgangs auf elektrophysiologischer Ebene erfolgte über dieses Oszilloskop. Spannungsmessfehler durch Stromfluss über den Serienwiderstand der Zellmembran wurden mit dem Verstärker durch Addition eines Korrektursignals zum Haltepotenzial zu mindestens 85% ausgeglichen (Hamill et al., 1981). Über den Verstärker war eine Kompensation kapazitiver Transienten möglich.

Die Auswertung der Ganz-Zell- und der Multi-Kanal-Ableitungen geschah mit Hilfe des Programmes „Clampfit“. Die Herstellung der Abbildungen erfolgte in den Grafik-Programmen „ORIGIN“ und „ORIGIN p-Clamp Modul“.

### 3.2.2.2 Ganz-Zell-Ableitungen

Nachdem die vestibulären Haarzellen in der oben beschriebenen Weise präpariert und weiterhin in L15-Lösung gelagert wurden, konnte unter optischer Kontrolle mittels eines invertierten Mikroskops eine morphologisch intakt wirkende Zelle ausgewählt werden. An diese wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators eine mit Pipettenlösung II (s. Tab. 2.5) gefüllte und der beschriebenen Weise vorbereitete *Patch*-Pipette herangeführt. Nun ließ sich über eine Spritze, die über ein Schlauchsystem mit dem Pipettenlumen in Verbindung stand, ein leichter, gut dosierbarer Unterdruck an der Pipettenspitze herstellen. So wurde Kontakt zu der Zelle hergestellt. Durch weiteres leichtes Ansaugen konnte zunächst ein sogenannter *Giga-Seal* erreicht werden ( $\approx 10 \text{ G}\Omega$ , s. 3.2.2.1). Diese Formation entsprach der *Cell-Attached*-Konfiguration.

Weiteres Ansaugen führte nun zum Einreißen des kleinen Membranfleckes unter der Pipettenspitze. Dadurch wurde eine direkte Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem Pipetteninneren etabliert, dies entspricht der sogenannten Ganz-Zell-Konfiguration. In dieser Konfiguration kommt es zum schnellen Ionen-Austausch des Cytosols mit der Pipettenlösung (Pusch und Neher, 1988). Der Durchbruch ließ sich einfach durch Beobachtung des Widerstandes bzw. des Stromes über die Pipettenspitze verfolgen.

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten in der sogenannten Spannungsklemme (*Voltage Clamp*). Hierbei wurden die zur Aufrechterhaltung eines vorgegebenen Potentials benötigten Ströme gemessen, die im Pico- bis Nanoamperebereich lagen. Es ließ sich damit unabhängig vom Ruhepotential der Zelle ein Haltepotential vorgeben. Durch Elektrodenvermittelte Spannungsänderungen war es möglich, die Zelle zu hyperpolarisieren bzw. zu depolarisieren. Über die Versuchsanordnung war somit eine direkte Kontrolle des Membranpotentials möglich.

### 3.2.2.3 Multi-Kanal-Ableitungen

Im *Cell-Attached* Modus ist es möglich, Ionenströme eines kleinen Membranfleckens direkt unter der Pipettenspitze (*Patch*) zu messen. Die Anzahl der auf diesem Membranfleck gelegenen Ionenkanäle ist variabel, so dass in der *Cell-Attached*-Konfiguration entweder

Einzelkanal- oder Multikanalableitungen gemessen werden können (Ascher und Erulkar, 1983). Dieser Messaufbau eignet sich gut zur Untersuchung weniger Kanäle und bietet zusätzlich den Vorteil, dass das Zytosol intakt bleibt, d.h. es findet im Gegensatz zu den Ganzzell-Ableitungen kein Austausch zwischen Pipettenlösung und Cytosol statt.

Ziel der Untersuchungen in der *Cell-Attached*-Konfiguration war es, die Aktivierung des Kaliumstroms durch die Zellmembran durch einen angelegten Spannungsgradienten zu beobachten und aus den so gewonnenen Messdaten das halbmaximale Aktivierungspotenzial zu bestimmen. Ebenso sollte der Einfluss von Chinidin auf den Verlauf der Aktivierungskurve festgestellt werden.

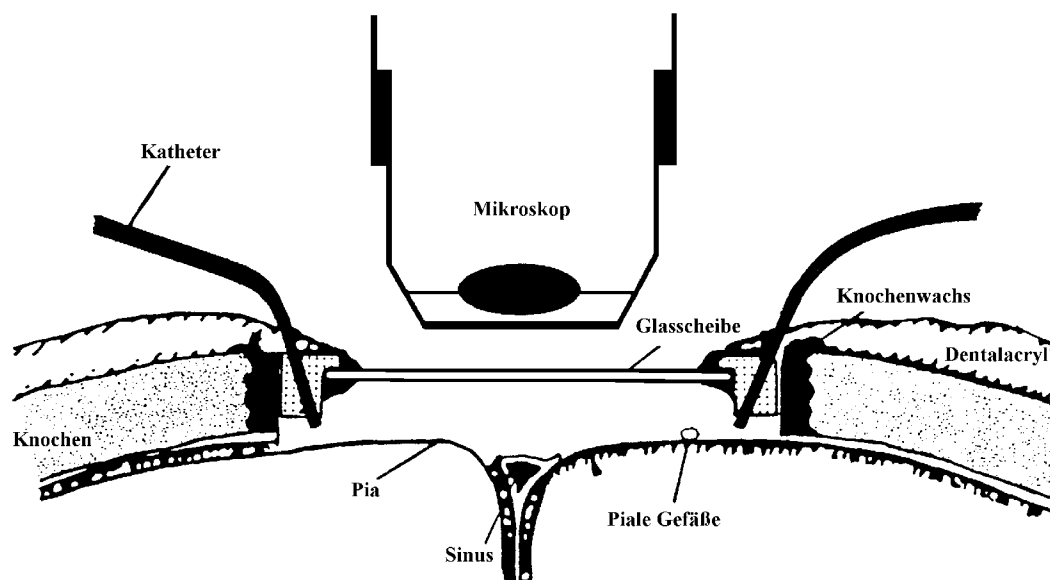
Die *Cell-Attached*-Ableitungen wurden in symmetrischen Kalium-Gluconat-Lösungen (145 mM, s. Pipettenlösung II und Perfusionslösungen, Tabellen 2.5 und 2.6) vorgenommen, d.h. Pipetten- und Bad-Lösung waren identisch. Dadurch wurde erreicht, dass die Elektromotorische-Kraft (EMK) bei einem Haltepotenzial  $V_H = 0$  mV über dem Membranstück gleich Null war.

Über die Elektrode war es nun möglich, von außen definierte Membranpotenziale anzulegen. Dies musste im Gegensatz zu den Ableitungen im Ganz-Zell-Modus mit umgekehrten Vorzeichen vorgenommen werden, um eine der physiologischen Richtung entsprechenden Gradienten der EMK zu schaffen. Um z.B. ein Membranpotenzial von -60 mV zu simulieren, wurden hierbei von außen +60 mV Spannung angelegt.

Die Aktivierung der Ionenkanäle wurde mit Hilfe eines rampenförmigen Pulsprotokolls gemessen: Hierzu wurde nach einem Sprung auf -160 mV die Spannung kontinuierlich innerhalb von 5 Sekunden auf +40 mV angehoben und so eine kontinuierlich zunehmende Depolarisation der Zellmembran simuliert. Neben dem Aktivierungspotenzial ließen sich gleichzeitig auch Änderungen des Stromes über diesen *Patch* beobachten.

### 3.3 Kranielle-Fenster-Methode

Die Untersuchungen an pialen Gefäßen der Ratte wurden mit Hilfe der Krania-Fenster-Methode vorgenommen (s. Abb. 1). Diese Methode erlaubt es, Veränderungen des Durchmessers pialer Gefäße direkt zu beobachten und zur späteren Auswertung aufzuzeichnen. Genaue Beschreibungen dieser Methoden finden sich bei Levasseur und Haberl (Levasseur et al., 1975; Haberl et al., 1990).



**Abbildung 1:** Schema des Versuchsaufbaus der Krania-Fenster-Methode

### 3.3.1 Präparation des kraniellen Fensters und Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten in einem Alter von acht bis zehn Wochen mit einem Gewicht zwischen 270 und 360 g verwendet. Die Narkose der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Thiopental-Natrium in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht. Dadurch war eine schnell eintretende, lang wirksame Narkose gewährleistet. Während der jeweils ca. 6 Stunden dauernden Versuche war nie mehr als eine zusätzliche Dosis des Betäubungsmittels nötig. Zur kontrollierten Beatmung wurde eine Tracheotomie angelegt, über die die Tiere durch einem Respirator mit Raumluft und zusätzlichem Sauerstoff versorgt werden konnten. Die Messung des endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Partialdrucks erfolgte kontinuierlich durch einen Infrarot-CO<sub>2</sub>-Analysator. So wurde die endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration durch Nachstellen von Beatmungsfrequenz und -volumen über den Messzeitraum bei 35 mmHg gehalten. Den Tieren wurde ein Katheter in die linke A. femoralis implantiert. Über diesen konnten sowohl kontinuierlich der arterielle Blutdruck gemessen als auch regelmäßige Kontrollen der arteriellen Blutgase vorgenommen werden. Die Kontrollen der arteriellen Blutgase erfolgte an Blutproben von 0,1 ml Volumen in einem AVL 940 Blutgasmessgerät. Einer Dehydratation der Tiere während der Versuche wurde durch Infusion einer Kochsalzlösung (0,1 ml/h) über einen in die linke V. femoralis applizierten Katheter vorgebeugt. Die rektale Temperatur der Ratten wurde durch ein Heizkissen konstant bei 37°C gehalten.

Für die Implantation des kraniellen Fensters wurde eine Kraniotomie von 5 mm Durchmesser im mittleren Anteil des rechten Os parietale vorgenommen. Um die Kraniotomie wurde der Schädelknochen mit Dentalacryl abgedeckt. Vorsichtig, unter Schonung der Duragefäße, wurde die Dura mater abgezogen. Verletzungen der Duragefäße führten zum Ausschluss der Tiere. Wegen der mögliche Hitzeschädigung der Hirnoberfläche wurde auf eine Thermokoagulation verzichtet. Das kranielle Fenster, ein Stahlring mit drei Öffnungen und einer eingelassenen Glasscheibe, konnte nun über den exponierten pialen Gefäßen eingepasst und mit Knochenwachs und Dentalacryl befestigt werden. Zwei der Öffnungen dienten als Zu- bzw. Abfluss aus dem Raum unter dem Fenster. Über die dritte Öffnung fand mit einem Statham P23 ID Druckwandler eine kontinuierliche Messung des intrakraniellen Druckes statt. Der Polyethylenkatheter an der Auslassöffnung des Fensters wurde dabei in einer bestimmten Höhe plaziert, so dass ein intrakranieller Druck von ca. 3 mmHg herrschte.



Die zu- und abführenden Katheter und der Raum unter dem Fenster wurden mit künstlichen Liquor (Zusammensetzung s. Tab. 2.8) gefüllt. Der Liquor wurde mit 6.6% O<sub>2</sub>, 5.9% CO<sub>2</sub> und 87.5% N<sub>2</sub> begast und im Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Osmolarität betrug 315 mosm, der pH 7,39. Für die Messungen wurde der künstliche Liquor mit Chinidin (Konzentrationen zwischen 10<sup>-9</sup> und 10<sup>-5</sup> mM) versetzt.

### **3.3.2 Messmethode und Auswertung**

Mittels Intravitalmikroskopie wurden durch das kranielle Fenster die pialen Gefäße beobachtet. Die Beobachtung und Aufzeichnung erfolgte über ein trinokulares Mikroskop mit Vergrößerungswechsler (Leitz, München). Das zu beobachtende Feld wurde mit einer 100 W Halogenlampe und einem um das Objektiv befestigten fiberoptischen Lichtleiter beleuchtet. Zwischen Lampe und Lichtleiter war ein Hitzefilter (zur Vermeidung der Erhitzung der Hirnoberfläche) und ein Grünfilter (zur Kontrasterhöhung; 546 nm) geschaltet. Das mikroskopische Feld wurde über eine Restlicht-Videokamera auf dem Phototubus des Mikroskopes (Cohu 4720, San Diego, USA), einen Videorekorder (Panasonic AG 6200-EG) und einen Videomonitor (Barko CD 233, Kortrijk, Belgien) aufgenommen. Die Bestimmung der Durchmesser der pialen Arteriolen erfolgte im Anschluss an die Messungen anhand der Videoaufzeichnungen mit Hilfe eines interaktiven digitalen Bildanalysegerätes. Für die Auswertung in Betracht gezogen wurden Arteriolen mit einem Durchmesser zwischen 25 und 73 µm.

Die Lösungen wurden topisch auf die Hirnoberfläche appliziert, indem der Raum unter dem Fenster (Volumen 0.1 ml) mit jeweils 1 ml der entsprechenden Lösung (Liquor oder Liquor + Testsubstanz) gespült wurde. Die Testsubstanz wurde für jeden Versuchstag unmittelbar vor Versuchsbeginn in frisch begastem künstlichen Liquor gelöst. Mit der Applikation der Testlösungen (s. Tab 2.8) wurde begonnen, nachdem sich die Ruhedurchmesser der Arteriolen in einem stabilen Zustand befanden, i.e. keine Veränderung des Durchmessers mehr zeigten. In jeder Versuchsreihe wurden drei piale Arteriolen jeweils vor sowie zwei und fünf Minuten nach Applikation der Lösung gemessen. Früher als zwei Minuten nach Applikation sollte nicht gemessen werden, da innerhalb dieses Zeitraumes Artefakte durch den bei der Spülung erhöhten Hirndruck entstehen. Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten

entsprechen prozentualen Veränderungen des Gefäßdurchmessers. Die Auswertung und Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Hilfe des Programms „STATISTIKA“. Die Signifikanz der Unterschiede der Gefäßdurchmesser wurde mit dem t-test für Differenzen (gültig für abhängige Stichproben) geprüft (Clauß et al., 1995).

Die Gefahr einer Verletzung der Hirnoberfläche während der Präparation und auch der Messungen ist groß. Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch nicht erkannte Läsionen zu vermeiden, wurde als Qualitätskontrolle nach den Versuchen die Reagibilität der pialen Arteriolen auf systemische Hyperkapnie geprüft. Bei fehlender Vasodilatation wurden die Ergebnisse nicht verwertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patch-Clamp-Untersuchungen

#### 4.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung vestibulärer Haarzellen

Vor den Versuchen zu den Effekten von Chinidin erfolgte die elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung des dominierenden Kalium-Stroms vestibulärer Haarzellen  $I_{KI}$ .

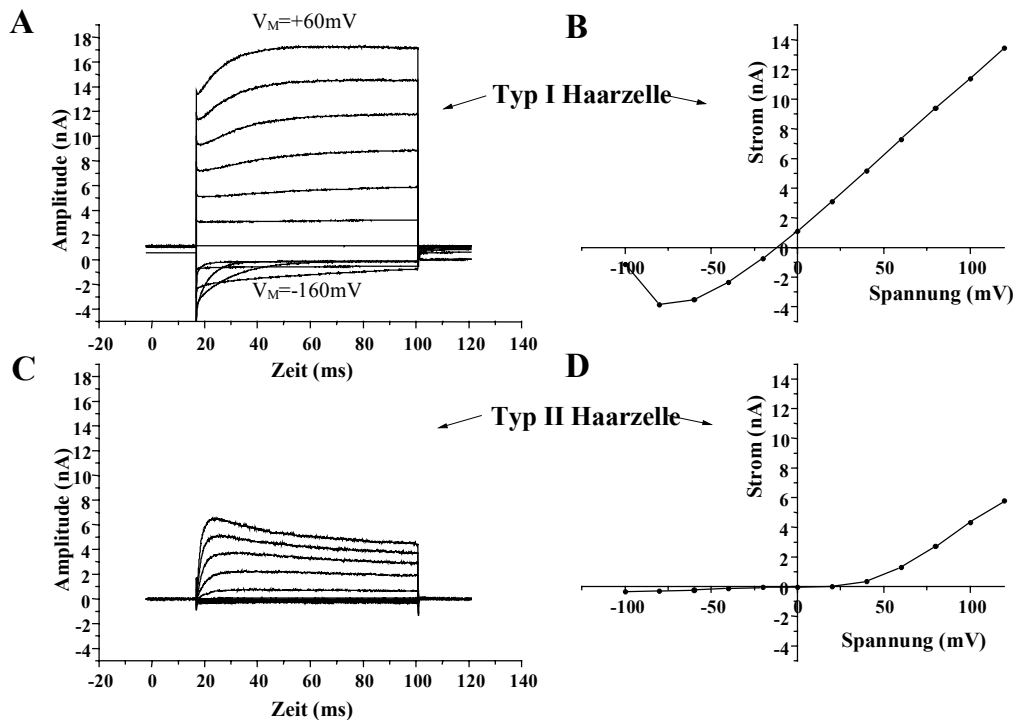
Insgesamt wurden 72 Typ I und 48 Typ II Haarzellen abgeleitet. Das durchschnittliche Membranpotenzial  $\pm$  Standardabweichung der gemessenen Typ I Haarzellen lag bei  $-74,0 \pm 5,0$  mV. Dies lag nahe an dem theoretischen Gleichgewichtspotenzial für semipermeable Membranen  $E_K$  für Kalium:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_a}{[K]_i} = -82,2 \text{ mV}$$

$[K]_i = 140$  mM;  $[K]_a = 5,36$  mM;  $R$  = Gaskonstante;  $T$  = Temperatur;  $F$  = Faraday'sche Konstante; bei  $25^\circ\text{C}$  gilt  $R \cdot T / F = 25$  mV (Hille, 1992)

Das Membranpotenzial hing also wesentlich von der Kaliumleitfähigkeit ab.

Im folgenden sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften von Typ I Haarzellen, insbesondere deren dominierender Kaliumstrom  $I_{KI}$  beschrieben werden.  $I_{KI}$  gehört zur Gruppe der sogenannten Verzögerten Gleichrichter, deren Aufgabe darin besteht, nach einem Aktionspotenzial mit einer Latenz das Ruhemembranpotenzial wiederherzustellen (Shepherd, 1993). Die Typ I Haarzellen verfügen über verschiedene Kaliumströme, vor allem den dominierenden Kaliumstrom  $I_{KI}$  und den sog. A-Strom (s. Abschnitt 4.1.2.1). In Abbildung 2 sind die Ganz-Zell-Ableitungen (Messung des Stromes zwischen Zellinnerem bzw. Pipette und Zelläußeren bzw. Badlösung in Ruhe und nach Anlegen verschiedener Spannungen zwischen Pipetten-Innerem und Badlösung) am Beispiel jeweils einer typischen Typ I und Typ II Haarzelle gezeigt. Neben den Messkurven sind die Strom-Spannungsbeziehungen jeweils 0,1 ms nach Anlegen der Spannung dargestellt.



**Abbildung 2:** Ganz-Zell-Ableitungen jeweils einer Typ I Haarzelle (A, B) und einer Typ II Haarzelle (C, D) nach einer Folge von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Potenzialschritten (Spannung  $V_M = -160$  bis  $+60$  mV; 20 mV-Schritte von 80 ms Dauer ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$ ). Für die Erstellung der Strom-Spannungs-Beziehung wird der Strom 0,1 ms nach Beginn ( $I_{\text{früh}}$ ) des Spannungspulses gemessen.

Zu Beginn des hyperpolarisierenden Spannungspulses auf  $-160$  mV war bei Typ I Haarzellen ein großer Einwärtsstrom zu beobachten ( $I_{\text{früh}}$  bis zu  $-12$  nA), der innerhalb von 10-20 ms deaktiviert wurde. Auf den depolarisierenden Spannungspuls von  $+60$  mV folgend erkennt man in Abb. 2B einen initialen Kaliumauswärtsstrom ( $I_{\text{früh}}$  bis 20 nA), der durch die Aktivität von  $I_{\text{KI}}$  bei einem Haltepotenzial  $V_H = -60$  mV bestimmt wurde.  $I_{\text{KI}}$  wurde innerhalb von 10-20 ms vollständig aktiviert (Abb. 2A). Der am Ende eines depolarisierenden Spannungspulses gemessene Strom setzte sich aus dem voll aktivierten  $I_{\text{KI}}$  sowie einer Calcium-aktivierten Kaliumleitfähigkeit (Hudspeth, 2000) zusammen, die hier nicht näher untersucht wurde, und erreichte bei einem Pulsschritt auf  $+60$  mV bis zu 20 nA, teilweise auch leicht darüber.

Das Umkehrpotenzial von  $I_{\text{KI}}$  bei Ganz-Zell-Ableitungen, bei dem kein Nettostrom fließt, lag bei  $-73,7$  mV  $\pm$  3,9 mV ( $n = 14$  Zellen). Dies lag nahe am berechneten Gleichgewichtspoten

zial für Kalium von  $-82.2$  mV. Der Unterschied lässt sich am ehesten durch eine geringe Leitfähigkeit der vestibulären Haarzellen für andere Kationen (z.B. Natriumionen) erklären.

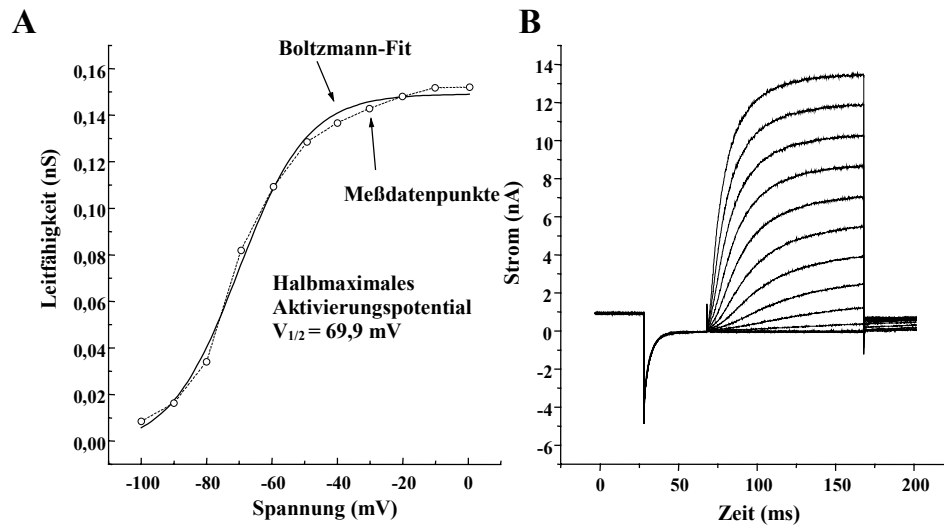
Zur Bestimmung des durchschnittlichen halbmaximalen Aktivierungspotenzials von  $I_{KI}$  wurden, um die Aktivierung des Stromes von einem definierten Niveau aus zu bestimmen, Ganz-Zell-Ableitungen nach einem hyperpolarisierenden Präpuls aufgezeichnet. Durch den hyperpolarisierenden Präpuls wurde  $I_{KI}$  deaktiviert. Die darauffolgenden Pulsprotokolle konnten somit den Strom vom Nullniveau aus aktivieren. Die Bestimmung des halbmaximalen Aktivierungspotenzials wird in Abbildung 3 exemplarisch an einer Typ I Haarzelle gezeigt. Die Spannung wurde dabei gegen die Leitfähigkeit aufgetragen. Die Leitfähigkeit  $G$  wurde nach der Formel  $G = I / U$  ( $I = 10$  ms vor Ende des Pulses gemessener Strom,  $U =$  die zur Messung dieses Stroms angelegte Spannung). Eingezeichnet sind die Messdatenpunkte und die anhand dieser Werte berechnete Aktivierungskurve. Das halbmaximale Aktivierungspotenzial liegt am Wendepunkt dieser Kurve. Das halbmaximale Aktivierungspotenzial  $V_{(h)}$  lässt sich mittels der Boltzmann-Gleichung

$$G = \frac{G_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{-(V - V_{(h)})}{V_s}\right)}$$

$G =$  Leitfähigkeit,  $G_{\max} =$  Maximale Leitfähigkeit,  $V_s =$  Steilheitsfaktor in mV,  $V =$  Membranpotenzial,  $V_{(h)} =$  halbmaximales Aktivierungspotenzial

ermitteln, es lag bei  $-66,1$  mV  $\pm$   $6,9$  mV ( $n = 22$  Zellen).

## Typ I Haarzelle



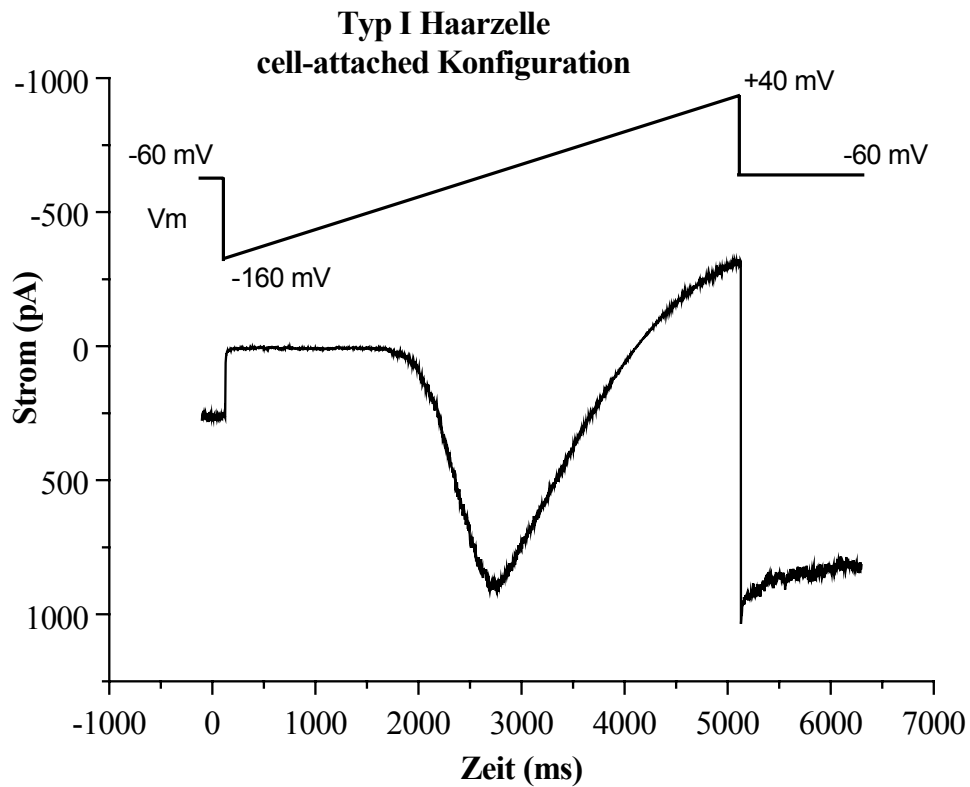
**Abbildung 3:** Graphische Darstellung der Boltzmann-Fit-Kurve (**A**) und der für die Berechnung benutzte Ganz-Zell-Ableitung (**B**) einer Typ I Haarzelle. Die Leitfähigkeit  $G$  ist in **A** gegen die Spannung  $V$  aufgetragen worden. In **B** ist der initiale Präpuls erkennbar, gefolgt von den Stromkurven bei Potentialen von  $-100$  bis  $0 \text{ mV}$ .

Boltzmann-Gleichung:

$$G = \frac{G_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{-(V - V_{(h)})}{V_s}\right)}$$

$G$  = Leitfähigkeit,  $G_{\max}$  = Maximale Leitfähigkeit,  $V_s$  = Steilheitsfaktor in  $\text{mV}$ ,  $V$  = Membranpotential,  $V_{(h)}$  = halbmaximales Aktivierungspotential

Weiterhin wurden Ableitungen im *Cell-Attached*-Modus durchgeführt. Hierbei wurden meist, abhängig von der Größe des unter der Pipettenspitze liegenden Membranstückes, zwischen 30 und 100 Kanälen dargestellt. Diese Ableitungen erfolgten an Typ I Haarzellen in symmetrischer, das heißt intra- und extrazellulär gleicher Kaliumgluconatlösung. Es wurde ein rampenförmiges Spannungsprotokoll verwendet, bei dem das Haltepotential in 5 Sekunden von  $-160 \text{ mV}$  auf  $+40 \text{ mV}$  verändert wurde. Die Abbildung 4 zeigt ein für diese Messungen typisches Protokoll. Der maximale Strom betrug  $961 \text{ pA}$ , das halbmaximale Aktivierungspotential lag bei  $-72,3 \text{ mV}$ .



**Abbildung 4:** Kaliumleitfähigkeit eines *Cell-Attached-Patch* von einer Typ I Haarzelle des vestibulären Systems. Haltepotenzial  $V_H = -60$  mV. Rampenförmiges Spannungsprotokoll mit einem Membranpotential  $V_m$  von  $-160$  bis  $+40$  mV innerhalb von 5 s. Halbmaximales Aktivierungspotenzial  $V_{1/2} = -72,3$  mV. Maximalstrom  $I_{max} = 961$  pA. Umkehrpotenzial =  $0$  mV. Gemessen in symmetrischer Kaliumgluconat-Lösung  $145$  mM.

## 4.1.2 Pharmakologische Charakterisierung des dominierenden Kaliumstromes

Ionenkanäle können auf verschiedene Arten klassifiziert werden: Erstens durch die Permeabilität für vornehmlich ein Ion oder verschiedene Ionen, zweitens durch die Kinetik der Kanäle bei verschiedenen Membranpotenzialen, drittens durch das Verhalten der Ströme durch diese Kanäle nach Applikation unterschiedlicher kanalblockender Substanzen und viertens durch die Sequenzierung der den Kanal kodierenden mRNA. In dieser Arbeit wurde der dominierende Kaliumkanal  $I_{K1}$  mit Hilfe verschiedener Pulsprotokolle bezüglich seiner Kinetik bei verschiedenen Membranpotenzialen und mittels dreier bekannter Ionenkanalblocker auf sein Verhalten bei pharmakologischer Beeinflussung untersucht. Dazu wurden 4-Aminopyridin, Tetraethylammonium und Cäsiumchlorid verwendet.

### 4.1.2.1 4-Aminopyridin

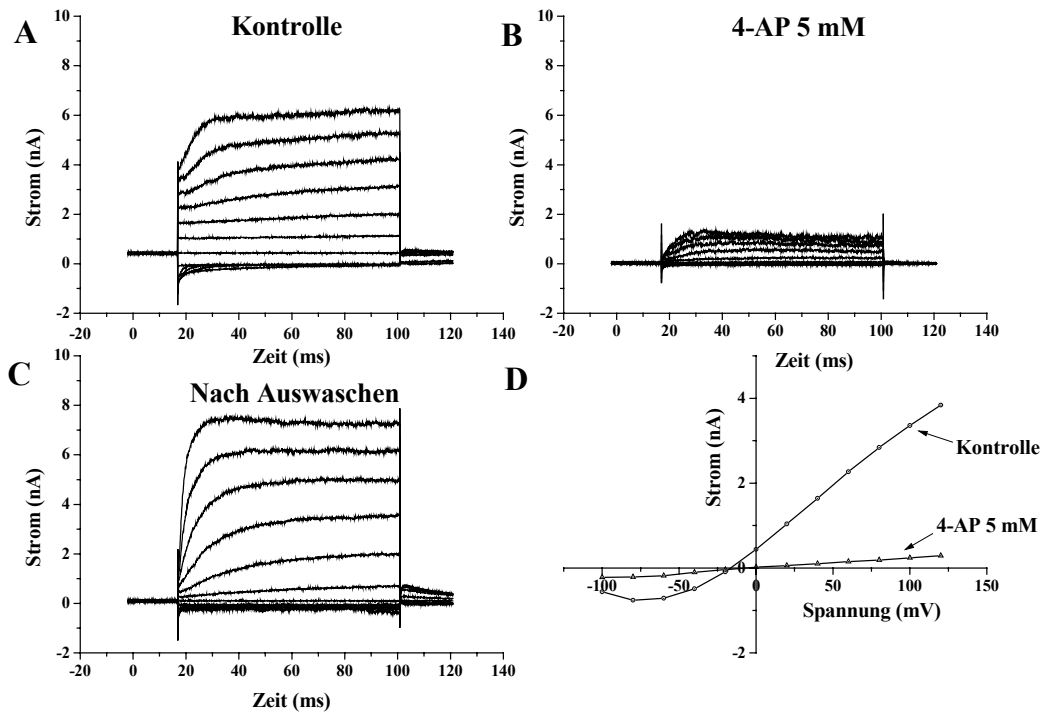
4-Aminopyridin (4-AP) ist ein lange bekannter Kaliumkanalblocker. Eine ganze Klasse an Kaliumkanälen wurde aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber 4-AP als A-Strom bezeichnet (Hagiwara et al., 1961).

Die Wirkung von 4-AP erstreckt sich allerdings nicht nur auf den A-Strom, sondern auch auf verschiedene andere Kaliumströme, unter anderem den sog. Verzögerten Gleichrichter (Shepherd, 1993). Dessen blockierende Wirkung auf cochleäre Haarzellen zeigten bereits Housley und Ashmore (Housley und Ashmore, 1992).

Wir konnten eine bis zu 90%ige Hemmung der Ströme durch 5 mM 4-AP nachweisen (Abb. 5): Bei Perfusion mit 5 mM 4-AP beträgt die Hemmung der Auswärtsströme, gemessen bei Depolarisation auf +20 mV, für  $I_{\text{früh}}$  -92% und für  $I_{\text{spät}}$  = - 83%. Die Hemmung des initialen Einwärtsstromes bei Hyperpolarisation auf -160 mV beträgt - 62%. Die hier beobachtete stärkere Hemmung der initialen Ströme wies auf eine 4-AP-insensitive, spät aktivierte Kaliumleitfähigkeit hin. Der dominierende Kaliumstrom wurde nicht ganz vollständig reversibel gehemmt.



## 4-AP 5 mM



**Abbildung 5:** Ganz-Zell-Ableitung einer Typ I Haarzelle nach einer Folge von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Potenzialschritten ( $V_M = -160$  bis  $+60$  mV; 20 mV Schritte von 80 ms Dauer, ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$  mV). Für die Berechnungen wurden die Ströme jeweils 0,1 ms nach Beginn ( $I_{\text{früh}}$ ) oder 0,1 ms vor Ende ( $I_{\text{spät}}$ ) des Spannungspulses verwendet. Die Strom-Spannungs-Beziehungen wurden aus  $I_{\text{früh}}$  ermittelt.

**A:** Kontrollmessung der Ströme = 100%

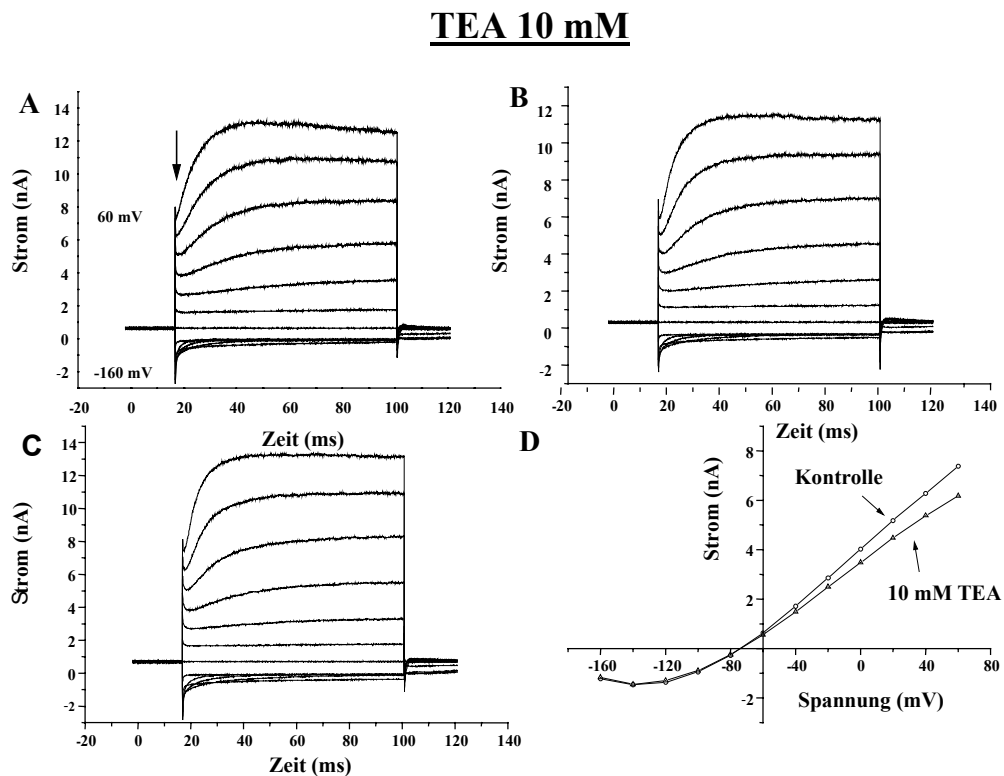
**B:** Perfusion mit 5 mM 4-AP: Die Hemmung der Auswärtsströme gemessen bei Depolarisation auf  $+20$  mV beträgt für  $I_{\text{früh}}$  -92%, für  $I_{\text{spät}}$  = -83%. Die Hemmung des initialen Einwärtsstromes bei Hyperpolarisation auf  $-160$  mV beträgt -62%.

**C:** Effekt teilweise reversibel nach Auswaschen mit Hoch-Calcium II (Tab. 2.7)

**D:** Strom-Spannungs-Beziehung von  $I_{\text{früh}}$ , Kontrolle und Perfusion mit 5 mM 4-AP

#### 4.1.2.2 Tetraethylammonium

Tetraethylammonium (TEA) blockiert sehr selektiv Kaliumkanäle. Wenn es intrazellulär appliziert wird, blockiert es im wesentlichen Kaliumkanäle vom Typ des verzögerten Gleichrichters (Hille, 1992). In Abbildung 6 wird die Hemmung der Auswärtsströme bei 20 mV durch Perfusion mit 10 mM TEA gezeigt. Sie beträgt für  $I_{\text{früh}}$  ebenso wie für  $I_{\text{spät}}$  -13 %. Diese Wirkung war voll reversibel.



**Abbildung 6:** Ganz-Zell-Ableitung einer Typ I Haarzelle nach einer Folge von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Potentialschritten ( $V_M = -160$  bis  $+60$  mV; 20 mV Schritte von 80 ms Dauer, ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$  mV). Für die Berechnungen wurden die Ströme jeweils 0,1 ms nach Beginn ( $I_{\text{früh}}$ ) oder 0,1 ms vor Ende ( $I_{\text{spät}}$ ) des Spannungspulses verwendet. Die Strom-Spannungs-Beziehungen wurden aus  $I_{\text{früh}}$  ermittelt.

**A:** Kontrollmessung, Ströme = 100%

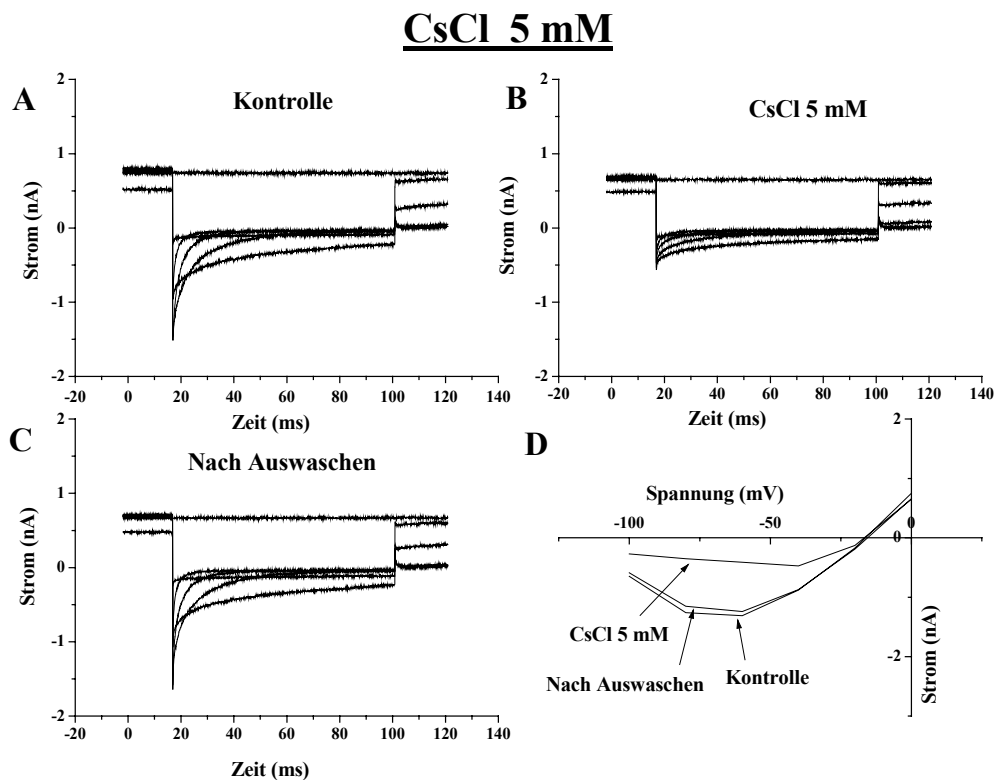
**B:** Perfusion mit 10 mM TEA: Die Hemmung der Auswärtsströme gemessen bei Depolarisation auf  $+20$  mV beträgt für  $I_{\text{früh}}$  -13 %, für  $I_{\text{spät}}$  ebenfalls -13 %.

**C:** Effekt vollständig reversibel nach Auswaschen mit Hoch-Calcium-II (s. Tab. 2.7)

**D:** Strom-Spannungs-Beziehung von  $I_{\text{früh}}$ ; Kontrolle und Perfusion mit 10 mM TEA

### 4.1.2.3 Cäsiumchlorid

Die beiden bisher verwendeten Ionenkanalmodulatoren zeigten ihre Wirkung vor allem auf die auswärtsgerichtete Komponente des Kaliumstromes. Die deaktivierenden Einwärtsströme wurden im Verhältnis geringer beeinflusst. Cäsiumchlorid blockierte vor allem die einwärts gerichtete Komponente des Stromes in reversibler Weise (Hille, 1992). Die Hemmung des initialen Einwärtsstromes bei Perfusion mit 5 mM CsCl, gemessen bei Hyperpolarisation auf  $-160$  mV, beträgt  $-57\%$  (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Ganz-Zell-Ableitung einer Typ I Haarzelle nach einer Folge von hyperpolarisierenden Potentialschritten ( $V_M = -160$  bis  $-60$  mV; 20 mV Schritte von 80 ms Dauer, ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$  mV). Für die Berechnungen wurden die Ströme jeweils 0,1 ms nach Beginn ( $I_{\text{früh}}$ ) oder 0,1 ms vor Ende ( $I_{\text{spät}}$ ) des Spannungspulses verwendet. Die Strom-Spannungs-Beziehungen wurden aus  $I_{\text{früh}}$  ermittelt.

**A:** Kontrollmessung der Ströme = 100%

**B:** Perfusion mit 5 mM CsCl: Die Hemmung des initialen Einwärtsstromes gemessen bei Hyperpolarisation auf  $-160$  mV beträgt  $-57\%$ .

**C:** Effekt teilweise reversibel nach Auswaschen mit Hoch-Calcium-II (s. Tab.2.7)

**D:** Strom-Spannungs-Beziehung (von  $I_{\text{früh}}$ ); Kontrolle und Perfusion mit 5 mM CsCl

Die pharmakologischen Versuche an vestibulären Typ I Haarzellen haben Folgendes gezeigt:

- 4-Aminopyridin bewirkt eine deutliche Blockierung sowohl des Einwärts- als auch des Auswärtsstromes.
- Tetraethylammonium bewirkt eine geringe Verminderung des Auswärtsstromes.
- Cäsiumchlorid bewirkt eine deutliche Blockierung des Einwärtsstromes.

### 4.1.3 Der Einfluss von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen

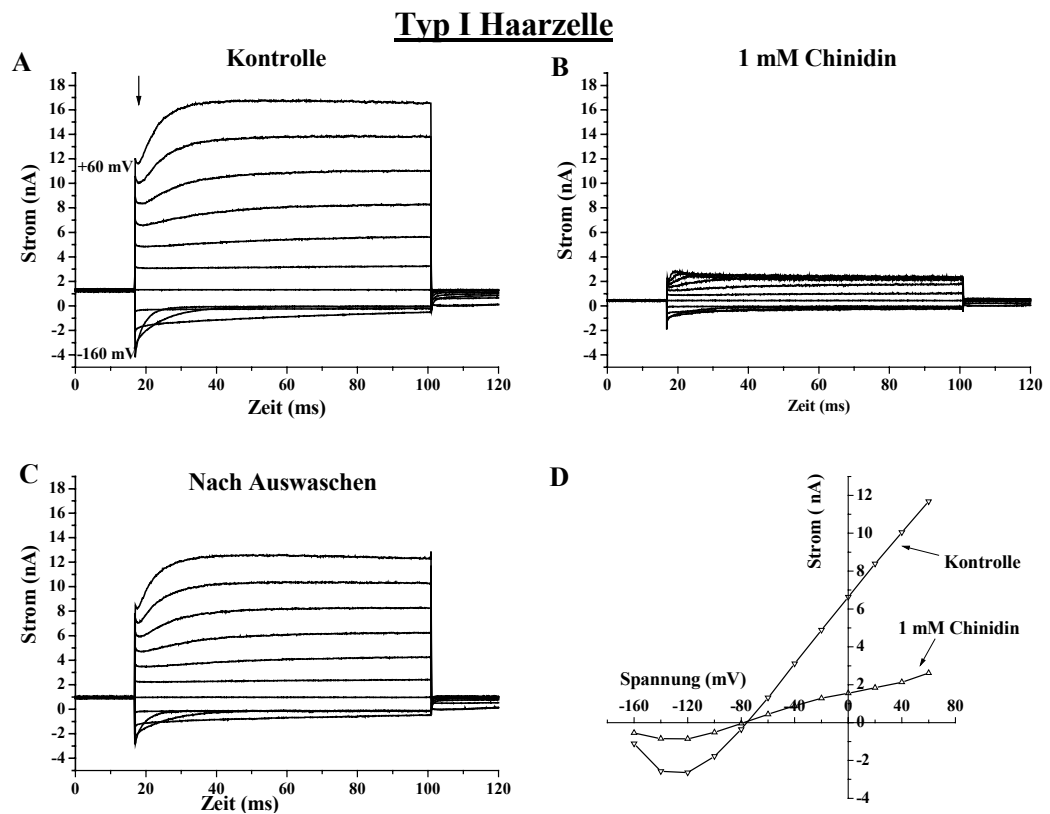
Um die Wirkung von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen zu untersuchen, wurden zum einen Ganz-Zell-Ableitungen an Typ I und Typ II Haarzellen in Konzentrationen von 0,01 bis 10 mM Chinidin vorgenommen (Perfusionslösung s. Tab. 2.7, Pipettenlösung PIP II s. Tab.2.5). Zum anderen erfolgten Ableitungen an Typ I Haarzellen im *Cell-Attached*-Modus mit 1 mM Chinidin (Perfusionslösung s. Tab. 2.6, Pipettenlösung PIP I s. Tab 2.5).

In den Abbildungen 8 und 9 sind typische Messungen an Ganz-Zell-Ableitungen von Typ I und Typ II Haarzellen und die Strom-Spannungs-Beziehungen vor und nach Applikation von Chinidin dargestellt.

An Typ I Haarzellen (s. Abb. 8) wurden durch Applikation von 1mM Chinidin sowohl der Einwärtsstrom als auch der Auswärtsstrom um bis zu 77% des Ausgangsniveaus (gemessen bei +40 mV Haltepotential) reduziert. Dieser Effekt war reversibel: Nach Auswaschen der Chinidin-haltigen Badlösung mit Chinidin-freier Standard-L15-Badlösung konnte das Ausgangsniveau der Einwärtsströme und Auswärtsströme nahezu vollständig wieder erreicht werden. Dies gelang auch nach mehrfacher Wiederholung dieser Schritte. In der Abbildung der Strom-Spannungsbeziehung wird die reduzierte Fähigkeit der Typ I Haarzellen, auf Änderungen des Haltepotentials mit einer Änderung der Ströme zu reagieren, deutlich. Dies ist Ausdruck einer verminderten Öffnung vor allem des dominierenden Kaliumkanals ( $I_{K1}$ ). Dies zeigt sich in der deutlichen Abflachung der Kurve nach Applikation von Chinidin.

Die Wirkungen von Chinidin an Typ II Haarzellen sind exemplarisch in Abbildung 9 gezeigt. Nach Applikation von 1mM Chinidin wird eine Reduktion des Auswärtsstromes von bis zu 82% (gemessen bei einem Haltepotential von +40 mV) erreicht. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, betrifft dies vorwiegend den Auswärtsstrom. Der bei Typ II Haarzellen ohnehin nur sehr schwach ausgeprägte Einwärtsstrom bei Hyperpolarisation wird nicht wesentlich durch Chinidin beeinflusst. Dies ist ebenfalls in der Abbildung der Strom-Spannungs-Beziehung zu erkennen: Bei Haltepotentialen von -160 mV bis -40 mV verläuft die Kurve der Kontrolle fast parallel zu der Kurve nach Applikation von 1mM Chinidin. Ab einem Potential von -20 mV ist die deutliche Abflachung der Strom-Spannungs-Kurve nach

Applikation von Chinidin als Ausdruck der starken Hemmung des dominierenden Auswärtsstromes  $I_{KI}$  zu sehen.



**Abbildung 8:** Ganz-Zell-Ableitung einer Typ I Haarzelle nach einer Folge von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Potenzialschritten ( $V_M = -160$  bis  $+60$  mV; 20 mV Schritte von 80 ms Dauer, ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$  mV). Für die Berechnungen wurden die Ströme jeweils 0,1 ms nach Beginn ( $I_{früh}$ ) oder 0,1 ms vor Ende ( $I_{spät}$ ) des Spannungspulses verwendet. Die Strom-Spannungs-Beziehungen wurden aus  $I_{früh}$  ermittelt. Der Zeitpunkt der Messung für die Strom-Spannungs-Beziehungen wird jeweils durch einen Pfeil markiert.

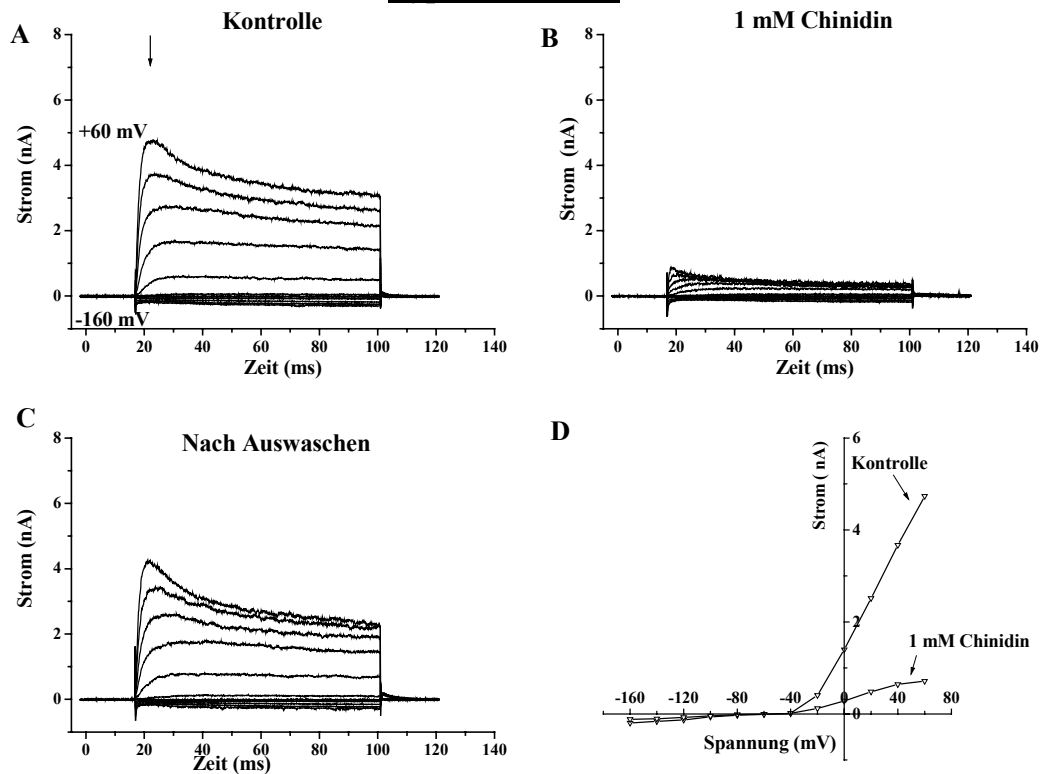
**A:** Kontrolle mit normaler Badlösung L15

**B:** Effekt von 1 mM Chinidin in L15. Reduktion von  $I_{früh}$  bei  $+40$  mV um 77%

**C:** Fast vollständig reversibel nach Auswaschen mit normaler Badlösung L15

**D:** Strom-Spannungs-Beziehung ( $I_{früh}$ ) Kontrolle und Perfusion mit 1 mM Chinidin

## Typ II Haarzelle



**Abbildung 9:** Ganz-Zell-Ableitung einer Typ II Haarzelle nach einer Folge von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Potentialschritten ( $V_M = -160$  bis  $+60$  mV; 20 mV Schritte von 80 ms Dauer, ausgehend von einem Haltepotenzial  $V_H$  von  $-60$  mV). Für die Berechnungen wurden die Ströme jeweils 0,1 ms nach Beginn ( $I_{früh}$ ) oder 0,1 ms vor Ende ( $I_{spät}$ ) des Spannungspulses verwendet. Die Strom-Spannungs-Beziehungen wurden aus  $I_{früh}$  ermittelt. Der Zeitpunkt der Messung für die Strom-Spannungs-Beziehungen wird jeweils durch einen Pfeil markiert.

**A:** Kontrolle mit normaler Badlösung L15, vor Applikation von Chinidin

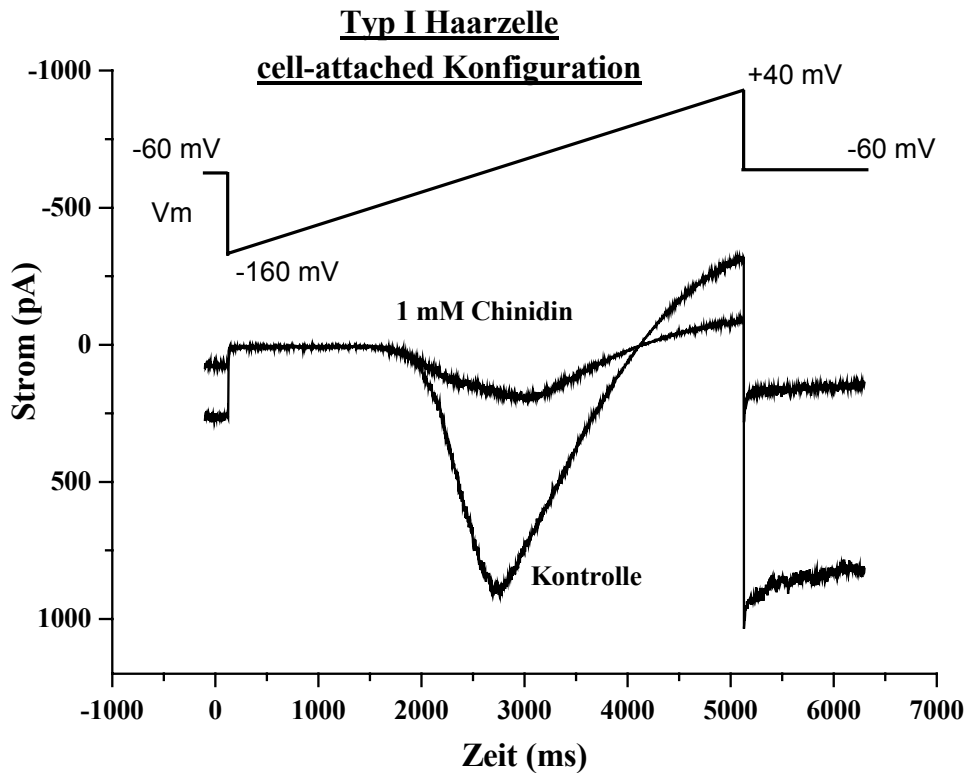
**B:** Effekt von 1 mM Chinidin, Reduktion von  $I_{früh}$  bei  $+40$  mV um 82%

**C:** Fast vollständig reversibler Effekt nach Auswaschen mit normaler Hoch-Calcium-II Lsg.

**D:** Strom-Spannungs-Beziehung ( $I_{früh}$ ) Kontrolle und Perfusion mit 1 mM Chinidin

Die Auswirkungen von 1 mM Chinidin in der Badlösung auf den dominierenden Kaliumstrom  $I_{KI}$  konnten auch im *Cell-Attached*-Modus gezeigt werden (s. Abb. 10). Dazu wurden die Zellen in symmetrischer Kalium-Gluconat-Lösung abgeleitet. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV wurde, wie bereits in Abschnitt 4.1.1 gezeigt, kontinuierlich über 5 Sekunden das Potenzial von -160 auf +40 mV verändert und der Verlauf des Stroms aufgezeichnet.

Der maximale Strom wurde durch 1 mM Chinidin um 78% vermindert. Auch dies war reversibel, wird aber der Übersicht halber in dieser Abbildung nicht gezeigt.



**Abbildung 10:** Kaliumleitfähigkeit eines *Cell-Attached-Patches* einer Typ I Haarzelle. Haltepotenzial  $V_H = -60$  mV, Rampenförmiges Spannungsprotokoll mit  $V_M$  von -160 mV bis +40 mV in 5 s, Kontrolle:  $I_{max} = 961$  pA, Reduktion von  $I_{max}$  durch 1 mM Chinidin um 78%.

Für die Berechnung der Dissoziationskonstante von Chinidin wurden Ableitungen an vestibulären Typ I und Typ II Haarzellen in aufsteigenden Konzentrationen vorgenommen. Es

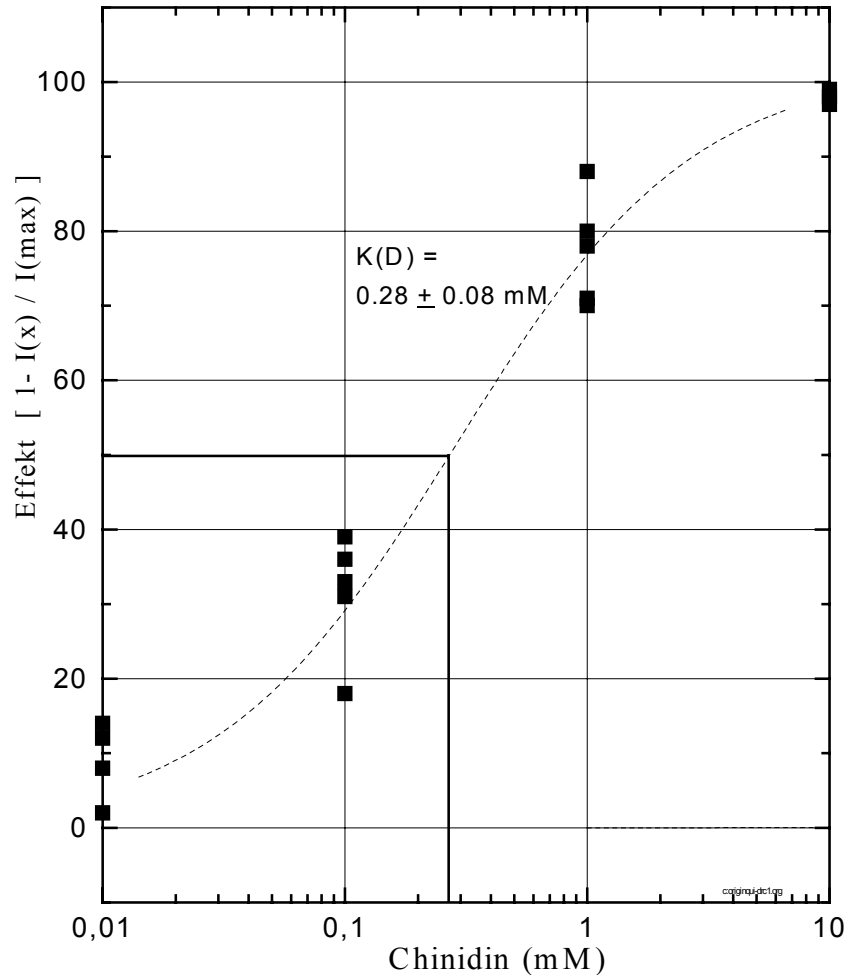


wurden jeweils 4 Typ I und 4 Typ II Haarzellen mit Chinidin-Lösungen in den Konzentrationen 0.01, 0.1, 1.0 und 10 mM perfundiert. An den jeweils gemessenen Strom-Spannungskurven wurde die Reduktion des maximalen Stromes, wie exemplarisch in den Abbildung 8 und 9 gezeigt, gemessen. Mit den daraus gewonnenen Werten, i.e. der Reduktion des maximalen Stromes, für jeweils 4 Zellen pro Konzentration konnte die Dosis-Wirkungskurven und die Dissoziationskonstanten mit Hilfe der Software (Origin 3.1, sigmoider Fit) berechnet werden.

In den Abbildungen 11 und 12 ist jeweils die Reduktion des maximalen Stromes gegen die Konzentration aufgetragen. Die Dissoziationskonstante  $K_d$ , angegeben in Mol/l, liegt jeweils am Wendepunkt der Dosiswirkungskurven. An diesem Punkt liegt eine Reduktion des maximalen Stromes von 50% vor. Korrelierend zu der Michaelis-Menten-Theorie für Enzymkinetiken entspricht der Wert der Dissoziationskonstanten einer Situation, in der die Konzentration des Toxins, in diesem Fall Chinidin, gleich der des Rezeptors, in diesem Fall im wesentlichen des dominierenden Kaliumkanals  $I_{KI}$ , ist.

Für die Typ I Haarzellen lag die Dissoziationskonstante bei  $0,28 \pm 0,08$  mM Chinidin. Die Messungen an Typ II Haarzellen ergaben eine Dissoziationskonstante von  $0,24 \pm 0,06$  mM.

### Typ I Haarzelle

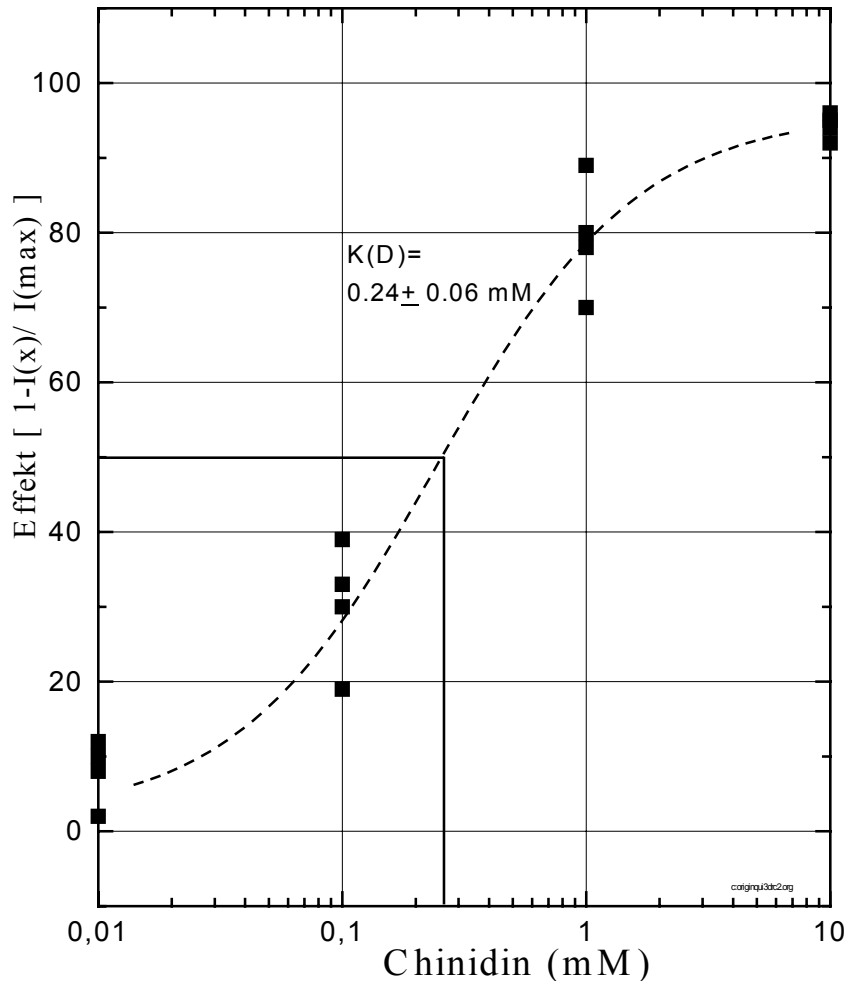


**Abbildung 11:** Dosis-Wirkung-Kurve und Dissoziationskonstante K(D) für Typ I Haarzellen (n = 4). Die auf der y-Achse aufgetragenen Werte stellen die Reduktion des maximalen Stromes nach Applikation von Chinidin im Verhältnis zum maximalen Strom vor Applikation dar [1- I(x)/I(max), Angaben in Prozent]. Die eingezeichnete sigmoide Fit-Kurve wurde mit Hilfe des Programmes "ORIGIN" (MicroCal) und der Formel für sigmoiden Fit bei logarithmischer x-Achse

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$

berechnet. Die Dissoziationskonstante K(D) liegt am Wendepunkt der Kurve.

### Typ II Haarzelle



**Abbildung 12:** Dosis-Wirkung-Kurve und Dissoziationskonstante  $K(D)$  für Typ II Haarzellen ( $n = 4$ ). Die auf der y-Achse aufgetragenen Werte stellen die Reduktion des maximalen Stromes nach Applikation von Chinidin im Verhältnis zum maximalen Strom vor Applikation dar  $[1 - I(x)/I(\max)]$ , Angaben in Prozent]. Die eingezeichnete sigmoide Fit-Kurve wurde mit Hilfe des Programmes "ORIGIN" (MicroCal) und der Formel für sigmoiden Fit bei logarithmischer x-Achse

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$

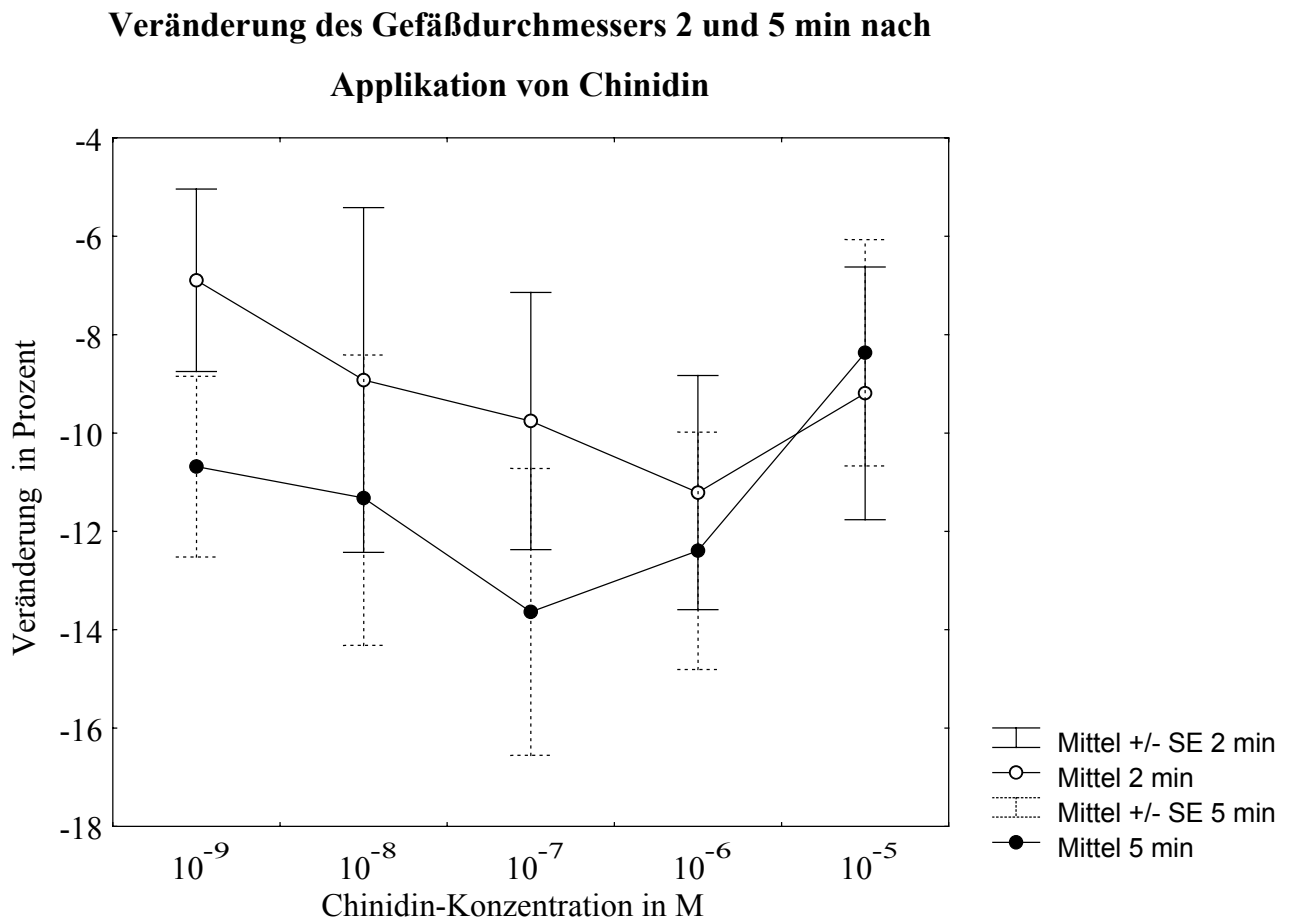
berechnet. Die Dissoziationskonstante  $K(D)$  liegt am Wendepunkt der Kurve.

Zusammenfassend ergaben die Messungen zur Wirkung von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen die folgenden Ergebnisse:

1. Chinidin hemmt die durch Hyper- bzw. Depolarisation ausgelösten Ströme.
2. Da diese Ströme im wesentlichen dem Kaliumstrom entsprechen, hemmt Chinidin vorwiegend den für diesen verantwortlichen Kaliumkanal  $I_{K1}$ .
3. Die durch Chinidin verursachte Hemmung von  $I_{K1}$  ist dosisabhängig.
4. Die durch Chinidin verursachte Hemmung von  $I_{K1}$  ist reversibel.
5. Die Dissoziationskonstanten für Chinidin ist für Typ I Haarzellen bei  $0.28 \pm 0.08$  mM und für Typ II Haarzellen bei  $0.24 \pm 0.06$  mM.

## 4.2 Reaktion pialer Gefäße auf Chinidin

Um die Reaktion pialer Gefäße auf Chinidin zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Krianielle-Fenster-Technik Chinidin in aufsteigenden Konzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  M auf diese Gefäße appliziert. Es wurden an fünf Tieren jeweils drei Gefäße vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die Messungen nach 2 min (obere Kurve) und nach 5 min (untere Kurve) wurden getrennt dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet, die Mittelwerte sind verbunden.



**Abbildung 13:** Dargestellt sind die prozentuellen Abweichungen des Gefäßdurchmessers vom Ausgangswert. Die obere Kurve repräsentiert die mittlere Abweichung nach 2 Minuten, die untere die Werte nach 5 Minuten. Der Standardfehler (SE) ist jeweils eingezeichnet.

Die Wirkung von Chinidin ist bei niedrigen Konzentrationen noch abhängig von der Zeit nach Applikation. Bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M ist der Unterschied zwischen der Applikation nach zwei Minuten und einer Applikation nach fünf Minuten gerade noch signifikant ( $6,9\% \pm 1,8$  bei 2 min,  $10,6\% \pm 1,8$  bei 5 min,  $p = 0,04$ , t-test). Bei Konzentrationen von  $10^{-8}$  bis  $10^{-5}$  ließ sich kein signifikanter Unterschied der Wirkung nach zwei Minuten zu der nach fünf Minuten mehr feststellen. Die maximale Änderung des Gefäßdurchmessers ließ sich bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M beobachten und betrug  $-13,6\% \pm 2,9$ . Bei höheren Chinidin-Konzentrationen von  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M war immer noch eine Vasokonstriktion erkennbar, diese war jedoch weniger stark ausgeprägt.

Es war ein Trend erkennbar, dass längere Applikation von Chinidin zu vermehrter Vasokonstriktion führt. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Dauer nach Applikation (zwei versus fünf Minuten) ließ sich allerdings nur bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M Chinidin feststellen.

Die Applikation von Chinidin in den untersuchten Konzentrationen führte unter Berücksichtigung des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes für die Stromstärke laminarer Flüssigkeiten in starren Rohren

$$I = \frac{\pi r^4}{8\eta l} \Delta P$$

$r$  = Radius,  $8$  = Faktor aus der Integration des Geschwindigkeitsprofils,  $\eta$  = Viskosität,  $l$  = Länge,  $\Delta P$  = Druckdifferenz

bei einer Reduktion des Gefäßdurchmessers zwischen  $6,9\%$  bis  $13,6\%$  zu einer Verminderung der Stromstärke um  $30\%$  bis  $66\%$  des Ausgangswertes.

## 5 Diskussion

### 5.1 Patch-Clamp-Messungen

#### 5.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der vestibulären Zellen

Vor den Experimenten zur Wirkung von Chinidin auf den dominierenden Kaliumstrom  $I_{KI}$  wurden dessen Eigenschaften durch pharmakologische Untersuchungen (Wirkung von 4-Aminopyridin, Tetraethylammonium und Cäsiumchlorid) sowie die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung bzw. Deaktivierung dieses Kaliumstroms und des Umkehrpotenzials charakterisiert.

Von Rennie und Correia (1994) wurde der dominierende Kaliumkanal von Typ I Haarzellen als Verzögerter Gleichrichter „ $I_{KI}$ “ bezeichnet. Die beschriebene Spannungsabhängigkeit von  $I_{KI}$ , seine Deaktivierung bei Potenzialen unter -90 mV und seine ca. 50%ige Aktivierung bei Potenzialen zwischen -60 und -80 mV konnten bestätigt werden (Abschnitt 4.1.1). Die Zeitabhängigkeit der Deaktivierung von  $I_{KI}$  bei Potenzialen unter -90 mV (innerhalb von ca. 10 ms, s. Abb. 2) korrelierte mit den Beobachtungen von Eatock (Eatock und Hutzler, 1992). Gleiches galt für das Umkehrpotenzial von  $-73,7 \pm 3,9$  mV (Eatock und Hutzler, 1992; Rennie und Correia, 1994).

Die pharmakologischen Untersuchungen mit 4-Aminopyridin, Tetraethylammonium und Cäsiumchlorid (s. Abschnitt 4.1.2) ergaben, dass 4-Aminopyridin eine deutliche Blockierung des Kaliumstromes an der Membran einer vestibulären Typ I Haarzelle bewirkt (Abb. 5) und zwar sowohl des Einwärts- als auch des Auswärtsstromes. Tetraethylammonium verursacht eine geringe Verminderung des Auswärtsstromes (Abb. 6) und Cäsiumchlorid eine deutliche Blockierung des Einwärtsstromes (Abb. 7). Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten von Rennie und Eatock überein (Eatock und Hutzler, 1992; Rennie und Correia, 1994).

Die oben genannten Messungen wurden einerseits zur Charakterisierung der Zellen durchgeführt. Andererseits konnten die Vorbefunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden.

### 5.1.2 Wirkung von Chinidin auf vestibuläre Haarzellen

Die vorgelegten Untersuchungen an isolierten vestibulären Haarzellen zeigten eine konzentrationsabhängige, reversible Blockierung des dominierenden Kaliumstromes  $I_{KI}$  durch Chinidin. Die Gesamtleitfähigkeit der untersuchten Zellen wurde bei einer extrazellulären Chinidin-Konzentration von 1mM um bis zu 77 % (Typ I Haarzellen, s. Abb. 8) bzw. 82 % (Typ II Haarzellen, s. Abb. 9) vermindert. Bei beiden Zelltypen konnte die Ausgangsleitfähigkeit nach Auswaschen von Chinidin wiederhergestellt werden. An Typ I Haarzellen konnte im Cell-Attached-Patch eine reversible Reduktion der Kalium-Leitfähigkeit von 78 % gezeigt werden (Abb. 10).

Der Kaliumstrom  $I_{KI}$  spielt eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung durch die vestibulären Haarzellen ( Rennie et al., 1996; Chen und Eatock, 2000; Eatock et al 2002). Die „Übersetzung“ des mechanischen Impulses durch die Stereozilien der vestibulären Haarzelle in ein elektrisches Signal erfolgt durch einen mechanosensitiven Kationenkanal (Hudspeth 1989b; Markin und Hudspeth, 1995). Die Aktionspotentialfrequenz der afferenten vestibulären Axone wird durch das Membranpotenzial der Haarzellen bzw. deren Freisetzung von wahrscheinlich Glutamat kontrolliert. Eine Depolarisation der Haarzelle führt zu einer erhöhten Frequenz (Flock, 1965). Ein erniedrigtes Membranpotenzial führt somit zu einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz. Nach einem Reiz wird vor allem durch den Kaliumstrom  $I_{KI}$  das Ausgangspotenzial der Zelle wiederhergestellt.

Eine Blockade des dominierenden Kalium-Kanals durch Chinidin hat eine reduzierte Kalium-Leitfähigkeit zur Folge. Eine Depolarisation der Zellmembran über die mechanosensitiven Ionenkanäle sollte daher bei erniedrigter Kalium-Leitfähigkeit zu einer größeren und länger andauernden Änderung des Membranpotenzials und zur vermehrten Ausschüttung exzitatorischer Transmitter führen (Behrend et al., 1997; Highstein, 1991). Dies könnte eine vestibuläre Tonusimbalance mit Schwindel bei einer Vergiftung mit Chinidin erklären.

Die Reversibilität der Blockierung von  $I_{KI}$  durch Chinidin in den durchgeführten *Patch-Clamp*-Ableitungen (s. Abschnitt 4.1.3) lässt darauf schließen, dass an der ebenfalls reversiblen Entstehung von Schwindel durch die Einnahme von Chinidin eine Blockade der Kaliumleitfähigkeit vestibulärer Haarzellen beteiligt sein kann.



Bei der therapeutischen Anwendung von Chinin und Chinidin zur Behandlung von Arrhythmien bzw. einer der in der Einleitung angesprochenen Indikationen kommt es zu Konzentrationen des Medikamentes im Plasma von bis zu 15 mg/l. Im Falle einer Intoxikation werden Spiegel von 30 mg/l gemessen (Karbwan et al., 1993; Lockey und Bateman, 1989). Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit der Elimination von Chinin von neun bis dreizehn Stunden lagen z.B. bei dem in der Einleitung beschriebenen Patienten die Konzentrationen zwischen 9 und 20 mg/l Chinin (Strupp et al., 1998). Dies entspricht einer Konzentration (Molekulargewicht von Chinin 396,9 g/mol) zwischen 0,02 und 0,05 mM und damit einem Wert, bei dem der dominierende Kaliumstrom  $I_{KI}$  um bis zu 20% seiner Leitfähigkeit blockiert wird (extrapoliert aus den Abbildungen 11 und 12, Dosis-Wirkungs-Kurve für Chinidin).

In der vorliegenden Arbeit wurden Dissoziationskonstanten für Chinidin von  $0,28 \pm 0,08$  mM für Typ I Haarzellen und  $0,24 \pm 0,06$  mM. für Typ II Haarzellen (s. Abschnitt 4.1.3) gefunden. Die Konzentrationen von Chinin bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Chinin-Intoxikation (Schwindel, Hörverlust, Sehstörungen) liegen bei Werten von bis zu 0,08 mM. Damit wird eine Reduktion des Kaliumstromes der Zellen von über 25% erreicht. Als Hypothese lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass reversible Effekte bei einer Intoxikation mit Chinidin durch dessen reversible Blockade von Kaliumkanälen, insbesondere des dominierenden Kaliumkanals der vestibulären Haarzellen  $I_{KI}$ , verursacht werden.

Die oben beschriebenen Wirkungen betreffen den in dieser Arbeit untersuchten Kaliumstrom  $I_{KI}$ . Von vestibulären Haarzellen ist darüber hinaus bekannt, dass sie wie die cochleären Haarzellen über kontraktile Elemente verfügen und die Fähigkeit haben, sich zu bewegen (Sans et al., 1994; Takumida et al., 1994a; Takumida et al., 1994b). Es wird vermutet, dass diese Eigenschaft zur Adaptation des Rezeptors Haarzelle dienen kann, indem die Steifigkeit und damit die Reagibilität der Zellen verändert werden kann (Sans et al., 1994; Valat et al., 1991). Ebenso kann über Second-Messenger eine Veränderung der Eigenschaften des dominierenden Kaliumstromes  $I_{KI}$  hervorgerufen werden und damit die Eigenschaft des Rezeptors verändert werden (Behrend et al., 1997).

Die Einflüsse auf die Motilität wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht, allerdings beschreibt Karlsson, dass auch dieser Effekt größtenteils reversibel ist (Karlsson et al., 1991). Von Chinin, dem Stereoisomer des Chinidin, weiß man, dass es einen Einfluss auf die

Beweglichkeit cochleärer Haarzellen hat. Zudem sind in vitro irreversible Veränderungen, wie die Bildung eines zentralen Mikrotubulus und eine Schwellung intrazellulärer Kompartimente, an diesen Zellen beschrieben (Karlsson und Flock, 1990; Karlsson et al., 1991b). Takumida hat gezeigt, dass auch vestibuläre Haarzellen die Fähigkeit zur Bewegung haben und Aktin-Filamente in den Zellen nachgewiesen (Takumida et al., 1994b; Takumida et al., 1995); Metcalf konnte zudem in Froschhaarzellen für Myosin-I $\beta$ -Isoenzym kodierende mRNA nachweisen und somit einen weiteren Hinweis auf kontraktile Fähigkeiten von Haarzellen liefern (Metcalf et al., 1994). Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass auch andere Funktionen vestibulärer Haarzellen durch Chinidin gestört werden können. Somit ist die Beeinflussung von  $I_{KI}$  vermutlich nicht der einzige Mechanismus, der für eine Veränderung der Reizantwort von vestibulären Haarzellen unter Einfluss von Chinidin verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den Patch-Clamp Untersuchungen folgendes ableiten:

1. Für die reversiblen Effekte von Chinin und Chinidin auf das vestibuläre System ist eine direkte Beeinflussung des dominierenden Kaliumstromes  $I_{KI}$  der vestibulären Haarzellen zumindest mitverantwortlich.
2. Irreversible Effekte von Chinin und Chinidin werden wahrscheinlich durch andere Mechanismen, wie die in der Arbeit untersuchte Wirkung auf die pialen Blutgefäße, verursacht (s. Abschnitt 5.2).

## **5.2 Kranielle-Fenster-Untersuchungen**

### **5.2.1 Beurteilung der Methodik**

Die Kranielle-Fenster-Technik erlaubt die Beobachtung pialer Gefäße in ihrer natürlichen Umgebung. Dies stellt einen Vorteil der Methode gegenüber Untersuchungen an isolierten Gefäßen *in vitro* dar. Nachteile sind mögliche Beeinflussungen durch die Zusammensetzung des künstlichen Liquors, den  $p\text{CO}_2$ , die Integrität des Endothels, die Narkose und den Hirndruck (Haberl, 1993; Levasseur et al., 1975). Durch kontinuierliche Messung der expiratorischen Sauerstoffkonzentration, schonende Präparation (im Falle einer Verletzung der Hirnoberfläche wurden an diesem Tier keine Messungen vorgenommen), immer gleiche Narkose und Ansetzen des Liquors direkt vor den Versuchen wurde für konstante und reproduzierbare Versuchsbedingungen gesorgt. Weiterhin wurde im Anschluss an die Versuche die Reagibilität der Gefäße auf Hyperkapnie getestet. Zeigten die Gefäße keine Reaktion auf Hyperkapnie, wurden die bei diesem Tier gewonnenen Messergebnisse nicht für die Auswertung verwendet.

### **5.2.2 Wirkungen von Chinidin auf piale Gefäße**

Die Messungen der Veränderung der Durchmesser der pialen Arteriolen in den Kranielle-Fenster-Versuchen ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion des Durchmesser dieser Gefäße. Die minimale Gefäßkonstriktion konnte bei einer Chinidin-Konzentration von  $10^{-9}$  M zwei Minuten nach Applikation beobachtet werden und betrug  $-6,9\% \pm 1,8\%$ . Die maximale Reduktion des Gefäßdurchmessers konnte bei einer Chinidin-Konzentration von  $10^{-7}$  M fünf Minuten nach Applikation beobachtet werden und betrug  $-13,6\% \pm 2,9\%$  (s. Abschnitt 4.2). Nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz geht der Gefäßradius in der vierten Potenz in die Berechnung des Gefäßwiderstandes ein. Die durch die Gefäßkonstriktion verursachte Reduktion des Blutflusses durch diese Gefäße beträgt demnach zwischen 30% und 66%. Diese Minderperfusion erscheint ausreichend, um durch die Hypoperfusion bedingte Störungen im Funktionsstoffwechsel der abhängigen Zellen zu erklären. Dauerhafte Schädigungen werden an Inneohr und Retina beobachtet (Bacon et al., 1988; Boland et al., 1985; Smith et al., 1985). Der Mechanismus der Schädigung insbesondere der Retina ist bislang nicht bekannt. Wie in der Arbeit von Bacon beschrieben, wird teilweise unter der

Annahme, die Ursache der retinalen Schädigung sei eine generelle Minderdurchblutung, eine Ganglion-stellatum Blockade durchgeführt. Dies führt allerdings nur bei einem kleinen Teil der Patienten (knapp 12% in der Arbeit von Boland et al., 1985) zu einer Besserung der Sehfähigkeit. Berücksichtigt man die Beobachtungen an pialen Gefäßen, so muss die beobachtete Vasokonstriktion an pialen und vermutlich auch an retinalen Gefäßen über eine direkte Wirkung auf die Blutgefäße verursacht sein. Die weitgehende Unwirksamkeit der Ganglion-stellatum-Blockade unterstützt diese Hypothese. Wie in der Arbeit von Smith et al. berichtet, findet sich nach Applikation von Chinin eine Verminderung von Erythrozyten in der Stria vascularis (Smith et al., 1985). Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass irreversible Schädigungen am Innenohr durch eine Minderperfusion verursacht werden.

Marino hat in einer Studie an gesunden Probanden gezeigt, dass Chinidin eine direkte periphere Vasodilatation bewirkt, gefolgt von einer reflektorischen Erhöhung des Sympathikotonus, mit einer dadurch wiederum erhöhten Vasokonstriktion (Mariano et al., 1992). Bachmann hat in Untersuchungen an Myokardzellen eine durch Chinidin ausgelöste Störung der Mitochondrienfunktion festgestellt (Bachmann und Bickel, 1985). Er fand eine Enkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien nach Chinidin-Applikation. Dies resultiert in einer verminderten ATP-Produktion. Beide Mechanismen, die reflektorische Vasokonstriktion und die verminderte ATP-Produktion, stellen weitere Möglichkeiten einer irreversiblen Zellschädigung dar.

Das Maximum der Gefäßveränderungen findet sich bei Chinidin-Konzentrationen von  $10^{-7}$  M. In den höheren Konzentrationen nimmt der vasokonstriktive Effekt wieder ab (s. Abb. 13). Der zelluläre Mechanismus dieser Reaktion ist unklar. An peripheren Gefäßen fand sich nach Chinidin-Applikation eine periphere Vasodilatation (Mariano et al., 1992). Es ist bekannt, dass Chinin und Chinidin eine reversible Blockade von  $\alpha$ -Rezeptoren bewirken können (Mecca et al., 1980; Toda et al., 1981). Für die gefäßverengende Wirkung muss ein direkter Mechanismus entweder auf die Gefäßmuskulatur oder auf das umliegende Gewebe angenommen werden. Bei höherer Konzentration des Pharmakons werden möglicherweise zunehmend  $\alpha$ -Rezeptoren blockiert, was zu einer Abnahme des direkt verengenden Effektes führen könnte. Dies könnte die zum Teil widersprüchlichen Wirkungen von Chinidin erklären.

### 5.3 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Chinidin mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Ergebnisse der *Patch-Clamp*-Messungen konnten eine direkte Wirkung auf vestibuläre Haarzellen nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der dominierende Kaliumstrom der Zellen konzentrationsabhängig um bis zu 82% reduziert wird. Im zweiten Ansatz wurde die Wirkung von Chinidin auf piale Gefäße mit Hilfe der Kranielle-Fenster-Technik untersucht. Hier fand sich eine deutliche Reduktion des Durchmessers pialer Gefäße nach lokaler Applikation von Chinidin. In der Literatur fanden sich weitere mögliche Mechanismen einer Beeinflussung des vestibulären Systems auf zellulärer und vaskulärer Ebene, wie eine Störung der Mitochondrien-Funktion oder der Funktion kontraktiler Elemente wie Aktin und Myosin sowie eine Änderung des Sympatikonus.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich die folgenden zwei Hypothesen ableiten:

Reversible Effekte bei einer Intoxikation mit Chinidin lassen sich wahrscheinlich z.T. durch dessen reversible Blockade von Kaliumkanälen, insbesondere des dominierenden Kaliumkanals der vestibulären Haarzellen  $I_{KI}$ , erklären, da diese zu einer Funktionsstörung der Haarzelle führt.

Irreversible Effekte, wie die in der Literatur beschriebenen irreversiblen Sehstörungen, werden wahrscheinlich durch eine vasokonstriktorisch bedingte Ischämie verursacht.

Kritisch anzumerken ist, dass sich mit den beiden genannten Methoden nur zwei Aspekte der Wirkungen von Chinidin analysieren lassen, und, wie oben dargestellt, dessen Auswirkungen auf andere Zellen und Systeme zur Toxizität beitragen.

## Zusammenfassung

Chinidin, ein Cinchona-Alkaloid, wird heutzutage vorwiegend als Antiarrhythmikum und zur Therapie bestimmter Formen der Malaria eingesetzt. Zu seinen vielfältigen unerwünschten Wirkungen gehören sowohl reversible als auch irreversible Störungen des Gleichgewichts und des Hörens. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe zweier unterschiedlicher etablierter Methoden, der *Patch-Clamp*- und der Kranielle-Fenster-Technik, die Ursachen dieser Störungen zu untersuchen.

Mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen wurde an isolierten vestibulären Haarzellen der Ratte der Einfluss von Chinidin auf den dominierenden Kaliumstrom dieser Zellen untersucht. Die Ableitungen ergaben sowohl an Typ I als auch an Typ II Haarzellen eine konzentrationsabhängige, reversible Hemmung der Kaliumströme dieser Zellen durch Chinidin mit Dissoziationskonstanten zwischen 240 und 280  $\mu\text{M}$ . Die Hemmung des dominierenden Kaliumstromes dieser Zellen führt zu einer verminderten Repolarisationsgeschwindigkeit des Membranpotenzials nach Depolarisation über den mechanoelektrischen Transduktionskanal. Dadurch werden von den Haarzellen vermehrt exzitatorische Transmitter freigesetzt, was zu einer vestibulären Tonusimbalance und vorübergehendem Schwindel führen kann. So lassen sich die reversiblen Effekte von Chinin und Chinidin auf das vestibuläre System erklären.

Die Kranielle-Fenster-Methode erlaubte es, die Auswirkungen von lokal auf piale Gefäße appliziertem Chinidin *in vivo* zu beobachten. In diesem zweiten Ansatz zeigte sich eine konzentrationsabhängige Konstriktion dieser Gefäße um bis zu 13,6% des Ausgangswertes, was nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes um bis zu 60% führt. Diese kann zu Minderperfusionen im Bereich empfindlicher Areale (bekannt sind z.B. A. labyrinthi, Retina) führen. Zusammen mit anderen durch Chinidin ausgelösten Effekten wie einer peripheren Vasodilatation und einer damit verbundenen Orthostase sowie einer darauf folgenden reflektorischen Erhöhung des Sympathikustonus kann dies vaskulär bedingte reversible, aber vor allem auch irreversible Störungen verursachen.

Kritisch anzumerken ist, dass sich mit diesen Methoden nur zwei Aspekte der Wirkungen von Chinidin analysieren lassen und die Auswirkungen auf andere Zellen und Systeme zur Toxizität nicht analysiert wurden.

## Literaturverzeichnis

**Agarwala, S.S., Bahnson, R.R., Wilson, J.W., Szumowski, J., Ernstoff, M.S.** Evaluation of the combination of vinblastine and quinidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. A phase I study *Am. J. Clin. Oncol.* 1995; 18: 211-215

**Alloway, J.A., Salata, M.P.** Quinidine-induced rheumatic syndromes. *Semin. Arthritis Rheum.* 1995; 24: 315-322

**Alvan, G., Karlsson, K.K., Hellgren, U., Villen, T.** Hearing impairment related to plasma quinine concentration in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1991; 31: 409-412

**Alvan, G., Karlsson, K.K., Villen, T.** Reversible hearing impairment related to quinine blood concentrations in guinea pigs. *Life Sci.* 1989; 45: 751-755

**Ascher, A., Erulkar, S.** Cholinergic Chloride Channels in Sail Neurons; in *Single Channel Recordings*, Herausgeber Sakmann, B., Neher, E., Plenum Publications 1995: 401-406

**Bachmann, C., Bickel, M.H.** History of drug metabolism: the first half of the 20th century. *Drug Metab. Rev.* 1985; 16: 185-253

**Balfour, A.J.** The bite of Jesuits' bark. *Aviat. Space. Environ. Med.* 1989; 60: A4-A5

**Balsler, J.R., Roden, D.M., Bennett, P.B.** Single inward rectifier potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. Effects of quinidine *Biophys. J.* 1991; 59: 150-161

**Barrett, A.P., Tversky, J., Griffiths, C.J.** Thrombocytopenia induced by quinine *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1983; 55: 351-354

**Behrend, O., Schwark, C., Kunihiro, T., Strupp, M.** Cyclic GMP inhibits and shifts the activation curve of the delayed rectifier (IK1) of Type I mammalian vestibular hair cells. *Neuroreport* 1997;8:2687-90

**Benent, L.Z., Oie, S., Schwartz, B** in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> ed., Joel G. Hardman, Alfred Goodman Gilman, Lee E. Limbird, McGraw-Hill New York 1996



- Bird, M.R., O'Neill, A.I., Buchanan, R.R., Ibrahim, K.M., Des Parkin, J.** Lupus anticoagulant in the elderly may be associated with both quinine and quinidine usage. *Pathology*. 1995; 27: 136-139
- Bonavina, L., DeMeester, T.R., McChesney, L., Schwizer, W., Albertucci, M., Bailey, R.T.** Drug-induced esophageal strictures. *Ann. Surg.* 1987; 206: 173-183
- Bott, S., Prakash, C., McCallum, R.W.** Medication-induced esophageal injury: survey of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* 1987; 82: 758-763
- Brandt, T.** In *Vertigo. Its Multisensory Syndromes*. 2. Auflage, Springer-Verlag 1999 London
- Brandt, T., Dieterich, M., Strupp, M.** In *Vertigo, Leitsymptom Schwindel*, Steinkopff Springer Verlag 2004, Darmstadt
- Bruce, S., Wolf, J.E.J.** Quinidine-induced photosensitive livedo reticularis-like eruption. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1985; 12: 332-336
- Chen, J.W.Y., Eatock, R.A.** Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *J. Neurophysiol.* 2000; 84: 139-151
- Clauß, G., Finze, F.R., Partzsch, L.** in *Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner*, 1995: 251-253
- Cohen, I.S., Jick, H., Cohen, S.I.** Adverse reactions to quinidine in hospitalized patients: findings based on data from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1977; 20: 151-163
- Corey, D.P. Stevens, C.F.** Science and technology of patch-recording electrodes. In *Single Channel Recordings*, Herausgeber: Sakmann, B., Neher, E.; Kluwer Academic Publisher Group, London 1983: 53-68
- Currie, B.J., Krause, V.L.** Focal neurological signs in cerebral malaria accounted for by preceding neurological damage. *J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 92: 276-278
- Davidson, E., Fuchs, J., Rotenberg, Z., Weinberger, I., Agmon, J.** Drug-related syncope. *Clin. Cardiol.* 1989; 12: 577-580

- Dyson, E.H., Proudfoot, A.T., Bateman, D.N.** Quinine amblyopia: is current management appropriate? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1985; 23: 571-578
- Eatock, R.A., Hurley, K.M., Vollrath, M.A.** Mechanoelectrical and voltage-gated ion channels in mammalian vestibular hair cells. *Audiol. Neurootol.* 2002; 7: 31-35
- Eatock, R.A., Hutzler, M.J.** Ionic currents of mammalian vestibular hair cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 656: 58-74
- Flock, A.** Transducing mechanisms in the lateral line canal organ receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1965; 30: 133-145
- Frey, W.** Über Vorhofflimmern beim Menschen und seine Beseitigung durch Chinidin. *Berliner klinische Wochenschrift* 1918; 450-452
- Gottschall, J.L., Neahring, B., McFarland, J.G., Wu, G.G., Weitekamp, L.A., Aster, R.H.** Quinine-induced immune thrombocytopenia with hemolytic uremic syndrome: clinical and serological findings in nine patients and review of literature. *Am. J. Hematol.* 1994; 47: 283-289
- Grace, A.A., Camm, A.J.** Quinidine. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338(1): 35-45
- Gramiccia, G.** Notes on the early history of cinchona plantations *Acta Leiden.* 1987; 55: 5-13
- Guharoy, S.R., Shahin, J., Levin, S.** Quinidine-induced hepatotoxicity revisited. *Vet. Hum. Toxicol.* 1991; 33: 613-614
- Guth, P.S., Aubert, A., Ricci, A.J., Norris, C.H.** Differential modulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release from hair cells: some novel hypotheses. *Hear. Res.* 1991; 56: 69-78
- Haas, L.F.** Pierre Joseph Pelletier (1788-1842) and Jean Bienaime Caventou (1795-1887). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1994; 57: 1333
- Haberl, R.L.** Optical access to the brain: how artificial are cranial window techniques? *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993; 333: 177-181

- Haberl, R.L., Anneser, F., Villringer, A., Einhüpl, K.M.** Angiotensin II induces endothelium-dependent vasodilation of rat cerebral arterioles. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: H1840-H1846
- Hagiwara, S., Kusano, K., Saito, N.** Membran Changes of Onchidium Nerve Cell in Potassium-Rich Media. *J. Physiol.* 1961: 357-376
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981; 391: 85-100
- Hawkins, J.E., Johnsson, L.G., Preston, R.E.** Cochlear microvasculature in normal and damaged ears. *Laryngoscope* 1972; 82: 1091-1104
- Highstein, S.M.** The central nervous system efferent control of the organs of balance and equilibrium. *Neurosci Res* 1991;12:13-30
- Hille, B.** In *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc. 1992 Sunderland, Massachusetts
- Hiott, D.W., Howell, R.D.** Acute electron microscopic changes in myocardial cells induced by high doses of quinidine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1971; 18: 964-970
- Hollman, A.** Quinine and quinidine. *Br. Heart J.* 1991; 66: 301
- Housley, G.D., Ashmore, J.F.** Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J. Physiol. Lond.* 1992; 448: 73-98
- Hudspeth, A.J.** How the ear's works work. *Nature* 1989a; 341: 397-404
- Hudspeth, A.J.** Mechanoelectrical transduction by hair cells of the bullfrog's sacculus. *Prog. Brain Res.* 1989b; 80: 129-135
- Hudspeth, A.J.** in *Principles of Neural Science* 2000, Herausgeber: Kandel, E.R, Schwartz, J.H, Jessell, T.M. Kapitel 31: 614-624
- Illek, B., Fischer, H., Clauss, W.** Quinidine-sensitive K<sup>+</sup> channels in the basolateral membrane of embryonic coprodeum epithelium: regulation by aldosterone and thyroxine. *J. Comp. Physiol. B.* 1993; 163: 556-562

- Ishiyama, G., Lopez, I., Williamson, R., Acuna, D., Ishiyama, A.** Subcellular immunolocalization of NMDA receptor subunit NR1, 2A, 2B in the rat vestibular periphery. *Brain Research* 2002; 935(1-2): 16-23
- Jansen, P.H., Veenhuizen, K.C., Wesseling, A.I., de Boo, T., Verbeek, A.L.** Randomized controlled trial of hydroquinine in muscle cramps. *Lancet* 1997; 349(9051): 528-32
- Jaramillo, F., Hudspeth, A.J.** Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by iontophoretic application of a channel blocker. *Neuron* 1991; 7: 409-420
- Jung, T.T., Rhee, C.K., Lee, C.S., Park, Y.S., Choi, D.C.** Ototoxicity of salicylate, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and quinine. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1993; 26: 791-810
- Karbwang, J., Davis, T.M., Looareesuwan, S., Molunto, P., Bunnag, D., White, N.J.** A comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of quinine and quinidine in healthy Thai males. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1993; 35: 265-271
- Karlsson, K.K., Berninger, E., Alvan, G.** The effect of quinine on psychoacoustic tuning curves, stapedius reflexes and evoked otoacoustic emissions in healthy volunteers. *Scand. Audiol.* 1991a; 20: 83-90
- Karlsson, K.K., Flock, A.** Quinine causes isolated outer hair cells to change length. *Neurosci. Lett.* 1990a; 116: 101-105
- Karlsson, K.K., Flock, B., Flock, A.** Ultrastructural changes in the outer hair cells of the guinea pig cochlea after exposure to quinine. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 1991b; 111: 500-505
- Karlsson, K.K., Hellgren, U., Alvan, G., Rombo, L.** Audiometry as a possible indicator of quinine plasma concentration during treatment of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990b; 84: 765-767
- Kataoka, Y., Ohmori, H.** Of known neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear cells. *J. Neurophysiol.* 1996; 76(3): 1870-79
- Katz, B., Weetch, M., Chopra, S.** Quinine-induced granulomatous hepatitis. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 1983; 286: 264-265

- Kochar, D.K., Kumawat, B.L., Kochar, S.K., Sanwal, V.** Hypoglycemia after oral quinine administration. *J. Assoc. Physicians. India.* 1995; 43: 654-657
- Kyle, R.A., Shampe, M.A.** Discoverers of quinine. *JAMA* 1974; 229: 462
- Leclerc, K.M., Landry, F.J.** Benign nocturnal leg cramps. Current controversies over use of quinine. *Postgrad. Med.* 1996; 99: 177-181
- Leibovitz, A.** The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hygiene.* 1963; 78: 173-180
- Levasseur, J.E., Wei, E.P., Raper, A.J., Kontos, A.A., Patterson, J.L.** Detailed description of a cranial window technique for acute and chronic experiments. *Stroke* 1975; 6: 308-317
- Lockey, D., Bateman, D.N.** Effect of oral activated charcoal on quinine elimination. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 27: 92-94
- Malcolm, A.D., David, G.K.** Quinidine in cardiology. *Acta Leiden.* 1987; 55: 87-98
- Man Son Hing, M., Wells, G.** Meta-analysis of efficacy of quinine for treatment of nocturnal leg cramps in elderly people. *Brit. Med. J.* 1995; 310: 13-17
- Mariano, D.J., Schomer, S.J., Rea, R.F.** Effects of quinidine on vascular resistance and sympathetic nerve activity in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992; 20: 1411-1416
- Markin, V.S., Hudspeth, A.J.** Gating-spring models of mechano-electrical transduction by hair cells of the internal ear. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995; 24: 59-83
- Mecca, T.E., Elam, J.T., Nash, C.B., Caldwell, R.W.** alpha-Adrenergic blocking properties of quinine HCl. *Eur. J. Pharmacol.* 1980; 63: 159-166
- Metcalf, A.B., Chelliah, Y., Hudspeth, A.J.** Molecular cloning of a myosin I beta isozyme that may mediate adaptation by hair cells of the bullfrog's internal ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 11821-11825
- Moss, R.A.** Drug-induced immune thrombocytopenia. *Am. J. Hematol.* 1980; 9: 439-446

- Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J.H.** The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch.* 1978; 375: 219-228
- Paintaud, G., Alvan, G., Berninger, E., Gustafsson, L.L., Idrizbegovic, E., Karlsson, K.K, Wakelkamp, M.** The concentration-effect relationship of quinine-induced hearing impairment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1994; 55(3): 317-23
- Phillips, R.E., Looareesuwan, S., White, N.J., Chanthavanich, P., Karbwang, J., Supanaranond, W., Turner, R.C., Warrell, D.A.** Hypoglycaemia and antimalarial drugs: quinidine and release of insulin. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 1986; 292: 1319-1321
- Poukkula, A., Paakko, P.** Quinidine-induced reversible pneumonitis. *Chest* 1994; 106: 304-306
- Prinz, A.** Discovery of the cardiac effectiveness of cinchona bark and its alkaloids. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1990; 102: 721-723
- Pusch, M., Neher, E.** Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch.* 1988; 411: 204-211
- Rennie, K.J., Correia, M.J.** Potassium currents in mammalian and avian isolated type I semicircular canal hair cells. *J. Neurophysiol.* 1994; 71: 317-329
- Rennie, K.J., Ricci, A.J., Correia, M.J.** Electrical filtering in gerbil isolated type I semicircular canal hair cells. *J. Neurophysiol.* 1996; 75: 2117-2123
- Roden, D.M., Bennett, P.B., Snyders, D.J., Balsler, J.R., Hondeghem, L.M.** Quinidine delays IK activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1988; 62: 1055-1058
- Roden, D.M., Hoffman, B.F.** Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers. Relationship to potassium and cycle length. *Circ. Res.* 1985; 56: 857-867
- Rüsch, A., Eatock, R.A.** Developmental changes of potassium conductances in hair cells of cultured mouse utricles. *Sensory Transduction*. Eds. Elsner, N., Beer, H. 1994: 71-74
- Sans, A., Griguer, C., Lehouelleur, J.** The vestibular type I hair cells: a self-regulated system? *Acta Otolaryngol (Stockh.) Suppl.* 1994; 513: 11-14

- Schonwald, S., Shannon, M.** Unsuspected quinine intoxication presenting as acute deafness and mutism. *Am. J. Emerg. Med.* 1991; 9: 318-320
- Schubarth, P.** Malaria: the most important emergency in subjects returning from the tropics. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1993; 123: 906-910
- Shepherd, G.M.** *Neurobiology*, 2. Auflage, Oxford University Press, 1993
- Smit, E.H.** Quinine is not what it used to be. *Acta Leiden.* 1987; 55: 21-27
- Smith, D.I., Lawrence, M., Hawkins, J.E.J.** Effects of noise and quinine on the vessels of the stria vascularis: an image analysis study. *Am. J. Otolaryngol.* 1985; 6: 280-289
- Snyders, D.J., Hondeghem, L.M.** Effects of quinidine on the sodium current of guinea pig ventricular myocytes. Evidence for a drug-associated rested state with altered kinetics. *Circ. Res.* 1990; 66: 565-579
- Solary, E., Velay, I., Chauffert, B., Bidan, J.M., Caillot, D., Dumas, M., Guy, H.** Sufficient levels of quinine in the serum circumvent the multidrug resistance of the human leukemic cell line K562/ADM. *Cancer* 1991; 68: 1714-1719
- Soto, E., Vega, R., Budelli, R.** The receptor potential in type I and type II vestibular hair cells: a model analysis. *Hear. Res.* 2002; 165(1-2): 35-37
- Strupp, M., Staub, F., Grafe, P.** A  $\text{Ca}^{2+}$ - and pH-dependent  $\text{K}^+$  channel of rat C6 glioma cells and its possible role in acidosis-induced cell swelling. *Glia* 1993; 9: 136-145
- Strupp, M., Suckfüll, M., Schwark, C., König, G., Brandt, Th.** Akute Chinin-Intoxikation: blind, taub und schwindlig. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1998; 140: 79-81
- Sugihara, I., Furukawa, T.** Morphological and functional aspects of two different types of hair cells in the goldfish sacculus. *J. Neurophysiol.* 1989; 62: 1330-1343
- Takumida, M., Miyawaki, H., Arishige, S., Harada, Y.** Isolated vestibular sensory cells in the guinea pig. *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 1994a; 56: 190-194
- Takumida, M., Miyawaki, H., Arishige, S., Harada, Y.** Motile responses of isolated vestibular hair cells. *Auris. Nasus. Larynx.* 1994b; 21: 209-214

- Takumida, M., Miyawaki, H., Harada, Y.** Cytoskeletal organization of the vestibular sensory epithelia. *Acta Otolaryngol (Stockh.) Suppl.* 1995; 519: 66-70
- Toda, N., Konishi, M., Okunishi, H., Miyazaki, M.** Influence of disopyramide, compared with procainamide and quinidine, on isolated dog arteries in response to transmural stimulation and norepinephrine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1981; 3: 1332-1341
- Undrovinas, A.I., Burnashev, N., Eroshenko, D., Fleidervish, I., Starmer, C.F., Makielski, J.C., Rosenshtraukh, L.V.** Quinidine blocks adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels in heart. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: H1609-H1612
- Valat, J., Griguer, C., Lehouelleur, J., Sans, A.** Motile responses of isolated guinea pig vestibular hair cells. *Neurosci. Lett.* 1991; 127: 231-236
- Verhave, J.P.** The use of quinine for treatment and control of malaria in the Netherlands. *Trop. Geogr. Med.* 1995; 47: 252-258
- Wersall, J.** Studies of the structure and innervation of the sensory epithelium of the crista ampullaris in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 1956; 126: 1-85
- West, S.G., McMahon, M., Portanova, J.P.** Quinidine-induced lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 1984; 100: 840-842
- Williams, E.M.** Electrophysiological basis for a rational approach to antidysrhythmic drug therapy. *Adv. Drug Res.* 1974; 9: 69-101
- Wolf, L.R., Otten, E.J., Spadafora, M.P.** Cinchonism: two case reports and review of acute quinine toxicity and treatment. *J. Emerg. Med.* 1992; 10: 295-301
- Wong, B.S.** Quinidine blockade of calcium-activated potassium channels in dissociated gastric smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 1989; 414: 416-422
- Yao, J.A., Trybulski, E.J., Tseng, G.N.** Quinidine preferentially blocks the slow delayed rectifier potassium channel in the rested state. *J. Pharmacol. Experiment. Therapeutics* 1996; 279: 856-864
- Zajtchuk, J.T., Mihail, R., Jewell, J.S., Dunne, M.J., Chadwick, S.G.** Electronystagmographic findings in long-term low-dose quinine ingestion. A preliminary report *Arch. Otolaryngol.* 1984; 110: 788-791





## **Danksagung**

Prof. Dr. Thomas Brandt möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Prof. Dr. Michael Strupp möchte ich für die Einarbeitung und die Betreuung im Labor, sowie die Hilfe bei der Auswertung und den Korrekturen danken.

Prof. Dr. Roman Haberl möchte ich für die Hilfe bei den Versuchen mit der Kranielle-Fenster-Technik danken.

Dr. Oliver Behrend danke ich für die Zusammenarbeit im Labor. Die Unterstützung durch ihn und seine Zuversicht bei schwierigen Experimenten haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Prof. Dr. Takanobu Kunihiro danke ich für die stete Hilfe im Labor, insbesondere bei den anatomischen Präparationen.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines Studiums und den Zeiten im Labor.

Meiner Frau Sandra danke ich für ihre unermüdliche Geduld und ihre Hilfe beim Verfassen der Arbeit.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: Christian Otto Fortunatus Schwark  
Wohnort: Hauptstr. 50, 69221 Dossenheim  
Geburtstag und -ort: 24.05.1969, München  
Familienstand: verheiratet mit Fr.Dr. Sandra Schwark  
Kinder: Franziska Salome Schwark und Julia Rachel Schwark  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung:

1975- 1979 Grundschole an der Königswieserstrasse  
1979-1988 Gymnasium am Pater-Rupert-Meier-Gymnasium des  
Katholischen Familienwerkes in Pullach  
6/1988 Abitur

### Wehrdienst

10.1988-12.1989 München

### Berufsausbildung:

10/1989-10/1996 Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität  
in München  
03/1997-08/1998 Arzt im Praktikum an der Neurologischen Universitätsklinik  
in Heidelberg  
seit 08/1998 Assistenzarzt an der Neurologischen Universitätsklinik in  
Heidelberg