

**Einfluss freier Sauerstoffradikale auf das
Zellvolumen von Gliazellen**

**Frank Bieringer
aus Burghausen
2005**

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. A. Baethmann

**Einfluss freier Sauerstoffradikale auf das
Zellvolumen von Gliazellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Frank Bieringer

aus

Burghausen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. N. Plesnila
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. T.N. Witt Priv. Doz. Dr. med. H. Adelsberger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. F. Ringel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2005

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	4
1.1. Epidemiologie des Schädel-Hirntraumas und des Schlaganfalles	4
1.2. Einteilung des Hirnödems	5
1.3. Mediatoren des sekundären Hirnschadens	7
1.4. Pathophysiologie des schweren Schädel-Hirntraumas und des Schlaganfalles	8
1.5. Freie Sauerstoffradikale und das zytotoxisches Hirnödem	10
1.6. Ziel der Studie	11
<u>2. Material und Methoden</u>	13
2.1. Kultivierung und Aufbereitung von Gliazellen	13
2.1.1. C6-Gliomzelle	13
2.1.2. Zellkultur	14
2.1.3. Subkultivierung der Zellen	15
2.1.4. Zellsuspension	16
2.2. Versuchsaufbau	17
2.2.1. Versuchskammer	17
2.2.2. Kontrolle der Versuchsbedingungen	18
2.2.3. Durchflußzytometrie	19
2.2.3.1. Coulter-Prinzip	19
2.2.3.2. Hydrodynamische Fokussierung	21
2.2.4. Datenerfassung	22
2.3. Versuchsdurchführung	24
2.3.1. Allgemeiner Versuchsablauf	24
2.3.2. Versuchsprotokoll	25

2.4. Versuchsgruppen	25
2.4.1. Kontrollgruppen	25
2.4.2. Versuchsgruppen mit Wasserstoffperoxid-Exposition	26
2.4.3. Versuchsgruppen mit Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Exposition	26
2.4.4. Versuchsgruppen mit Menadion-Exposition	27
2.4.5. Versuchsgruppen mit kombiniertem Einfluß von Azidose und HX/XOD	28
2.4.6. Versuchsgruppen mit kombiniertem Einfluß von Amilorid und HX/XOD	29
2.4.7. Zusammenfassende Übersicht der Versuchsgruppen	30
2.5. Bestimmung der Zellvitalität	31
2.6. Auswertung und Statistik	31
<u>3. Ergebnisse</u>	33
3.1. Kontrollversuche	33
3.2. Wirkung von H₂O₂ auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen	34
3.3. Vitalität der C6-Gliazellen während Inkubation mit H₂O₂	38
3.4. Wirkung von Hypoxanthin-Xanthinoxidase auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen	40
3.5. Wirkung von Hypoxanthin <u>oder</u> Xanthinoxidase auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliazellen	43
3.6. Wirkung von Menadion auf das Volumen und die Vitalität von C6-Gliazellen	47
3.7. Einfluß von Menadion und des Hypoxanthin-Xanthinoxidase- Systems auf die Vitalität von C6-Gliazellen	49
3.8. Einfluß von oxidativem Stress mit Azidose oder Amilorid auf das Volumen und die Vitalität von C6-Gliazellen	50
3.8.1. Einfluß des Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems und Azidose auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen	50

3.8.2.	Einfluß des Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems und Amilorid auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen	52
3.9.	Wirkung von Azidose und Amilorid auf die Vitalität von C6-Gliazellen unter oxidativem Stress	54
<u>4.</u>	<u>Diskussion</u>	56
4.1.	Diskussion der Methodik	56
4.1.1.	Das in vitro Modell	56
4.1.2.	Der Modellcharakter der C6-Gliazellen	58
4.1.3.	Die Volumenmessung	59
4.1.4.	Die Vitalitätsbestimmung	61
4.2.	Freie Sauerstoffradikale	62
4.2.1.	Physiologie der freien Sauerstoffradikale	62
4.2.2.	Pathophysiologie der freien Sauerstoffradikale	63
4.2.3.	Stickstoffmonoxid	66
4.2.4.	Die Lipidperoxidation	67
4.3.	Antagonisierung freier Sauerstoffradikale und der Lipidperoxidation	69
4.4.	Diskussion der Ergebnisse	70
4.5.	Freie Sauerstoffradikale und Apoptose	81
4.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	82
<u>5.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	84
<u>6.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	86
<u>7.</u>	<u>Danksagung</u>	114
<u>8.</u>	<u>Lebenslauf</u>	115

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Schädel-Hirntraumas und des Schlaganfalles

Bis heute ist das schwere Schädel-Hirntrauma (SHT) in den USA und in Europa mit einer Inzidenz von 20-40 auf 100 000 Einwohner in der Altersgruppe unter 45 Jahren die häufigste Todesursache (Sosin et al.,1989, Jenet,1992). Wird das Trauma überlebt, so führt es neben erheblichen psychischen wie physischen Konsequenzen für den Patienten, als auch für seine Angehörige, zu immensen Kosten im Gesundheitswesen. In den USA belaufen sich diese jährlich auf ca. 20 Milliarden US\$ (Kraus et al.,1994).

Basierend auf diesen Fakten und Zahlen wurde im Raum Oberbayern und Schwaben, einer Region mit 5,6 Millionen Einwohnern, eine Systemanalyse der prä- und frühklinischen Versorgung von Patienten mit schwerem SHT von August 1998 bis August 1999 durch den BMBF-Verbund „Neurotrauma“ München durchgeführt. Es ist dies eine prospektive Erhebung auf epidemiologischer Basis. Als Einschlusskriterium in diese Studie galt ein Glasgow-Coma-Score (GCS) von kleiner/gleich 8 Punkten. Die absolute Gesamtzahl der Patienten, die in diese Studie eingingen war 528 Patienten. 214 dieser Patienten starben bereits am Unfallort, was einem Anteil von 29% entspricht. Die Diagnose „schweres SHT“ wurde durch die anschließende Obduktionen bestätigt. 6 Monate nach dem Unfall waren sogar 61% der Patienten verstorben. Unter starker Behinderung litten 10%, unter mäßigen Behinderungen 9%. 1% der Betroffenen klagte anhaltend über vegetative Störungen. Lediglich ein kleiner Anteil von 16% dieser Patienten konnte sich einer guten Erholung erfreuen.

Zusammengefasst besagen diese Zahlen, dass das schwere SHT in dieser Region mit einer Inzidenz von 14,5/100 000 Einwohnern auftritt und eine Mortalität, einschließlich der präklinisch Verstorbenen, von 61% aufweist (Lehr et al.,1997, Baethmann,2001).

Der Schlaganfall steht in Deutschland nach Krebsleiden und kardialen Krankheiten an dritter Stelle der Todesursachenstatistik (Poeck,1990). Trotz eines deutlichen Rückgangs der Mortalität in den Jahren 1970-1985 (Bonita et al.,1990), ist die Vier-Wochen-Letalität mit 11,5% in dieser Patientengruppe nach wie vor sehr hoch (Thom, 1993). Wie die überlebenden Patienten nach einem schweren SHT, so leiden auch die Patienten nach

Schlaganfall an neurologischen Defiziten. Jeder Zweite bleibt für den Rest seines Lebens arbeitsunfähig und bedarf einer kosten- und arbeitszeitaufwendigen Pflege (Poeck,1990). Inzidenz, Morbidität und Mortalität des schweren Schädel-Hirntraumas und des Schlaganfalles zeigen deutlich die Notwendigkeit, neue Präventions- und Therapiekonzepte zu entwickeln. Neben der Verbesserung präventiver Maßnahmen, wie z.B. das Tragen von Helmen für Radfahrer und Freizeitsportler, muß vor allem die Verbesserung des Outcome durch schneller eingeleitete und gezieltere therapeutische Interventionen am Unfallort, im Krankenhaus und auch während der Rehabilitation, der zentrale Ansatzpunkt wissenschaftlicher Anstrengungen darstellen.

1.2. Einteilung des Hirnödems

Die Einführung des Begriffes „Hirnödem“ und seine Abgrenzung von der „Hirnschwellung“ geht auf den Pathologen M. Reichardt (1905) zurück. Bei der makroanatomischen Betrachtung von Hirngewebeschnitten sah er feuchte (Hirnödem) und trockene (Hirnschwellung) Schnittflächen (Reichardt,1905).

Eine allgemeine Definition wurde 1974 von H.M. Pappius eingeführt, die besagt, dass ein Hirnödem eine Zunahme des Hirnwassergehaltes darstellt, die zur Expansion des Hirnvolumens führt (Pappius,1974).

Eine bis heute gültige und auf Grund ihrer funktionellen Bedeutung allgemein akzeptierte Unterteilung wurde 1967 von I. Klatzo vorgenommen, der erstmalig die Terminologie des vasogenen und zytotoxischen Hirnödems einführte (Klatzo,1967)(Tab.1.). Das pathologische Substrat des vasogenen Hirnödems ist der Defekt der Blut-Hirnschranke, während beim zytotoxischen Hirnödem eine Zellschwellung vorliegt. Von dieser Zellschwellung sind hauptsächlich Astrozyten und die von Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden betroffen. Sie ist charakterisiert durch die Aufnahme von Elektrolyten und Wasser aus dem Extrazellulärraum und den Blutgefäßen in den Intrazellulärraum. Nach kompletter Unterbrechung der Hirndurchblutung kommt es zur Verschiebung von interstitieller Flüssigkeit in die Zellen des Hirnparenchyms, jedoch ohne Vergrößerung des Hirnvolumens (Hossmann,1976, Van Harreveld,1972). Die Volumenverlagerung vom Extra- in den Intrazellulärraum führt jedoch nicht zur Nettovolumenzunahme des Gehirns und somit auch nicht zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes. Erst das Versagen zellulärer Funktionen, wie die Clearance von Neurotransmittern und Kaliumionen und die

Verkleinerung von extrazellulären Diffusionsräumen, führen zur Ausbildung des zytotoxischen Hirnödems in der Reperfusionphase. An der intakten Blut-Hirn-Schranke bildet sich während der Ischämie ein osmotischer Gradient, der zur Netto-Flüssigkeitsaufnahme und somit per definitionem zum Hirnödem mit einem möglichen intrakraniellen Druckanstieg führt (Hossmann,1989).

Beim vasogenen Ödem findet sich morphologisch eine Erweiterung des Interstitiums, die vor allem in der weißen Substanz ausgeprägt ist. Durch Ruptur der tight junctions im Gefäßendothel geht deren physiologische Barrierefunktion für polare lipophile Substanzen und Makromoleküle verloren. Hochmolekulare Plasmabestandteile können nun ungehindert in den Interzellulärraum des Gehirns übertreten. Konsekutiv steigt der onkotische Druck, der einen Flüssigkeitseinstrom in das Interstitium nach sich zieht und in einer Volumenzunahme des Gehirns resultiert (Baethmann,1978).

Auch hinsichtlich der klinischen Ursachen unterscheiden sich beide Hirnödemyten voneinander. Das vasogene Hirnödem gilt als Folge von Traumen, Tumoren, Abszessen, Meningitiden und Enzephalitiden. Es wird jedoch selten als alleinständige Ödemform angetroffen, da sich meist sekundär ein zytotoxisches Ödem entwickelt. Dieses wird vor allem auf die Frühphase der Ischämie, Anoxie und Stoffwechselintoxikationen zurückgeführt, also auf toxische Parenchymschäden, bei zunächst intakter Blut-Hirnschranke.

Die zytotoxische Schwellung von Glia- und Nervenzellen kann im Wesentlichen auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden:

1. Toxische Schädigung der Zellmembran, z.B. durch Arachidonsäure oder andere Gewebeabbauprodukte.
2. Aktive Aufnahme von z.B. Glutamat und K^+ -Ionen zusammen mit Na^+ -Ionen zur Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase.

Die außerordentliche Komplexität der zeitgleich ablaufenden Mechanismen machte - und macht bis heute - die Klärung der Entstehung und Ausbreitung des zytotoxischen Hirnödems unter in vivo-Bedingungen schwierig. Einige Mediatoren der zytotoxischen Zellschwellung konnten in vitro identifiziert werden. Neben der exzitatorischen Aminosäure Glutamat (Schneider,1998), erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen (Walz et al.,1983, Kimelberg et al.,1986, Kempinski et al.,1992) und Arachidonsäure (Staub et al.,1994), stellt auch die Azidose einen Mediator der zytotoxischen Zellschwellung dar (Staub et al.,1990).

	Zytotoxisches Hirnödem	Vasogenes Hirnödem
Ursache	Metabolischer oder toxischer Schaden des Hirnparenchyms	Defekt der Blut-Hirn-Schranke
Mechanismus	Aufnahme von Ionen und Wasser in Gehirnzellen	Penetration von Plasmabestandteilen und Wasser ins Hirnparenchym
Ort der Flüssigkeitsakkumulation	Intrazelluläre Flüssigkeitsakkumulation, Schwellung von Glia und Neuronen	Extrazelluläre Flüssigkeitsakkumulation, Expansion des Interstitiums
Lokalisation	Ödem ist vorwiegend in grauer Substanz lokalisiert	Ödem ist vorwiegend in der weißen Substanz lokalisiert
Eigenschaften der Ödemflüssigkeit	Ödemflüssigkeit besteht v.a. aus Wasser, Na ⁺ und Cl ⁻	Ödemflüssigkeit ist ein proteinreiches Plasmafiltrat

Tab.1: Unterschiede des zytotoxischen und vasogenen Hirnödems

1.3. Mediatoren des sekundären Hirnschadens

Als Mediatoren werden biochemische Substanzen bezeichnet, die sekundär an Pathomechanismen beteiligt sind. Da wie o.a. sehr viele Substanzen in vivo im geschädigten Hirngewebe produziert bzw. liberiert werden, sind strenge Kriterien zur Identifizierung eines Mediators zu fordern:

- Die Applikation der Substanz in vitro oder in vivo muß zur spezifischen Schädigung führen, wie z.B. einem Hirnödem oder zur Schwellung von Gliazellen
- Die Bildung bzw. Freisetzung der Substanz unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. Ischämie oder Trauma muß nachweisbar sein

- Durch Einsatz spezifischer Antagonisten sollte die Freisetzung oder Funktion der Substanz mit einer Verhütung oder zumindest Abschwächung des zerebralen Sekundärschadens einhergehen (Baethmann, 1978, Baethmann et al.,1988)

Eine Vielzahl chemischer Substanzen und Metabolite werden als Mediatoren des zerebralen Sekundärschadens diskutiert. In Betracht kommen zum Beispiel Aminosäuren, wie Aspartat, biogene Amine, wie Histamin und Serotonin, lysosomale Enzyme, Lipoperoxide, Zytokine oder Kaliumionen (Van Harrevold et al.,1971, Kimelberg et al.,1986, Chan et al.,1978, Baethmann et al.,1988, Baethmann et al.,1991, Walz et al.,1985, Ikeda et al.,1989). Es ist bisher jedoch nicht gelungen, für diese Substanzen eine lückenlose Beweisführung in ihrer Eigenschaft als Mediatoren nach o.g. Kriterien zu erbringen.

Die hochungesättigte Arachidonsäure und ihre Metabolite erfüllt wahrscheinlich diese Bedingungen am ehesten (Unterberg et al.,1987, Unterberg et al.,1991, Dhillon et al.,1997, Staub et al.,1994).

Sichere Mediatoren des Sekundärschadens nach genannten Bedingungen sind das Kallikrein-Kinin System (Unterberg et al.,1984, Maier-Hauff et al.,1984a, Unterberg et al.,1986, Rodell, 1996, Wahl et al.,1996), sowie die Aminosäure Glutamat (Baethmann et al.,1988).

1.4. Pathophysiologie des schweren Schädel-Hirntraumas und des Schlaganfalles

Gemäß der heute gültigen Vorstellung werden die Folgen des Schlaganfalles und des schweren Schädel-Hirntraumas auf Grund pathophysiologischer Vorgänge in Primär- und Sekundärschäden eingeteilt.

Als Primärschaden werden Kontusionen, Hämatome, diffuse Axonschäden und Verletzungen des Hirnparenchyms bezeichnet. Der Primärschaden gilt als irreversibel und entzieht sich somit therapeutischer Interventionen.

Als Sekundärschaden werden alle Folgeschäden, die vom Primärschaden ausgehen, bezeichnet. Dieser gilt im Gegensatz zum Primärschaden als potentiell therapierbar.

Zu den Sekundärschäden rechnet man z.B. Hämatome, die durch Einblutungen in das Hirnparenchym entstehen, oder das sogenannte sekundäre Nekrosewachstum, welches die sekundäre Volumenzunahme der primären Nekrose darstellt. Ferner zählen das zytotoxische und das vasogene Hirnödem zu o.g. Sekundärschäden. Diese können sich im weiteren Verlauf über Stunden und Tage bis hin zu Wochen ausbreiten und zu weiteren Hirnparenchymschäden führen (Baethmann et al.,1986).

Als sehr anschauliches klinisches Beispiel für den Sekundärschaden gelten diejenigen Patienten mit schwerem SHT, die nach einer primären, Sekunden bis Minuten andauernden Bewusstlosigkeit ohne erkennbare Störungen aufwachen. Ohne Therapie werden einige dieser Patienten im weiteren Verlauf von Stunden wieder bewusstlos und versterben (Reilly et al.,1975).

Eine vorrangige Manifestation des Sekundärschadens stellt die Entwicklung und konsekutive Ausbreitung des Hirnödems dar (Kempinski et al.,1986). Die im weiteren Verlauf entstehende intrakranielle Raumforderung mit Einklemmung des Gehirns ist vermutlich die Hauptursache der Frühmortalität des Schlaganfalles (Gottstein, 1969). Wird diese akute Phase der Ödementstehung und -ausbreitung überlebt, muß das Hirnödem auch als Ursache für das Auftreten von zusätzlichen neurologischen Defiziten in der Folgezeit in Betracht gezogen werden (Baethmann et al.,1991).

Dabei hängt im Falle des ischämischen Hirnödems, wie bei allen anderen Sekundärschäden auch, das Ausmaß des Ödems vom Umfang des irreversibel gestörten Gewebes ab (Hossmann, 1976). Bereits kurz nach Verschuß eines Hirngefäßes lässt sich in dessen Versorgungsgebiet eine Zunahme des Hirnwassergehaltes nachweisen (Fujiimoto et al.,1976). Ähnlich verhält es sich bei der Entstehung und Ausbreitung des traumatischen Hirnödems, dessen Progredienz von der Schwere des Traumas und dem dadurch verursachten Primärschaden ausgeht.

Das aktuelle Verständnis des Hirnödems beruht auf umfangreichen Kenntnissen molekularer und zellbiologischer Details der Blut-Hirnschranken-Funktion, der zerebralen Mikrozirkulation, der Regulation des Zellvolumens im Gehirn und pathologischer Funktionen toxischer Mediatorsubstanzen (Baethmann et al.,1997).

Wie bereits o.a. ist neben dem Hirnödem das sekundäre Nekrosewachstum eine der wichtigsten Manifestationen des sekundären Hirnschadens. Symon und Mitarbeitern gelang es in experimentellen Untersuchungen an Pavianen zu zeigen, dass sich durch eine Minderperfusion des Gehirns im betroffenen Parenchym zwei verschiedene Zustände einstellen (Symon et al.,1974). Im Zentrum der Minderperfusion findet sich ein

irreversibel geschädigter Infarktkern, die Pannekrose (Astrup et al.,1977). Durch die massiv geminderte Durchblutung kommt es in diesem Areal zum Verlust des Funktions- und Strukturstoffwechsels. In dem Gewebe, das den Infarktkern umgibt, kommt es zur Auslöschung der elektrischen Aktivität. Neurone besitzen jedoch die Fähigkeit, nach der Reperfusion noch lange Zeit zu überleben (Symon et al.,1977, Branston et al.,1974). Diese Zone erloschenen Funktions- aber erhaltenen Strukturstoffwechsels nennt man Penumbra (Astrup et al.,1981). Zahlreiche Untersuchungen der Penumbra haben ergeben, dass diese Region die entscheidende Eigenschaft besitzt, nicht statisch auf ein bestimmtes Gewebegebiet begrenzt zu bleiben, sondern sich über die Zeit auszudehnen (Garcia et al.,1993, Heiss et al.,1992). Abhängig von Durchblutungsgrenzwerten sterben Neurone in diesem Gewebeareal ab oder überleben funktionell inaktiv für eine bestimmte Zeit (Memezowa et al.,1992). Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass der Begriff des sekundären Nekrosewachstums und der Penumbra nicht nur bei der zerebralen Ischämie, sondern auch nach Schädel-Hirn-Trauma eine Rolle spielt (Eriskat et al.,1994). Ausgehend von diesen pathophysiologischen Bedingungen gelten die in der Penumbra ablaufenden Vorgänge als Schlüssel für die Entwicklung neuer erfolgversprechender Therapien nach zerebraler Ischämie und Schädel-Hirn-Trauma (Auer et al.,1988, Eriskat et al.,1994, Fisher et al.,1995, Ginsberg et al.,1994, Hossmann, 1994, Kogure et al.,1997)

1.5. Freie Sauerstoffradikale und das zytotoxisches Hirnödem

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) und deren Abbau. Superoxiddismutasen, Katalasen und Gluthationperoxidasen stellen im Gehirn die wichtigsten Abbaumechanismen dar. Vitamin C, Vitamin E, Melatonin und Harnsäure spielen eine untergeordnete Rolle (Stoffel et al.,1997, Shohami et al.,1997).

Durch Ischämie, Trauma, inflammatorische Prozesse u.v.a. wird dieses Gleichgewicht gestört und freie Sauerstoffradikale können zelluläre Strukturen, wie z.B. Lipoproteinmembranen und Nucleinsäuren, angreifen und zerstören (Demopoulos et al.,1979, Kontos 1985, Kontos et al.,1980, Suzuki et al.,1974, Watson et al.,1984). Der Funktionsstoffwechsel der Zellen kann nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt

konsekutiv zur Ausbildung des zytotoxischen Hirnödems (Chan et al.,1995, Halliwell 1992, Hall 1993, Ikeda et al.,1990, Kontos et al 1986, Siesjö 1993, Siesjö 1996).

Viele Studien der letzten Jahre konnten eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der Ischämie/Trauma, der Bildung freier Sauerstoffradikale und dem zytotoxischen Hirnödem belegen (Yasuma et al.,1997, Fukuhara et al.,1994, Morooka et al.,1994, Takashi et al.,1999, Nishio et al.,1997, Mori et al.,1998, Kazuo et al.,1998, Hall 1993). Obwohl die Mechanismen der Bildung und des Abbaus freier Sauerstoffradikale im Hirngewebe weitgehend bekannt sind, bleibt die Frage ungeklärt, welche Rolle die Radikale bei der Ausbildung des zytotoxischen Hirnödems spielen.

1.6. Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluß freie Sauerstoffradikale auf die Vitalität und das Volumen von suspendierten Gliazellen haben. Dadurch soll geklärt werden, ob freie Sauerstoffradikale Mediatoren des zytotoxischen Hirnödems sind.

Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

1. Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration freier Sauerstoffradikale und der Volumenänderung und Vitalitätsabnahme von Gliazellen
2. Wirkungsunterschiede in der Volumenänderung und der Vitalität von Gliazellen durch Applikation unterschiedlicher freier Sauerstoffradikale (OH^- , H_2O_2 etc.)
3. Wirkung freier Sauerstoffradikale auf die H^+ -Clearance-Funktion von Gliazellen
4. Inhibition der sauerstoffradikalinduzierten Volumenänderung von Gliazellen

Zusammengefasst sollten die durchgeführten Versuche eine mögliche Mediatorfunktion freier Sauerstoffradikale beim zytotoxischen Hirnödem aufdecken und einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen, die der Volumenänderung von Gliazellen zugrunde liegen, leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung und Aufarbeitung von Gliazellen

2.1.1. C6-Gliomzelle

Die in unseren Versuchen verwendeten C6-Gliomzellen wurden von American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen. Es ist dies eine von Benda 1968 etablierte Zelllinie, die einem Methyl-Nitrose-Harnstoff induziertem Tumor der Ratte entstammt (Benda et al., 1968). Unter Kontrollbedingungen verfügt diese Zelllinie über ein sehr homologes Zellvolumen (Paul, 1975).

Darüber hinaus zeigen diese Zellen mehrere Gemeinsamkeiten mit primär kultivierten Astrozyten, wie gliaspezifische Markerproteine (glial fibrillary acidic protein, GFAP) sowie die Glutamin-Synthetase (GS). Membrantransportsysteme für Glutamat, Aspartat und GABA finden sich in beiden Zelllinien, als auch Mechanismen zur regulatorischen Volumenabnahme. Astrozyten, wie auch C6-Gliomzellen, produzieren Prostaglandine und Leukotriene und verfügen über membranständige Austauschsysteme für Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Eine weitere Gemeinsamkeit bildet der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransport (Frangakis et al., 1984).

Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 65 bis 95 verwendet, da C6-Gliomzellen von niedrigerem Passagealter hohe Aktivitäten der Nukleotidphosphorylase (CNP), einem oligodendrozytären Markerenzym, aufweisen. Mit höherem Passagealter nimmt die CNP-Aktivität ab und es zeigt sich eine Zunahme der Glutamin-Synthetase-Aktivität, was der Transdifferenzierung zu einem astrozytären Zelltyp entspricht (Parker et al., 1980).

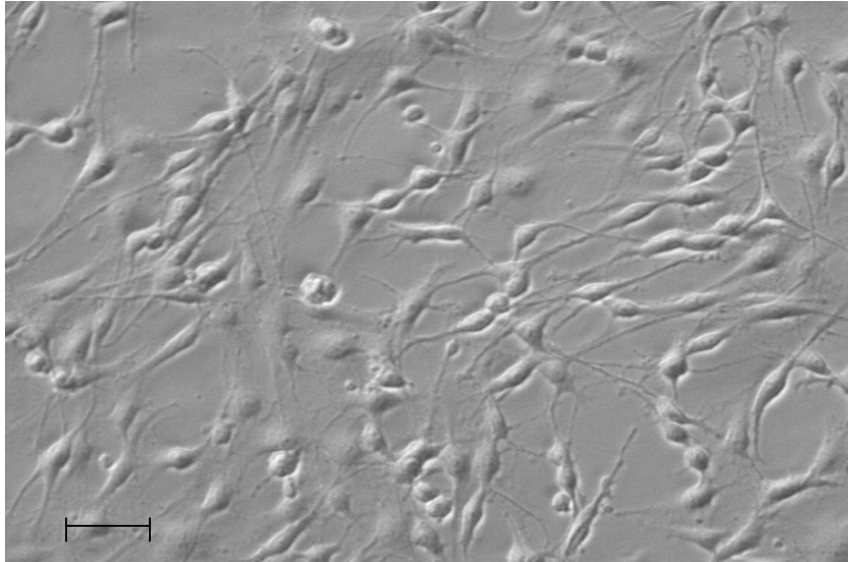


Abb. 1: *C6-Gliomzellen im Durchlichtmikroskop*

Differentielles Interferenzkontrastbild (DIC) von adhaerenten C6-Gliomzellen in der Kulturschale (Eichmaßstab 25 μm).

2.1.2. Zellkultur

Um ausreichende Mengen an Zellmaterial für die Versuche zu erhalten, wurde die Stammpopulation über mehrere Generationen kultiviert und in Aliquots steril eingefroren. Die Aliquots wurden bei Bedarf aufgetaut und für die jeweiligen Untersuchungen weitergesplittet. Die Züchtung der Zellen erfolgte als Monolayer-Zellkultur auf Falcon-Optilux Petrischalen (Falcon 3003, 100 x 20 mm, Falcon, Plymouth, Großbritannien) im Heraeus®-B 5060 EK-002 bei 37°C in geregelter Atmosphäre (5% CO₂, 95% Raumluft).

Eine mögliche Mykoplasmenbesiedelung der Kultur wurde mittels eines Mykoplasmen-Test der Firma Boehringer, Mannheim (Mykoplasmen-Kit, Boehringer, Mannheim) ausgeschlossen.

Als Kulturmedium diente Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, Boehringer Mannheim). Zugewetzt wurden dem Medium 10% fetales Kälberserum (FKS, Boehringer

Mannheim), 100 IU/ml Penicillin G und 50µg/ml Streptomycin. Einen Überblick über die Zusammensetzung des Kulturmediums gibt untenstehende Tabelle 1.

<i>Aminosäuren</i>	<i>mg/l</i>	<i>Vitamine</i>	<i>mg/l</i>
L-Arginin • HCL	84,0	Ca-D (+)-Pantothenat	4,0
L-Cystin • 2 HCL	62,6	Cholinchlorid	4,0
L-Glutamin	584,0	Folsäure	4,0
Glycin	30,0	meso-Inosit	7,0
L-Histidin • HCL • H ₂ O	42,0	Nikotinsäureamid	4,0
L-Isoleucin	104,8	Pyridoxal • HCL	4,0
L-Leucin	104,8	Riboflavin	0,4
L-Lysin • HCL	146,2	Thiamin • HCL	4,0
L-Methionin	30,0		
L-Phenylalanin	66,0	Anorganische Salze	
L-Serin	42,0	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	265,0
L-Threonin	95,2	Fe(NO ₃) ₃ • 9 H ₂ O	0,1
L-Tryptophan	16,0	KCl	400,0
L-Tyrosin	72,0	MgSO ₄ • 9 H ₂ O	200,0
L-Valin	93,6	NaCl	6400,0
		NaHCO ₃	3700,0
Sonstige Substanzen		NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	125,0
D (+)-Glucose • H ₂ O	1100,0		
Natrium-Pyruvat	110,0		
Phenolrot, Natrium	15,9		

Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums DMEM

2.1.3. Subkultivierung der Zellen

Um eine ausreichende Menge an Zellmaterial für die Durchführung der Versuche zu gewinnen, wurden die C6-Gliomzellen täglich subkultiviert.

Initial wurden die Kulturen mit PBS (phosphatgepufferte 0,9%-NaCl-Lösung) zwei mal gespült, um das Medium vollständig von der Zellkultur zu lösen. Danach erfolgte die enzymatische Trennung der Zellen von der Bodenfläche der Petrischalen mittels 1,5 ml/Schale 0,05% Trypsin- 0,02% EDTA (Sigma, Taufkirchen). Diese Trypsinlösung wurde innerhalb einer Minute wieder abgesaugt, um einer möglichen Schädigung der

Zellmembranen durch die Substanz entgegenzuwirken. Durch leichtes Beklopfen der Schalen wird die Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund schon makroskopisch sichtbar. Anschließend wurden die gelösten Zellen in DMEM mit FKS, Penicillin und Streptomycin suspendiert und zur Ablösung von Zelldetritus 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Wiederaufnahme in frischem Medium wurde die Zellzahl im Neubauer-Hämocytometer bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/Schale mit 8 ml Kulturmedium zur weiteren Kultivierung in Petrischalen ausgesät. Die kurze Generationszeit von C6-Gliomzellen erlaubte tägliche Subkultivierungen.

2.1.4. Zellsuspension

Zur Optimierung des Zellwachstums wurde das Kulturmedium am Tag vor der Durchführung des Versuches erneuert. Auf eine weitere Subkultivierung der Zellen wurde, um eine höhere Konfluenz der Zellen und bessere Zellausbeute zu erreichen, verzichtet.

Unmittelbar vor Durchführung des Versuches wurden jeweils 3 Petrischalen mikroskopisch auf Konfluenz überprüft. Durchschnittlich wurde eine Konfluenz der Zellen von ca. 90-100% erreicht. Die C6-Gliomzellen bilden bei gegenseitigem Kontakt Fortsätze aus und haben einen höheren GFAP-Gehalt (Bigamini et al.,1979). Durch Kontakthemmung wird das weitere Zellwachstum eingeschränkt. Die Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären G1- oder G0-Phase. Das sehr homologe Zellvolumen in diesen Phasen erlaubt es Änderungen des Zellvolumens noch exakter zu erfassen (Paul,1975).

Initial wurden die Kulturen von dem Medium befreit und zur vollständigen Ablösung des Mediums anschließend zwei mal mit PBS gespült. Daraufhin erfolgte, wie zuvor beschrieben, die enzymatische Ablösung der Zellen vom Untergrund der Petrischalen mittels Trypsin. Nach raschem Absaugen des Trypsins, um zelluläre Schäden zu vermeiden, folgte die Aufnahme der Zellen in FKS-haltigem DMEM.

Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation der in DMEM gelösten Gliazellen bei 1000 U/min für 3 Minuten. Zwei weitere Zentrifugationsdurchgänge in FKS- und Antibiotika-freiem Medium schlossen sich an. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, daß eine mechanische Zellschädigung weitgehend vermieden wurde.

Die Zellen wurden anschließend entsprechend des Kammervolumens in 14 ml Versuchsmedium (VM = FKS- und Antibiotikafreies DMEM) resuspendiert, durch ein 100 µm dickes Siebgewebe gefiltert und, vor Einbringen der Suspension in die Versuchskammer, die Zellvitalität mittels der Trypanblau-Ausschlussmethode bestimmt.

Das Versuchsmedium wurde aus den zuvor angegebenen Substanzen hergestellt. Es enthielt im Gegensatz zum Kulturmedium keine Antibiotika oder fetales Kälberserum (FKS).

2.2. Versuchsaufbau

2.2.1. Versuchskammer

Die für unsere Versuche verwendete Kammer wurde 1983 von Kempfski und Mitarbeitern am Institut für Chirurgische Forschung entwickelt (Abb. 1)(Kempfski et al.,1983).

Sie ist aus Plexiglas gefertigt und besitzt ein Fassungsvermögen von 14 ml. Am oberen Rand der Kammer sind drei Öffnungen angebracht, durch die Sonden zur Messung der Temperatur und des pH-Wertes des Mediums eingebracht werden können. Eine dritte, etwas größere Öffnung dient zur Verabreichung von Substanzen oder Pharmaka, wie z.B. freier Sauerstoffradikale, oder zur Entnahme der Proben zur Zellvolumenmessung und Bestimmung der Zellvitalität.

In der Kammer befindet sich ein gewundener, gaspermeabler Silikonschlauch, der nach dem Prinzip eines Membranoxygenators die suspendierten Zellen mit Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff in physiologischen Konzentrationen versorgt. Ein im Zentrum der Versuchskammer angebrachter, teflonummantelter Magnetrührer gewährleistet die Homogenität der Suspension und verhindert gleichzeitig die Sedimentation der Zellen in der Kammer. Zudem soll durch die Teflonbeschichtung eine mechanische Schädigung der Zellen selbst vermieden werden.

Die Temperatur der Suspension wurde in unseren Versuchen über ein an der Rückwand der Kammer angeschlossenes Wasserbad mit Umwälzpumpe konstant bei 37°C gehalten. Die Temperatur wurde kontinuierlich über o.g. Messsonde kontrolliert.

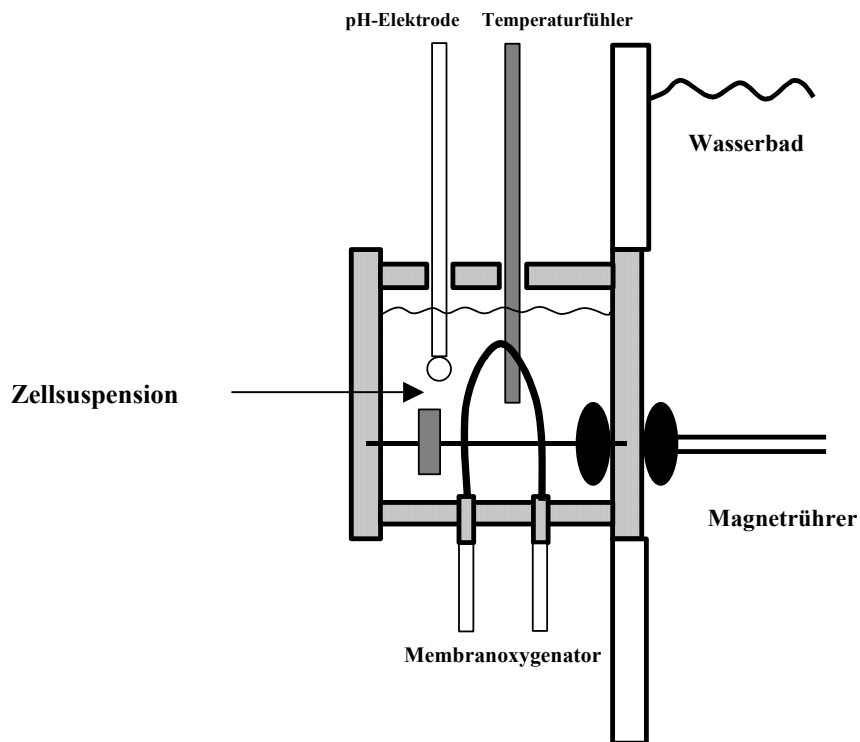


Abb. 2: *Schematische Darstellung der Versuchskammer*

Die Darstellung zeigt die Suspensionskammer im seitlichen Schnitt. Die Temperatur wird über ein an der Rückseite der Kammer montiertes Wasserbad konstant bei 37°C gehalten. Die Begasung der Suspension erfolgt über einen gewundenen Silikonschlauch, der als Membranoxygenator fungiert. Über die Öffnungen an der Oberseite der Kammer werden Sonden zur Kontrolle der Temperatur und des pH-Wertes in die Suspension eingebracht. Der Magnetrührer verhindert eine Sedimentation der Zellen an der Kammerwand.

2.2.2. Kontrolle der Versuchsbedingungen

Der extrazelluläre pH-Wert der Zellsuspension wurde, wie zuvor erwähnt, kontinuierlich gemessen. Die Messungen erfolgten mit einer pH-Elektrode (Inlab 420, Mettler Toledo, Gießen), die an ein pH-Meter angeschlossen war (Delta 350, Mettler Toledo, Gießen). Vor der Durchführung der Versuche wurde die Sonde kalibriert und über eine der Öffnungen an der Oberseite der Kammer in die Zellsuspension eingebracht. Über die Zufuhr von CO₂ in die Suspension wurde der pH_e-Wert während der gesamten Versuchsdauer zwischen 7,35 und 7,45 konstant gehalten.

Wie auch der pH-Wert, wurde die Temperatur während des gesamten Versuches kontinuierlich kontrolliert und konstant bei 37°C gehalten. Die Erfassung der Temperatur erfolgte über eine weitere Sonde, die ebenfalls über eine der Öffnungen in die Kammer eingebracht wurde und mit dem Temperatureingang des zuvor beschriebenen pH-Meters (Delta 350, Mettler Toledo, Gießen) verbunden war.

2.2.3. Durchflußzytometrie

Das für die Bestimmung der Zielmeßgröße „Zellvolumen“ vorliegende Gerät Metrizell® (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz) wurde von der Arbeitsgruppe Kachel im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried entwickelt (Kachel,1976, Kachel et al.,1977). Die Messung des Zellvolumens erfolgt durchflußzytometrisch nach dem Coulter-Prinzip. Dieses Verfahren findet im klinischen Alltag im Labor zur Zählung und Volumenbestimmung von Erythrozyten und Leukozyten breite Anwendung.

2.2.3.1. Coulter-Prinzip

Grundlage dieses Verfahrens bildet der Messkopf, der aus zwei Flüssigkeitskompartimenten besteht. Diese sind durch die Coulter-Apertur miteinander verbunden. Über beiden Kompartimenten wird ein Gleichstrom von 45µA konstant gehalten. Die verwendete Meßapertur hat in unseren Versuchsreihen einen Durchmesser von 100 µm, wobei jedoch auch andere Durchmessergrößen herangezogen werden können.

Der Messvorgang erfolgt durch Einbringen der Zellsuspension in einen Vorratsbehälter. Mittels eines angelegten Unterdruckes werden die Zellen durch die Coulter-Apertur in das anfänglich zellfreie Kompartiment gesaugt.

Beim Durchtritt einer Zelle durch die Apertur erhöht sich dort der elektrische Widerstand (R). Bei konstanter Stromstärke wird so der als Volumensignal gemessene Spannungsimpuls (ΔU) erzeugt (Kachel et al.,1990). Gemäß dem Ohm'schen Gesetz resultiert die Änderung des Widerstandes (ΔR) in einem Spannungsimpuls (Formel 1).

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

Formel 1: Spannungsimpuls beim Durchtritt einer Zelle durch die Meßapertur

Coulter entwickelte dieses Verfahren zunächst zur Zählung suspendierter Partikel (Coulter, 1953). Später beschrieb er anhand dieses Prinzips auch die Möglichkeit zur Größenbestimmung von Zellen (Coulter, 1956). Er postulierte, dass gemäß der Maxwell'schen Gleichung, der beim Partikeldurchtritt entstehende Spannungsimpuls direkt proportional zum Volumen des Partikels ist.

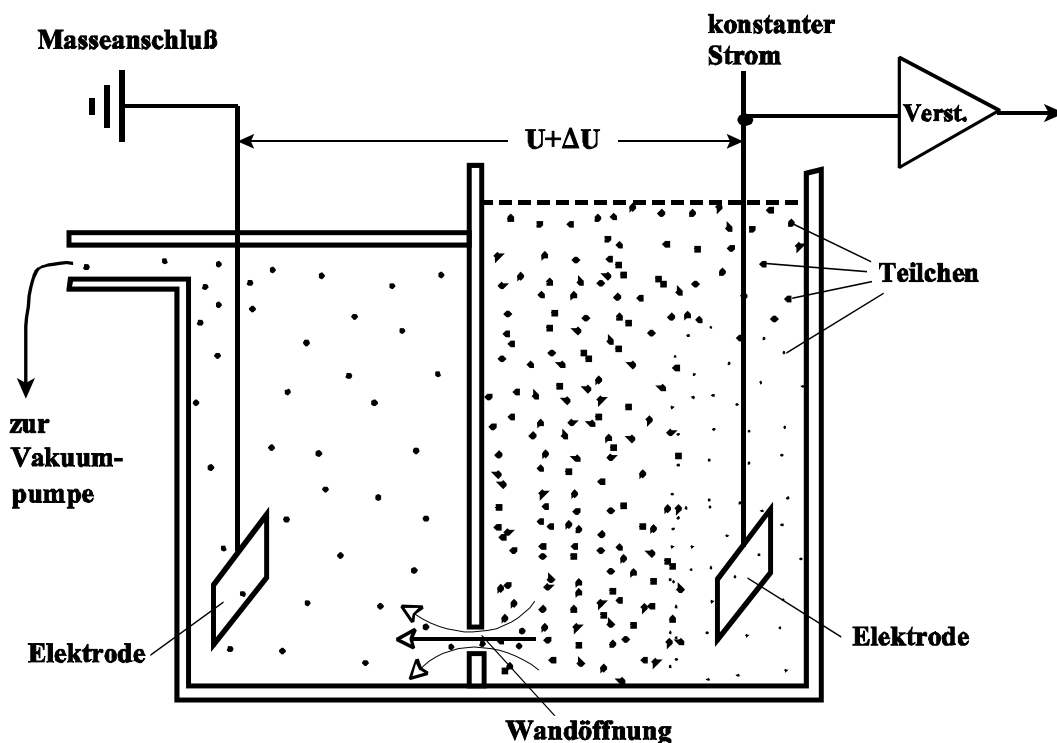


Abb. 3: Schematisierte Darstellung des Coulter-Prinzips

Zwei mit Elektrolyten angefüllte Kompartimente stehen über eine Messöffnung definierter Geometrie, miteinander in Verbindung. In beide Kompartimente sind Elektroden eingebracht, zwischen denen ein konstanter Gleichstrom von $45\mu A$ fließt. Beim Durchtritt eines Partikels durch die Messöffnung steigt der elektrische Widerstand zwischen den Elektroden vorübergehend an. Nach dem Ohm'schen Gesetz resultiert die Änderung des Widerstandes in einem Spannungsimpuls, der proportional zum Volumen des Partikels ist.

In der Folgezeit wurde evident, dass weitere Faktoren, wie Form und Widerstand der Partikel, Widerstand des Mediums und die Geometrie der Messöffnung, mit einbezogen werden müssen (Kachel,1973). Die elektrische Leitfähigkeit der Zellen muß im Formfaktor ebenfalls berücksichtigt werden, auch wenn diese Größe im Vergleich zur Leitfähigkeit des Mediums als unendlich klein vernachlässigt werden könnte. So findet nach Berücksichtigung dieser Parameter zur Berechnung des Zellvolumens die nach Grover modifizierte Maxwell'sche Gleichung Anwendung (Grover et al.,1969)(Formel 2).

$$V = \Delta U \cdot \frac{q \cdot f_k}{p \cdot I \cdot F}$$

Formel 2: Berechnung des Zellvolumens (Kachel,1976).

V: Zellvolumen

q: Querschnitt der Meßapertur

f_k : Korrekturfaktor für die Apertur (Verhältnis Länge/Querschnitt)

I: Stromstärke

F: geometrischer Formfaktor (Verhältnis Länge/Durchmesser), Leitfähigkeit der Zelle

p: spezifischer Widerstand des Mediums

U: gemessener Spannungsimpuls

2.2.3.2. Hydrodynamische Fokussierung

Das Gerät Metrizell verfügt über die „hydrodynamische Fokussierung“, die eine weitere Verbesserung der Volumenmessung gegenüber herkömmlichen Geräten darstellt. Durch die Fokussierung werden die Zellen in die Zentralachse der Coulter-Apertur „zentriert“, indem sie durch die Suspension mit partikelfreiem Medium umhüllt werden (Kachel,1976). Die Qualität des gemessenen Spannungsimpulses wird durch dieses Prinzip optimiert und erlaubt Änderungen des Zellvolumens von 1-2% zu erfassen.

Die Geschwindigkeit des Partikelstromes durch die Coulter-Apertur wird über die Höhe der Hüllflüssigkeit geregelt und über den Versuchszeitraum so eingestellt, dass ca. 1000-1500 Zellen pro Sekunde die Öffnung passieren. Bei jeder Messung durchströmen insgesamt etwa

Darüber hinaus ermittelt der Rechner das arithmetische Mittel mit Standardabweichung, Median und den Modus der Volumenverteilung. Das Modusvolumen setzt sich aus dem, aus 10 Kanälen berechnetem Maximum, zusammen.

Das Gerät ist nicht in der Lage, einzelne Zellen von Zellaggregaten, die durch die Apertur laufen, zu differenzieren. Eine große Zelle kann demzufolge den gleichen Impuls auslösen, wie ein Aggregat vieler kleinerer Zellen. Somit eignet sich das arithmetische Mittel nicht zur Bestimmung des mittleren Zellvolumens. Mit viel größerer Präzision, da unempfindlicher gegen statistische Abweichungen durch Partikelaggregate, gibt der Modus das mittlere Zellvolumen wieder. Für unsere Versuchsreihen zogen wir deshalb das Modusvolumen heran. Er errechnet sich aus den zehn häufigsten Klassen des Histogramms.

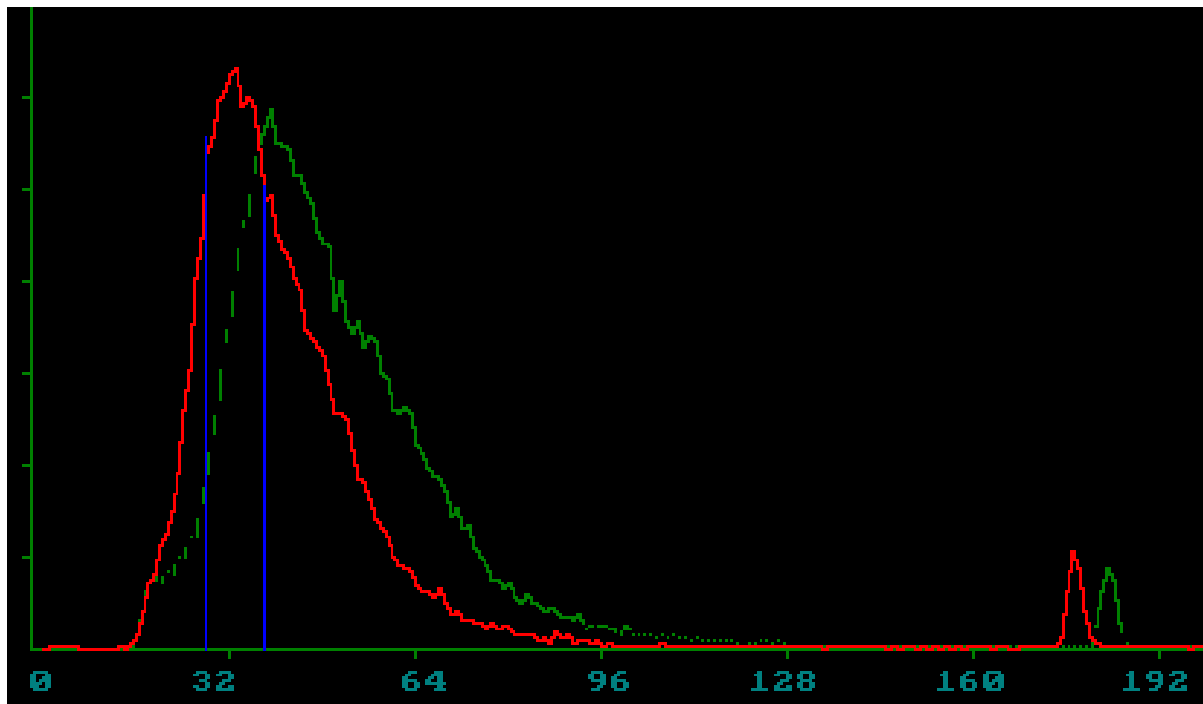


Abb.5: Volumenverteilung von C6-Gliomzellen

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives 1-Parameter Volumenhistogramm von C6-Gliomzellen, das mit der Software Cytdata erstellt wurde. Der Meßbereich kann in bis zu 512 Kanäle aufgeteilt werden. Mittelwert und Standardabweichung können für die gesamte Volumenverteilung, als auch für einzelne Volumenbereiche des Histogramms berechnet werden. Eich- und Messpeak sind rechts auf der Abszisse aufgetragen.

2.3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Allgemeiner Versuchsablauf

Die C6-Gliomzellen wurden nach dem oben genannten Verfahren geerntet. Nach Suspension in DMEM ohne FKS und Antibiotika (VM) wurden sie in die Versuchskammer eingebracht. Der pH-Wert des mit Bikarbonat gepufferten Versuchsmediums wurde durch Anpassung des CO₂-Anteils des Begasungsgemisches über den Silikonschlauch auf 7,4 eingestellt und über den Beobachtungszeitraum konstant gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck wurde so geregelt, dass er während des gesamten Versuchs über 100 mmHg betrug. Die Temperatur wurde über das an der Rückseite der Versuchskammer liegende Wasserbad bei 37°C konstant gehalten.

Im Laufe der Versuche wurden der Zellsuspension wiederholt Proben zur Bestimmung des Zellvolumens und der Vitalität entnommen.

Der eigentlichen Versuchsphase ging eine 30-minütige Kontrollphase voraus, in der nach Äquilibrierung der Versuchsbedingungen das mittlere Zellvolumen bestimmt wurde (Abb.6). In der Kontrollphase wurde sichergestellt, dass das Volumen der suspendierten Gliazellen vor Zugabe von freien Sauerstoffradikalen oder anderer Pharmaka, einen konstanten Ausgangswert erreicht hatte. Unmittelbar nach Einbringen der Zellsuspension in die Versuchskammer zeigten sich regelmäßig Schwankungen der Zellvolumina, die sich nach 20-30 minütiger Dauer nivellierten und homologe Volumina erreichten. Die letzten drei Meßwerte des Zellvolumens vor Beginn der Versuchsphase wurden gemittelt und als Referenzwert (100%) für die folgenden Volumenmessungen herangezogen.

An die Kontrollphase schloss sich eine 120 Minuten dauernde Testphase an, in der die Wirkung des oxidativen Stresses auf das Zellvolumen und die Zellvitalität der C6-Gliomzellen untersucht wurde. Hierzu wählten wir unterschiedliche Formen der Stressinduktion. Zunächst untersuchten wir den direkten Einfluß von Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Perhydrol[®] zur Zellsuspension. Als extrazellulär superoxidationengenerierendes System wurde das Enzym Xanthinoxidase mit seinem Substrat Hypoxanthin zugegeben, als intrazellulär superoxidationengenerierendes System das Pharmakon Menadion. Alle verwendeten Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen so zugegeben, dass sie in der Plexiglaskammer als Endkonzentrationen vorlagen.

2.3.2. Versuchsprotokoll

Eine schematisierte Übersicht über den allgemeinen Versuchsablauf zeigt das Versuchsprotokoll in Abbildung 6.

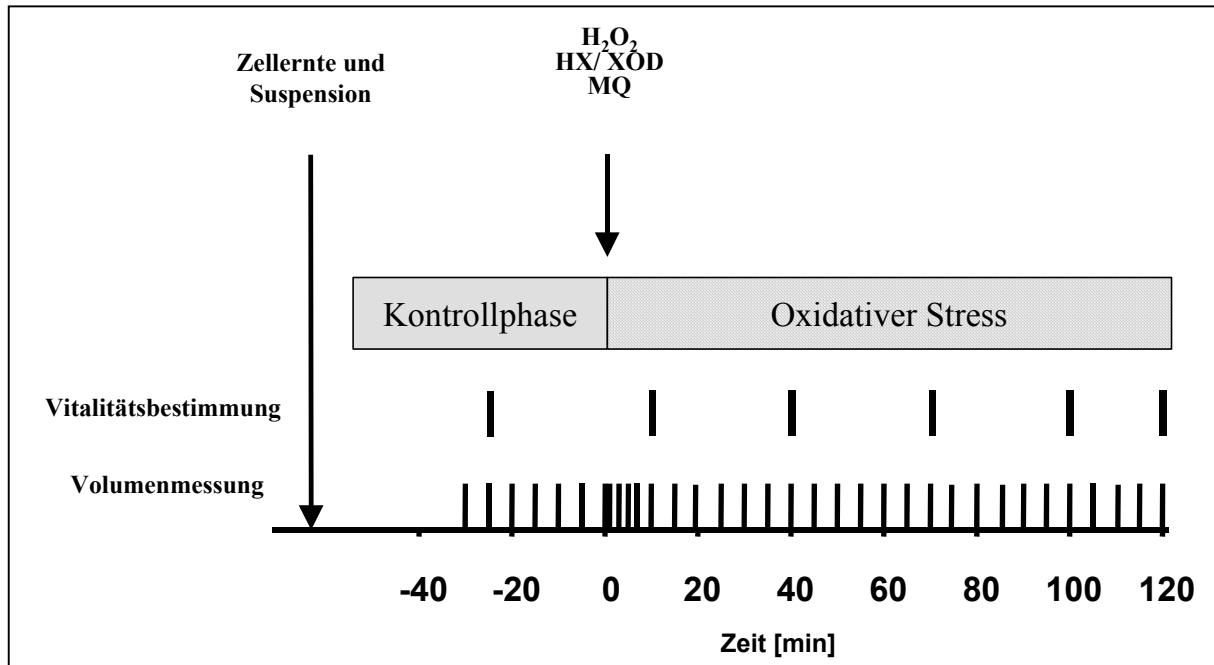


Abb. 6: Versuchsprotokoll

Nach einer Kontrollphase zur Stabilisierung der Versuchsbedingungen und Erhalt einer homogenen Volumenverteilung, wurden der Zellsuspension freie Sauerstoffradikale in unterschiedlichen Formen und Endkonzentrationen zugegeben. Zur Bestimmung des Zellvolumens wurden der Versuchskammer nach den dargestellten Zeitpunkten Proben entnommen. Der Mittelwert der letzten drei Messungen vor der Versuchsphase wurde als Referenz herangezogen. Die Vitalität wurde in 30-minütigen Abständen bestimmt.

2.4. Versuchsgruppen

2.4.1. Kontrollgruppen

Wie schon erwähnt, war das Versuchsmedium frei von Antibiotika und FKS, während das Kulturmedium diese Bestandteile enthielt. Deshalb war es notwendig, in Kontrollserien die

Stabilität des Zellvolumens von C6-Gliomzellen nach Inkubation im Versuchsmedium zu untersuchen.

Der Beobachtungszeitraum und die Versuchsanordnung entsprach grundsätzlich den Versuchsgruppen unter oxidativem Stress.

Die Suspensionsparameter wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant gehalten, um mögliche Auswirkungen des Versuchsmediums auf die Zellvolumenkontrolle zu erfassen.

In den Kombinationsversuchen mit Zugabe des sauerstoffradikalgenerierenden Systems Xanthinoxidase mit seinem Substrat Hypoxanthin unter azidotischen Verhältnissen (pH 6,8), wurden als Kontrollserien Zellvolumenänderungen unter Azidose herangezogen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Zellsuspension vor der Induktion des oxidativen Stesses durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase, der Inhibitor des Na^+/H^+ -Austauschers Amilorid zugegeben. Als Kontrollgruppe für diese Versuche diente eine zweite Versuchsreihe unter dem Einfluß von Hypoxanthin/Xanthinoxidase.

2.4.2. Versuchsgruppen mit Wasserstoffperoxid-Exposition

Zur Prüfung der Wirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf die Vitalität und das Zellvolumen von C6-Gliomzellen wurden unterschiedliche Konzentrationen von Perhydrol[®] (30% H_2O_2 , Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt) in Vorversuchen ausgetestet. Wir wählten hierzu die Endkonzentrationen von 0,1, 0,5, 1,0 und 5,0 mM. Bis auf 5,0 mM handelt es sich dabei um Konzentrationen, wie sie in vivo nach einer Ischämie in der Reperfusionsphase nachgewiesen werden konnten (Bolli,1989, Granger et al.,1995).

2.4.3. Versuchsgruppen mit Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Exposition

Den Einfluß eines extrazellulär superoxidationengenerierenden Systems untersuchten wir anhand der Zugabe von Xanthinoxidase (XOD) mit ihrem Substrat Hypoxanthin (HX).

Xanthinoxidase weist als Enzym ein hohes Molekulargewicht von 275 000 KD auf und kann deshalb die Zellmembran nicht passieren.

Die Xanthinoxidase katalysiert im Abbau der Purine zwei Reaktionsschritte. Zum einen die Umwandlung von Adenosin zu Xanthin und in einem weiteren Schritt die Umwandlung von

Xanthin in Harnsäure, dem Endprodukt des Purinabbaus. In beiden Reaktionen entsteht als Nebenprodukt das Superoxidradikal (O_2^-)(Löffler et al.,1985).

Im postischämischen Gewebe wird die Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase umgewandelt. Diese ist gleichsam die aktive Form des Enzyms, das Superoxidanionen generiert und es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass die Produktion von XOD einen wichtigen Mechanismus in der Zellschädigung nach Ischämie darstellt (McCord,1985).

Hypoxanthin und Xanthinoxidase bezogen wir von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen. Die Xanthinoxidase stammte aus Buttermilch und lag als lyophilisiertes Pulver vor. Es enthält 15% Protein, 0,5 % Natrium-Salicylate und < 50 ppm Phosphat. 25 Units wurden in 12,5 ml PBS aufgenommen und in 100 μ l-Portionen in Reaktionsgefäßen bis zum Versuch bei -20°C eingefroren.

Hypoxanthin (6-Hydroxypurin, $C_5H_4N_4O$) wurde als 100 mM Lösung in PBS und 10 M NaOH aufgenommen und wie XOD bis zum Versuch bei -20°C tiefgefroren. Da durch die Zugabe von 10 M NaOH die Substanz stark alkalisch wurde, musste nach Auftauen zur Neutralisation 5 μ l 6N HCl zugegeben werden, bevor die Substanz in die Zellsuspension pipetiert wurde.

Um mögliche Dosis-Wirkungsbeziehungen untersuchen zu können, gaben wir der Zellsuspension Xanthinoxidase in den Konzentrationen 10 und 20 mU/ml, bei gleichbleibender Konzentration von Hypoxanthin 1mM, zu. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

2.4.4. Versuchsgruppen mit Menadion-Exposition

Menadion wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, als Pulver bezogen.

Vit. K3, 2 Methyl-1,4-Naphtochinon ist ein rein synthetisches Produkt. Es gehört zur Reihe der Vitamin K-aktiven Substanzen, wobei es sich um ein Derivat des 2-Methyl-1,4-Naphtochinons (Menadion) handelt. Die Substanz Menadion kristallisiert in Form gelber Nadeln, ist gegenüber Sauerstoff stabil, zersetzt sich jedoch bei Belichtung. Um dieser Zersetzung entgegenzuwirken, wurde, wie auch bei den Versuchen mit Wasserstoffperoxid und Hypoxanthin/Xanthinoxidase, die Suspensionskammer mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig abgedunkelt.

Wir applizierten Menadion in den Endkonzentrationen von 25 und 50 μ M, um mögliche Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erarbeiten.

Im Gegensatz zu dem Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System, das die Zellmembranen nicht passieren kann, kann Menadion die Zellmembranen permeieren und generiert intrazellulär Superoxidanionen (O_2^-) (Beloqui et al., 1985, Bellomo et al., 1990, Thor et al., 1982, Doroshov, 1986, Nutter et al., 1992).

Obwohl Chinone intrazellulär direkt durch z.B. Ascorbinsäure oder GSH (Glutathionreduktase) reduziert werden können, wird der Großteil der Chinone enzymatisch durch Flavoproteine in einem ein- oder zwei-Elektronen-Transfer reduziert. Die ein-Elektronen-Reduktion resultiert in der Bildung des Semichinon-Radikals, das eine hohe Affinität zu Sauerstoff besitzt und diesen zu Superoxidanionen (O_2^-) reduziert (Thor et al., 1982).

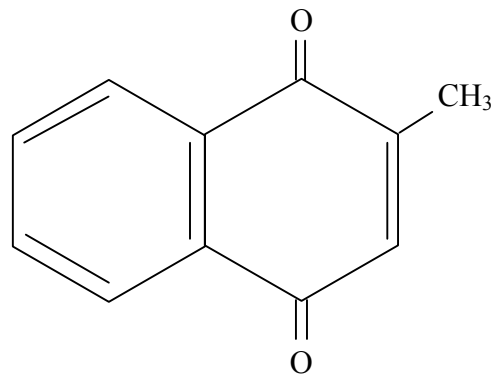


Abb. 7: **Strukturformel Menadion**

2.4.5. Versuchsgruppen mit kombiniertem Einfluß von Azidose und HX/XOD

Die extrazelluläre Laktatazidose, induziert durch Zugabe isotoner Milchsäure zur Zellsuspension, konnte in unserer Arbeitsgruppe als ein Mediator der Gliazellschwellung *in vitro* identifiziert werden (Kempski et al., 1988). In der Studie von Kempski und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass durch Verschiebung des extrazellulären pH (pH_e) auf 6,8, die Zellvolumenzunahme innerhalb der ersten drei Minuten nach Zugabe der Milchsäure 113% des Ausgangswertes erreichte. In einer weiteren Versuchsreihe wollten wir den kombinierten Einfluß der Azidose (pH 6,8), zusammen mit dem Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System (1 mM HX, 10 mU/ml XOD) auf die Zellvolumenkontrolle und Vitalität untersuchen. Als Kontrollserie diente für diese Versuche eine Gruppe unter dem Einfluß von Laktazidose (pH 6,8). Die Azidose wurde durch Zugabe von 6N HCl (307 mosmmol) induziert.

Zur Durchführung dieser Versuchsreihe musste der Versuchsablauf geringfügig modifiziert werden. Nach Stabilisierung der Versuchsbedingungen und Bestimmung des Ausgangszellvolumens erfolgte zunächst die Applikation der Xanthinoxidase mit ihrem Substrat Hypoxanthin. Nach 5 Minuten folgte eine weitere Volumenmessung. Unmittelbar im Anschluß an diese Messung wurde die Laktazidose induziert. Der weitere Versuchsablauf entsprach o.a. Versuchsprotokoll.

2.4.6. Versuchsgruppen mit kombiniertem Einfluß von Amilorid und HX/XOD

In einer letzten Versuchsreihe versuchten wir den, der Volumenabnahme von C6-Gliomzellen unter oxidativem Stress zugrundeliegenden Mechanismen, einen Schritt näher zu kommen.

Zu diesem Zweck applizierten wir nach Stabilisierung der Versuchsbedingungen zu der Zellsuspension einen selektiven Inhibitor des Na^+/H^+ -Antiporters, das 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{ClN}_7\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) (Abrahamse et al., 1994).

Nach weiteren drei Volumenmessungen in der Kontrollphase wurde anschließend der oxidative Stress abermals in Form des Superoxidanionen-produzierenden Systems Hypoxanthin/ Xanthinoxidase (1mM HX/ 10 mU/ml XOD) induziert. Die Applikation von Amilorid erfolgte 10 Minuten vor Induktion des oxidativen Stresses, um Eigenwirkungen der Substanz zu untersuchen. Die Testphase wurde ebenfalls wieder dem o.a. Versuchsprofil angeglichen.

2.4.7. Zusammenfassende Übersicht der Versuchsgruppen

Substanz	Endkonzentration	Radikalart	Wirkort
H ₂ O ₂	0.1 mM	H ₂ O ₂	extrazellulär
H ₂ O ₂	0.5 mM	H ₂ O ₂	extrazellulär
H ₂ O ₂	1.0 mM	H ₂ O ₂	extrazellulär
H ₂ O ₂	5.0 mM	H ₂ O ₂	extrazellulär
HX/XOD	1/10 mM/mU/ml	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
HX/XOD	1/20 mM/mU/ml	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
HX	1.0 mM	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
XOD	10 mU/ml	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
HX/XOD/EIPA	1/10/50 mM/mU/ml/mM	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
HX/XOD/AZIDOSE	1/10/6.8	O ₂ ⁻ (OH ⁻)	extrazellulär
MQ	25 µM	O ₂ ⁻	intrazellulär
MQ	50 µM	O ₂ ⁻	intrazellulär

Tab. 3: Induktion des Oxidativen Stresses

H₂O₂ gilt im eigentlichen Sinne nicht als Sauerstoffradikal, da es kein freies Elektron in seiner Schale aufweist. Die Bildung von Hydroxylradikalen entsteht über die Fenton-Reaktion durch die Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺.

Durch Zugabe von Xanthinoxidase und seinem Substrat Hypoxanthin zur Zellsuspension wird in zwei Schritten der Umsatz von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure katalysiert. In beiden Schritten werden Superoxidanionen gebildet. Diese Generation von freien Sauerstoffradikalen findet **extrazellulär** statt, da die Xanthinoxidase aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes die Zellmembranen nicht passieren kann.

Im Gegensatz dazu kann Menadion die Zellmembranen passieren und die Bildung von Superoxidanionen erfolgt **intrazellulär**.

2.5. Bestimmung der Zellvitalität

Von großer Bedeutung zur Durchführung der Versuche ist die Bestimmung der Zellvitalität. Bei der Trypanblau-Ausschluß-Methode wurde der Zellsuspension der gefilterte Farbstoff in einer Konzentration von 2% zugegeben. Hiermit färben sich nur abgestorbene Zellen blau an, da die toten Zellen den Farbstoff nicht in den Extrazellulärraum transportieren können (Evans et al.,1914, Pappenheimer,1917, Phillips,1973). Alle Zellen, die nach 3 Minuten nicht angefärbt sind, gelten als vital, blaue Zellen dagegen als avital. Zur Ermittlung des Anteils avitaler Zellen wurden 16 Felder im Neubauer-Hämatozytometer unter dem Mikroskop ausgezählt und das Verhältnis aus vitalen zu avitalen Zellen gebildet. Die Versuche wurden nur dann durchgeführt, wenn zu Beginn mehr als 90% der Zellen vital waren.

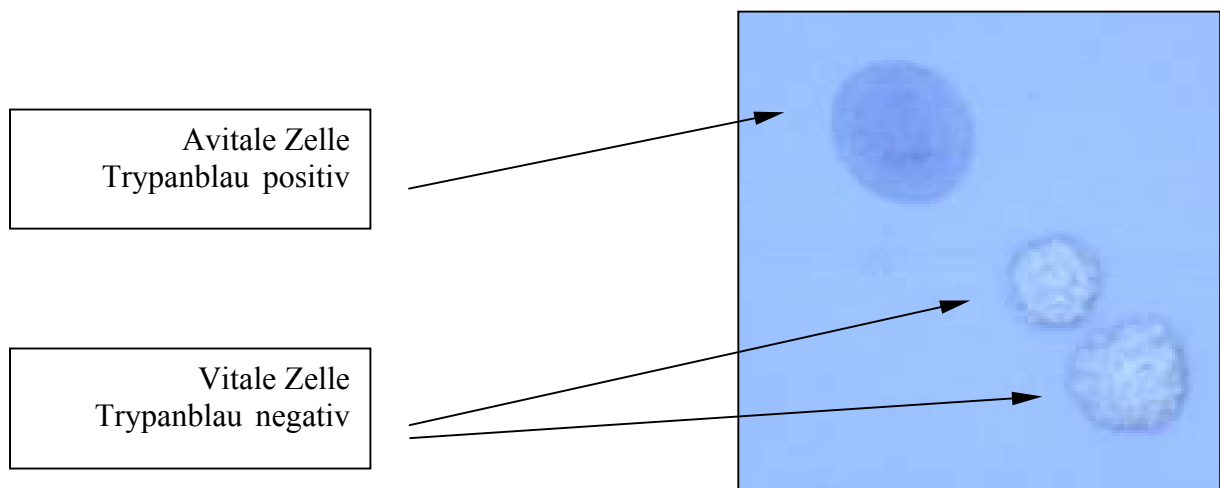


Abb. 8: Vitalitätsnachweis nach der Trypanblau-Ausschluß-Methode

In dieser Darstellung findet sich in der oberen Bildhälfte eine avitale Zelle (Trypanblau-positiv), in der unteren Bildhälfte kommen zwei vitale Zellen (Trypanblau-negativ) zur Darstellung.

2.6. Auswertung und Statistik

Nach Durchführung der Versuche wurden die erhobenen Daten in „Spread-Sheets“ des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft-Excel (Microsoft, Unterschleißheim) eingetragen. Aus diesen Rohdaten wurden anschließend die Zellvolumina, sowie die Vitalität der Zellen errechnet. Nach der Übertragung der Daten in das Programm SigmaPlot 5.0 erfolgte die graphische Darstellung (Jandel Scientific, Erkrath) an einer Digital Personal

Workstation Pentium Pro 200i (Digital, München). In den Abbildungen aufgeführt ist die Anzahl (n) der einzelnen Versuche. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aufgeführt.

Die übrigen Darstellungen wurden mit den Programmen Microsoft-Powerpoint und Microsoft-Word 2000 (Microsoft, Unterschleißheim) erarbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, Erkrath). Es wurden Varianzanalysen für unverbundene, nicht-parametrische Stichproben angewendet. Innerhalb einer Gruppe wurde der Friedman Test (repeated measures ANOVA on ranks) zur Probe auf globale Signifikanz herangezogen.

Ergaben sich signifikante Unterschiede, wurde zum Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe der Dunnett`s post hoc Test durchgeführt. Schließlich wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test zum Vergleich zweier Gruppen angewendet.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurde die Nullhypothese abgelehnt.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollversuche

Das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen und primär kultivierter Astrozyten ändert sich, in aminosäurehaltigem Kulturmedium, wie das in unseren Versuchen verwendete DMEM, im Verlauf von mehreren Stunden nicht (Kempski et al.,1988, Kempski et al.,1987c, Kempski et al.,1988b).

Wichtigste Voraussetzung ist die Konstanthaltung der Suspensionsparameter in physiologischen Normgrenzen über die gesamte Versuchsdauer hinweg.

Das Zellvolumen wird in % des Ausgangswertes auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse dargestellt. Die Kontrollphase zur Bestimmung des relativen Ausgangszellvolumens in % ist durch ein Minuszeichen vor der Zeitangabe gekennzeichnet. Das, aus dem Mittelwert der letzten drei Volumenmessungen vor dem Zeitpunkt 0 ermittelte Zellvolumen, wurde für alle weiteren Messungen als Referenzwert herangezogen und als 100% festgelegt. Alle im Folgenden gemessenen Zellvolumina wurden prozentual auf das Ausgangszellvolumen bezogen. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Induktion des oxidativen Stresses in den Versuchsgruppen. Kreise und andere geometrische Figuren, wie Dreiecke oder Quadrate, repräsentieren den Mittelwert aus den Einzelversuchen. Die Anzahl der Einzelversuche wird durch den Buchstaben n wiedergegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die Testphase erstreckt sich jeweils über einen Zeitraum von 120 Minuten. Signifikante Änderungen der Zellvolumina werden mit einem Sternchen (*), oder anhand einer eckigen Klammer, wenn diese über einen längeren, zusammenhängenden Zeitraum andauern, gekennzeichnet. Die Darstellungsweise der Diagramme wird in allen Abbildungen beibehalten.

Während der Inkubation der suspendierten Zellen in der Kammer unter konstanten Versuchsbedingungen mit einem pH~7,4, einem pO₂~100 mmHg und einer Temperatur ~37°C, kam es auch in unseren Versuchen zu keiner statistisch signifikanten Volumenänderung über den gesamten Beobachtungszeitraum, im Vergleich zum Ausgangszellvolumen (n=9; nicht signifikant vs. Ausgangswert) (Abb. 9). Die pH-Änderungen im Laufe der Testphase schwankten zwischen den Werten 7,38 ± 0,01 und 7,41 ± 0,01. Die Änderungen zeigten keine statistische Signifikanz (Abb. 9).

3.2. Wirkung von H₂O₂ auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen

Ebenfalls in Abb. 9 dargestellt ist die Wirkung von 0,1 mM H₂O₂ auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen (gefüllte Kreise). Die beobachteten Volumenänderungen in der Testphase waren statistisch nicht signifikant.

Im zweiten Diagramm der Abbildung 9 wird die Wirkung von 0,5 mM H₂O₂ auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen dargestellt. Nach einer 30 Minuten andauernden Kontrollphase kam es durch Zugabe des Wasserstoffperoxids in einer Endkonzentration von 0,5 mM zu einer raschen Volumenabnahme der Zellen. Die Volumenabnahme war bereits ab der ersten Minute nach Induktion des oxidativen Stresses zu erkennen. Das Minimalvolumen von $94,3 \pm 1,5\%$ wurde nach 15 Minuten erreicht und ist statistisch signifikant, wie auch die Volumenänderungen zum Zeitpunkt von 10 und 25 Minuten nach Stressinduktion.

Im weiteren Verlauf der Testphase zeigte sich eine, im Vergleich zur Volumenabnahme langsamere Zunahme des Zellvolumens, die nach 80 Minuten das Ausgangszellvolumen wieder erreicht.

Im Gegensatz zu den Testversuchen nach Applikation von 0,1 mM H₂O₂, zeigte sich ab einer Dosis von 0,5 mM H₂O₂ eine Zellvolumenänderung. Die Kinetik der Volumenänderung stellt sich in einem biphasischen Verlauf mit einer anfänglichen Zellschrumpfung und anschließendem Wiederanstieg des Zellvolumens dar.

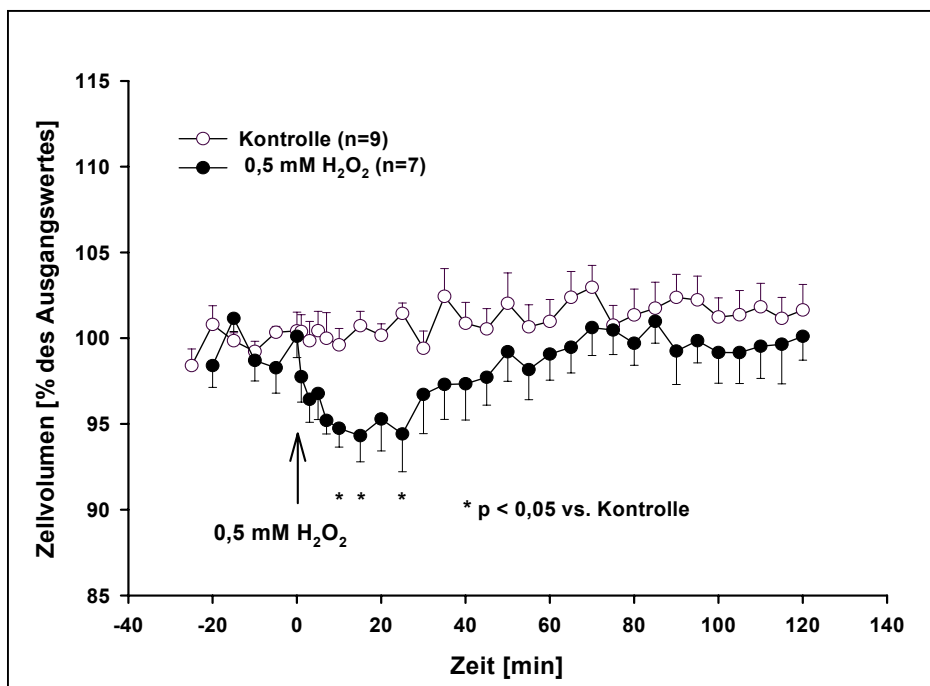
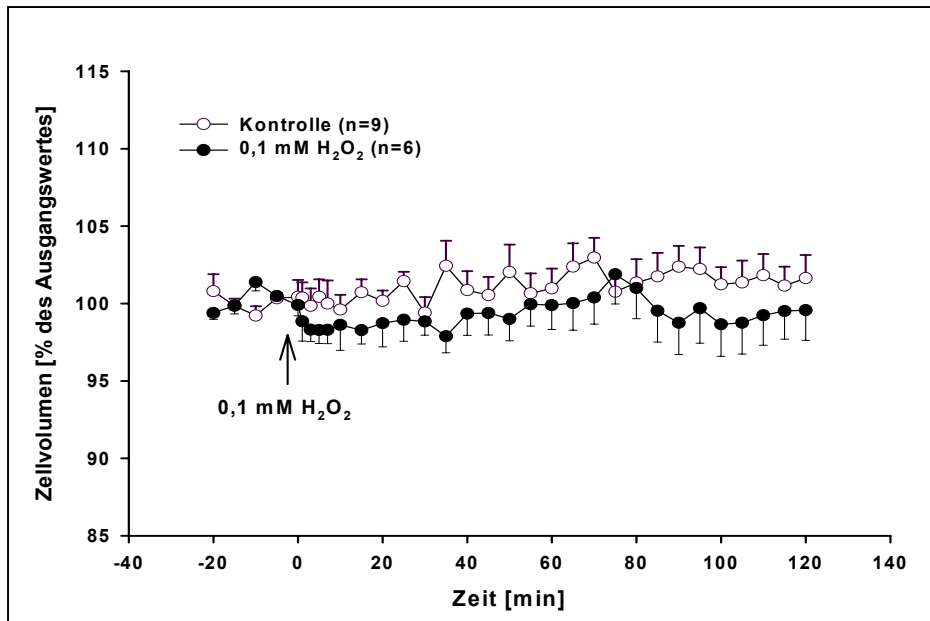


Abb. 9: *Volumen von C6-Gliazellen nach Applikation von 0,1 und 0,5 mM H₂O₂. Beide Diagramme zeigen das Zellvolumen auf der Ordinate über der Zeit auf der Abszisse. Das Zellvolumen ist in Prozent des Mittelwertes der letzten drei Messungen der Kontrollphase dargestellt. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert ± SEM von 6-9 Versuchen (n). Die suspendierten Zellen werden bei einem konstanten pH_e von 7,4, Temperatur 37°C und pO₂~100 mmHg inkubiert (ungefüllte Kreise). In der zweiten Gruppe*

wurde oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid in o.g. Endkonzentrationen appliziert (gefüllte Kreise).

Im oberen Diagramm ist keine signifikante Volumenänderung nach Zugabe von 0,1 mM H₂O₂ zu erkennen.

Nach Applikation von 0,5 mM H₂O₂ läßt sich ein biphasischer Verlauf in der Volumenänderung der Zellen erkennen. Von der ersten Minute der Testphase an kommt es zu einer raschen Abnahme des Zellvolumens. Diese Tendenz hält bis zur 25. Minute an und wird gefolgt von einer langsamen Volumenzunahme. Das Ausgangszellvolumen wird etwa nach der 80. Minute wieder erreicht.

In weiteren Versuchsreihen untersuchten wir den Einfluß von 1,0 und 5,0 mM H₂O₂ auf das Zellvolumen von C6-Gliomzellen.

Wie schon in den Versuchen mit 0,5 mM H₂O₂, zeigten sich auch hier biphasische Verläufe in der Volumenänderung. In diesen Gruppen jedoch konnte nach der initialen Volumenabnahme, eine Zunahme des Zellvolumens im Sinne einer Zellschwellung über die Ausgangswerte hinaus, beobachtet werden.

In Abbildung 10 werden die Verläufe der Zellvolumenänderungen nach Applikation dieser Endkonzentrationen veranschaulicht.

Nach Induktion des oxidativen Stresses durch 1,0 mM H₂O₂ kam es zu einem schnellen Abfall des Zellvolumens innerhalb der ersten Minuten. Bis zur 15. Minute nahmen die Zellvolumina kontinuierlich ab. Die Zellschrumpfung erreichte ihren kleinsten Wert mit $94,6 \pm 1,3\%$ in der 25. Minute. Im weiteren Verlauf der Testphase stiegen die Volumina wieder an und erreichten das in der Kontrollphase ermittelte Ausgangszellvolumen nach 70 Minuten. Ab der 100. Minute war eine tendenzielle Zellschwellung zu beobachten, die aber keine statistisch signifikanten Werte zur Kontrollgruppe erreichte. Das größte Zellvolumen wurde mit $104,2 \pm 2,4\%$ in der letzten Messung der Testphase ermittelt. Die Zellschrumpfung zeigte statistisch signifikante Werte zwischen der 10. und 25. Minute (oberes Diagramm).

Eine im Verlauf vergleichbare Kinetik der Zellvolumenänderung sahen wir nach Applikation von 5,0 mM H₂O₂. Es zeigte sich erneut eine rasche Abnahme der Zellvolumina innerhalb der ersten Minuten. Der kleinste Volumenwert mit $95,0 \pm 1,1\%$ wurde bereits in der 10. Minute der Testphase erreicht. Ab der 15. Minute schon war eine Volumenzunahme zu eruieren, die 40 Minuten nach Zugabe des Reagenz im Bereich des Ausgangszellvolumen lag. Wie auch in der Testreihe mit 1,0 mM H₂O₂, konnte in dieser Gruppe gegen Ende der zweistündigen Testphase eine Zellschwellung beobachtet werden. Die Volumina nahmen bis zur 75. Minute

stetig zu und erreichten einen Plateauwert bei 105% des Ausgangsvolumens. Die Zellschrumpfung war in der 10. und 15. Minute, die Zellschwellung in der 75. und 80., sowie von der 95.-105. Minute statistisch signifikant (unteres Diagramm).

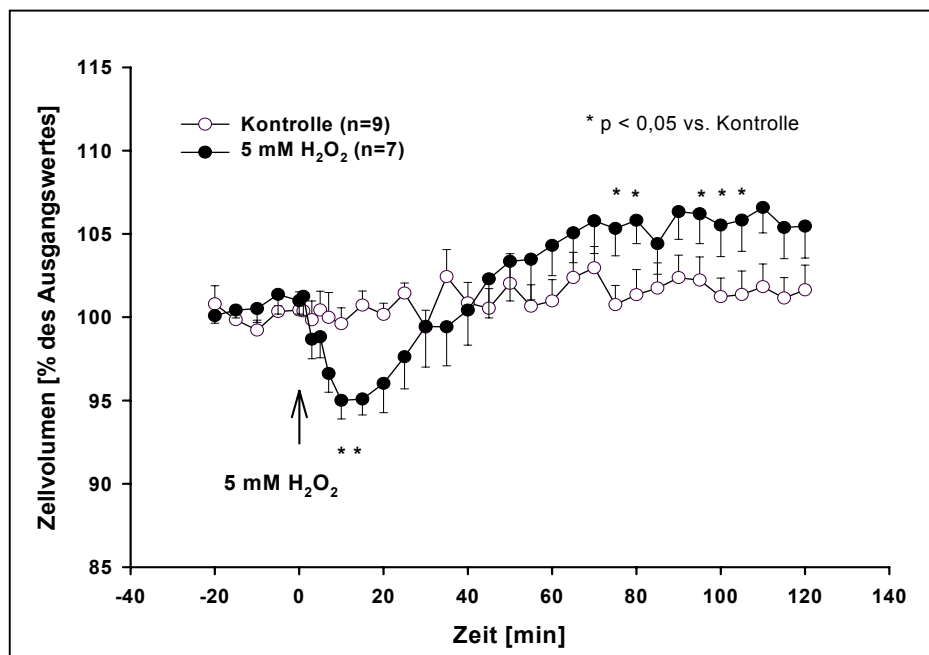
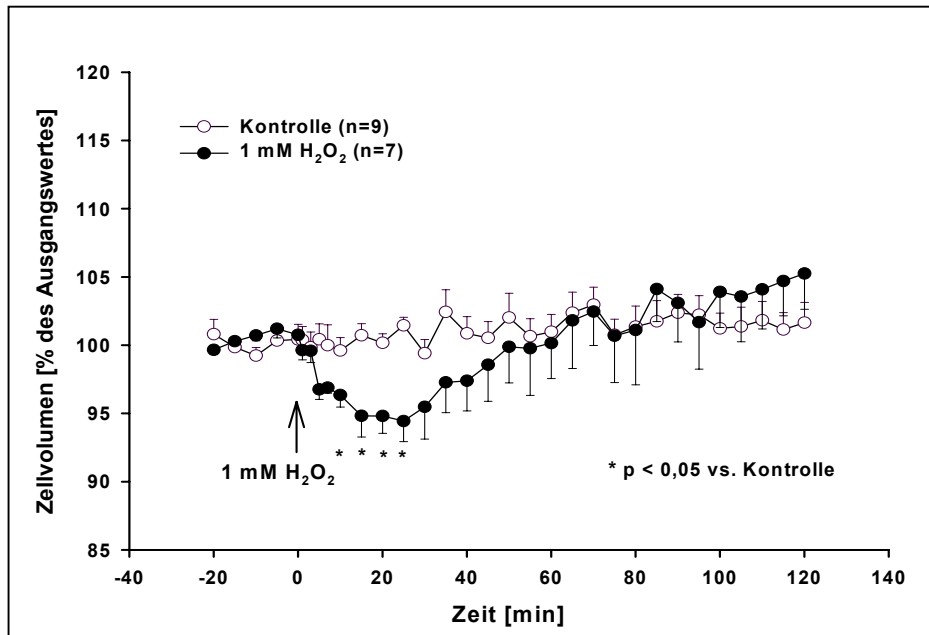


Abb. 10: *Schrumpfung und Schwellung von C6-Gliomzellen durch 1,0 und 5,0 mM H₂O₂.*

Nach Inkubation suspendierter C6-Gliomzellen mit 1,0 und 5,0 mM H₂O₂ konnte ein biphasischer Verlauf in der Volumenänderung beobachtet werden. Eine rasche Volumenabnahme innerhalb der ersten Minuten, wurde gefolgt von einer langsamen

Volumenzunahme. Das Ausgangszellvolumen wurde durch Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂ nach 70 Minuten erreicht, unter der Wirkung von 5,0 mM H₂O₂ bereits nach 40 Minuten. Die folgende Zellschwellung erreichte in der Testgruppe mit 5,0 mM H₂O₂ ein statistisch signifikantes Niveau, während in der Gruppe mit 1,0 mM H₂O₂, lediglich eine Schwellungstendenz zu verzeichnen war. In beiden Gruppen zeigte sich eine statistisch signifikante Zellschrumpfung innerhalb der ersten Minuten der Testphase.

Zelltyp	H ₂ O ₂ - Konzentration	Versuchsanzahl (n)
C6-Gliomzellen	0,1 mM	n = 6
C6-Gliomzellen	0,5 mM	n = 7
C6-Gliomzellen	1,0 mM	n = 7
C6-Gliomzellen	5,0 mM	n = 7

Tab. 5: *Versuchsgruppen zur Bestimmung des Einflusses von Wasserstoffperoxid auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen.*

3.3. Vitalität der C6-Gliazellen während Inkubation mit H₂O₂

Unter Kontrollbedingungen lag die Zellvitalität zwischen $95,4 \pm 1,6\%$ zu Beginn und $91,6 \pm 1,4\%$ am Ende der Versuche, d.h. nach zwei Stunden. Die Inkubation der Zellen über zwei Stunden hatte unter Kontrollbedingungen keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Vitalität der Zellen. Die erste Bestimmung erfolgte sowohl unter Kontrollbedingungen, wie auch in den Testgruppen unter H₂O₂-Einfluß, zum Zeitpunkt -20 Minuten, d.h. 20 Minuten vor Beginn der Testphase. Alle weiteren Vitalitätsbestimmungen wurden zu den Zeitpunkten 10, 40, 70, 100 und 120 Minuten durchgeführt (Abb. 11 und 12).

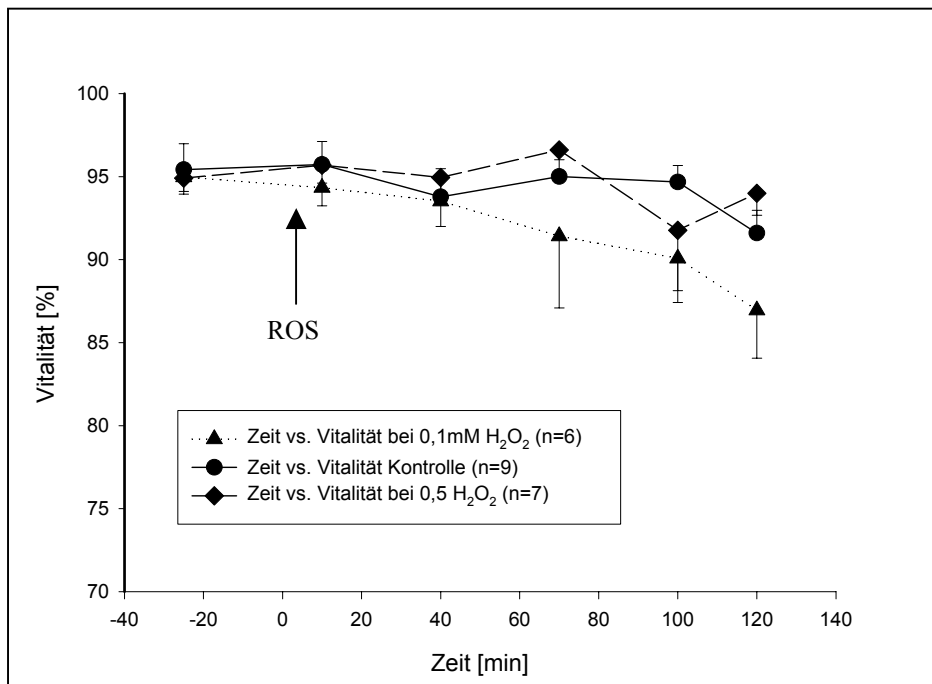


Abb. 11: Vitalität von C6-Gliomzellen unter Exposition von 0,1 und 0,5 mM H₂O₂.

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen der Gesamtpopulation dargestellt. Unter der Zugabe von 0,1 und 0,5 mM H₂O₂ kam es während des gesamten Beobachtungszeitraumes zu keiner statistisch signifikanten Beeinträchtigung der Zellvitalität. Lediglich in der 120. Minute der Expositionszeit mit 0,1 mM H₂O₂ konnte ein tendenzieller Vitalitätsverlust der C6-Gliomzellen auf $86 \pm 2,9\%$ registriert werden.

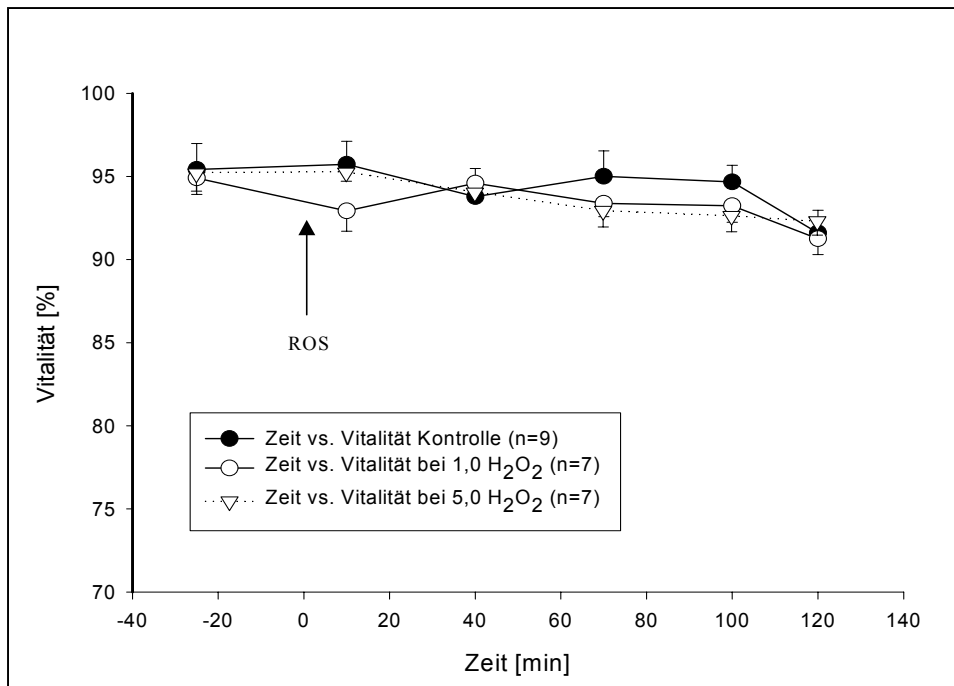


Abb. 12: *Vitalität von C6-Gliomzellen unter Exposition von 1,0 und 5,0 mM H₂O₂.*

Ein statistisch signifikanter Vitalitätsverlust konnte auch nach Zugabe von H₂O₂ in den höheren Dosierungen 1,0 und 5,0 mM nicht beobachtet werden. Der Anteil vitaler Zellen in der Kontrollgruppe lag zu Beginn des Versuches bei 95,4 ± 1,6% und nahm auf 91,6 ± 1,4% gegen Ende der Testphase ab. Eine vergleichbare Verteilung der Vitalitätswerte fand sich in den Testreihen unter oxidativem Stress in diesen Dosierungen. Unter Exposition mit 1,0 mM H₂O₂ zeigte sich ein Vitalitätsverlust von 94,9 ± 1,0% auf 91,3 ± 0,9%, unter Zugabe von 5,0 mM H₂O₂ von 95,2 ± 1,0% auf 92,4 ± 0,8%.

3.4. Wirkung von Hypoxanthin-Xanthinoxidase auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen

In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluß von Hypoxanthin (HX)-Xanthinoxidase (XOD) auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen untersucht. Bei der Umsetzung seines physiologischen Substrates Hypoxanthin zu Harnsäure, produziert das Enzym Xanthindehydrogenase extrazellulär und in seiner aktiven Form, der Xanthinoxidase, als Nebenprodukt Superoxidanionen (O₂⁻). Im postischämischen Gewebe gilt die Produktion der

Xanthinoxidase als ein wichtiger Mechanismus bei der Schädigung zellulärer Strukturen. (Roy et al.,1983).

Die Versuchsanordnung, sowie der Versuchsaufbau wurden für diese Testreihen beibehalten. Zur Objektivierbarkeit der Ergebnisse wurde für diese Versuchsserie eine neue Kontrollgruppe (n=5) angefertigt. Analog zu den vorausgegangenen Kontrollversuchen galten in dieser Kontrollgruppe dieselben Kautelen.

Tab. 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Versuchsgruppen. Ebenfalls wieder unter Verwendung von C6-Gliomzellen wird die Wirkung von 1mM Hypoxanthin mit 10 und 20 mU/ml Xanthinoxidase ausgetestet. Die Versuchsanzahl wird durch die Zahl n repräsentiert.

Zelltyp	HX/XOD - Konzentration	Versuchsanzahl (n)
C6-Gliomzellen	1 mM/ 10 mU/ml	n = 6
C6-Gliomzellen	1 mM/ 20 mU/ml	n = 5

Tab. 6: Versuchsgruppen zur Bestimmung des Einflusses von Hypoxanthin/Xanthinoxidase auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen.

Wie schon in dem vorausgegangenen Teil der Arbeit, führte die Inkubation der C6-Gliomzellen unter Kontrollbedingungen, d. h. mit pH 7,4, Temperatur 37°C und SpO₂~100 mmHg, zu keiner signifikanten Volumenänderung (Abb. 13 und 14). Auch die Zellvitalität blieb, wie in den Kontrollgruppen der anderen Testreihen, über 120 Minuten konstant (Abb. 17).

Den Testversuchen unter Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Einfluß ging analog zu den Vorversuchen eine mindestens 30-minütige Kontrollphase voraus, in der nach Äquilibration der Versuchsbedingungen, das mittlere Zellvolumen bestimmt wurde.

In den Abbildungen 13 und 14 wird die Kinetik der Zellvolumenänderung unter dem Einfluß von Superoxidanionen (O₂⁻), generiert aus dem Xanthin-Hypoxanthin-System, dargestellt. Die Kinetik der Zellschrumpfung war in beiden Versuchsgruppen ähnlich.

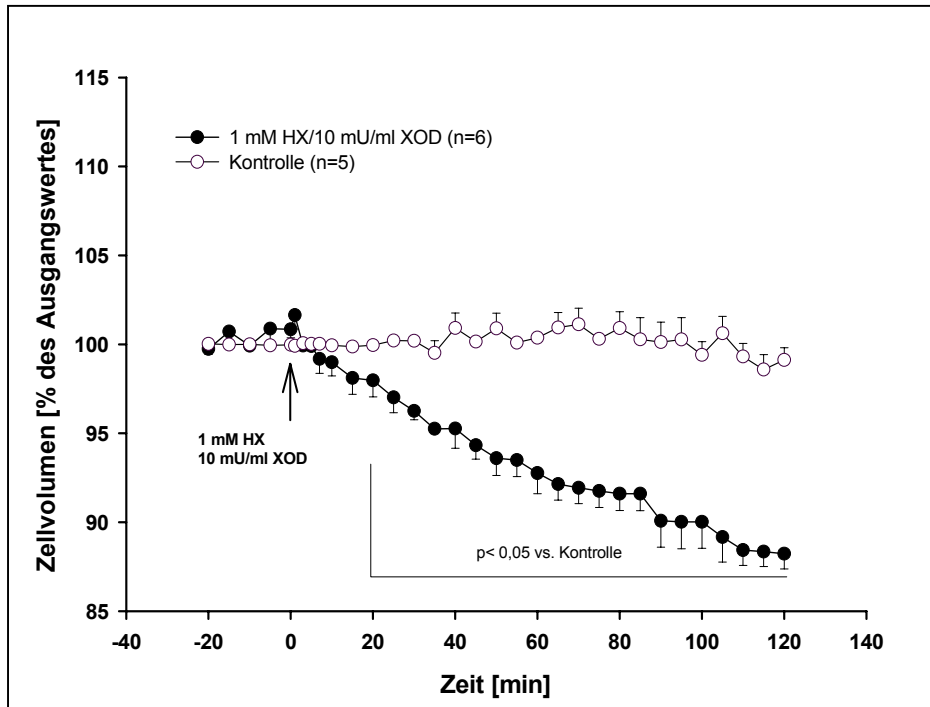


Abb. 13: Schrumpfung von C6-Gliomzellen unter dem Einfluß von 1 mM Hypoxanthin mit 10 mU/ml Xanthinoxidase:

Nach gleichzeitiger Zugabe des Enzyms Xanthinoxidase mit seinem physiologischen Substrat Hypoxanthin, konnte eine spontane und kontinuierliche, über den gesamten Beobachtungszeitraum anhaltende Zellschrumpfung beobachtet werden. Die Abnahme der Zellvolumina war ab der 20. Minute bis zum Ende des Versuches statistisch signifikant. Das kleinste Zellvolumen wurde mit $88,2 \pm 0,85\%$ in der 120. Minute des Beobachtungszeitraumes gemessen.

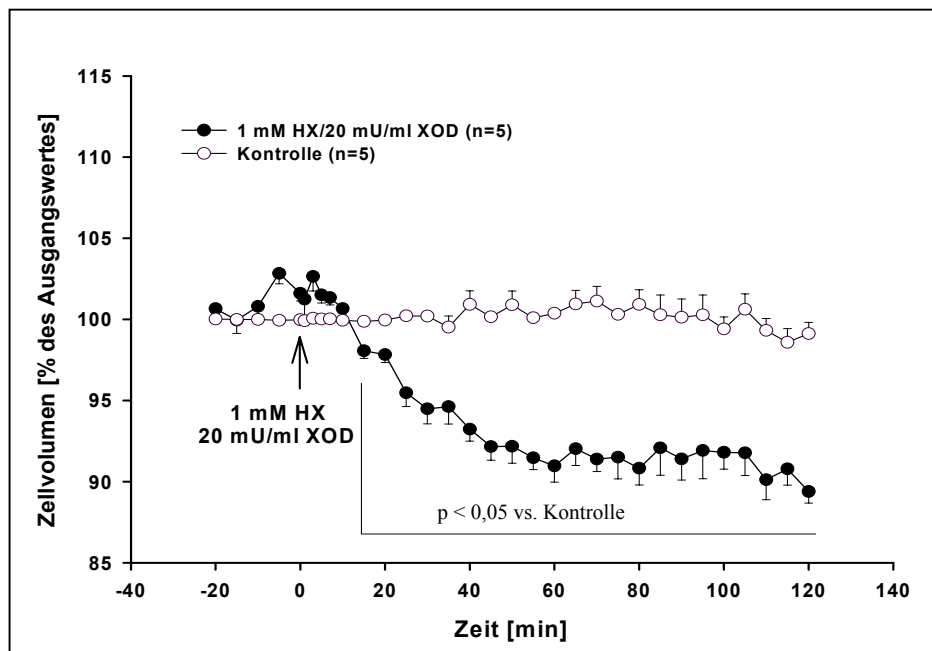


Abb. 14: *Schrumpfung von C6-Gliomzellen unter dem Einfluß von 1 mM Hypoxanthin mit 20 mU/ml Xanthinoxidase:*

Unter dem Einfluß der Xanthinoxidase mit 20 mU/ml und Hypoxanthin 1mM zeigte sich erneut eine deutliche Zellschrumpfung. Ab der 15. Minute nach Induktion des oxidativen Stresses durch extrazelluläre Bildung von Superoxidradikalen (O_2^-), war die Zellvolumenabnahme statistisch signifikant und hielt, wie auch in dem vorangegangenen Versuch, über den gesamten Versuchszeitraum an. Bis zur 45. Minute zeigte sich ein rascher, kontinuierlicher Abfall des Zellvolumens auf $92,2 \pm 0,83\%$. Im weiteren Verlauf verlangsamte sich die Kinetik der Volumenänderung und erreichte ein Plateauphase bei etwa 90% des Ausgangszellvolumens. Das Minimalvolumen wurde in der 120. Minute mit $89,4 \pm 0,71\%$ gemessen.

3.5. Wirkung von Hypoxanthin oder Xanthinoxidase auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliazellen

Zur Klärung der zu Grunde liegenden Mechanismen wurden weitere Versuche mit alleiniger Zugabe des Stoffwechselsubstrates Hypoxanthin 1,0 mM ohne Zugabe des Enzyms

Xanthinoxidase, sowie eine Versuchsreihe mit Xanthinoxidase 10 mU/ml ohne Hypoxanthin-Zugabe, erarbeitet.

Zelltyp	HX/XOD - Konzentration	Versuchsanzahl (n)
C6-Gliomzellen	1 mM HX	n = 5
C6-Gliomzellen	10 mU/ml XOD	n = 6

Tab. 7: *Versuchsgruppen zur Bestimmung des Einflusses von Hypoxanthin 1mM oder Xanthinoxidase 10 mU/ml auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen.*

In den Abbildungen 15 und 16 wird die Kinetik der Volumenänderungen der C6-Gliomzellen in diesen Versuchsreihen veranschaulicht.

1 mM Hypoxanthin bewirkte über den gesamten Testzeitraum keine Zellgrößenänderung gegenüber der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Exposition der Zellen mit 10 mU/ml Xanthinoxidase eine deutliche Abnahme des Volumens in der Testphase. Die Kinetik der Volumenänderung ist mit keinem der vorangegangenen Versuchsreihen vergleichbar. Unmittelbar nach Zugabe des Enzymes in die Kammer, kam es zu einer transienten, nur einige Minuten andauernden Größenzunahme der C6-Gliomzellen. Diese Zunahme des Volumens ist statistisch signifikant und erreichte ihren Maximalwert mit $102,3 \pm 0,8\%$ in der 5. Minute der Testphase. Im weiteren Versuchsverlauf kam es dann zu einer raschen Zellvolumenabnahme, die ab der 80. Minute ein Plateau erreichte. Von der 20. Minute der Testphase an, war die Zellschrumpfung statistisch signifikant. Der Minimalwert von $90,7 \pm 1,5\%$ wurde in der 120. Minute ermittelt.

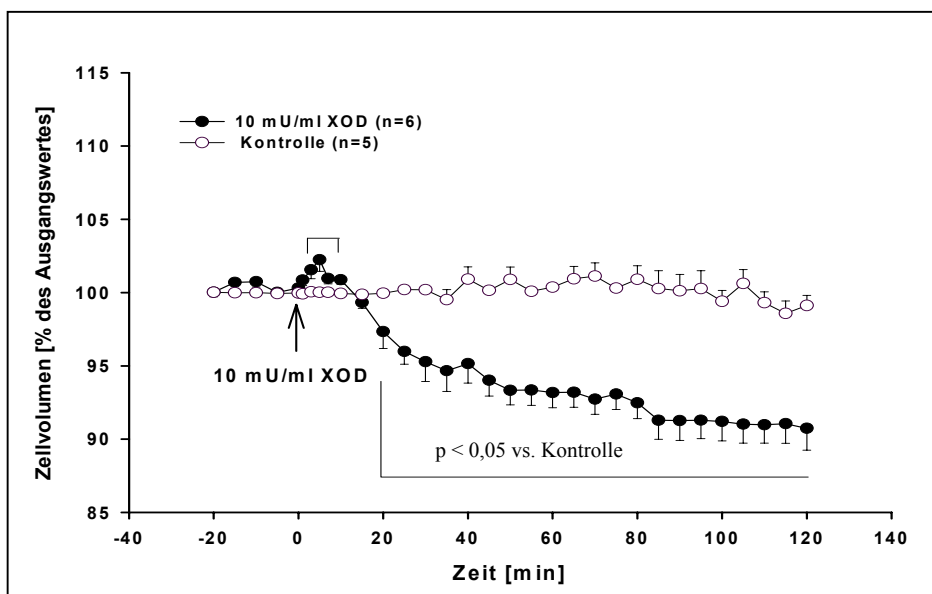
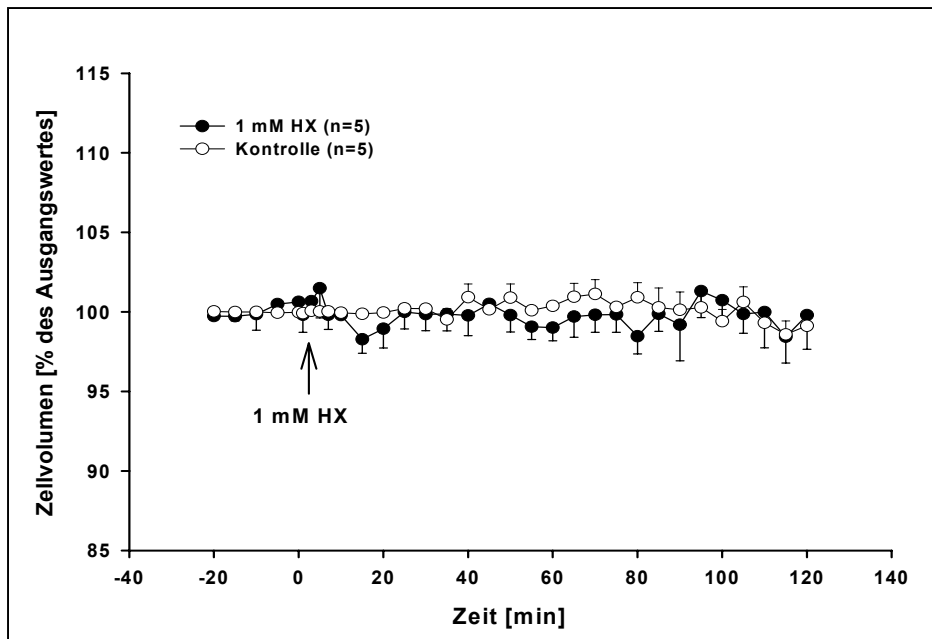


Abb. 15 und 16: Volumenänderungen der C6-Gliomzellen unter Exposition mit Hypoxanthin 1mM (HX) oder 10 mU/ml Xanthinoxidase (XOD).

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Kinetik der Zellvolumenänderung in den Testphasen. Während die alleinige Zugabe des Substrates Hypoxanthin keine Volumenänderung bewirkte, kam es unter der Exposition des Enzymes Xanthinoxidase, das die Zellmembran nicht passieren kann, zunächst zu einer nur wenigen Minuten andauernden Größenzunahme der C6-Gliomzellen. Im Anschluß daran nahm das Zellvolumen rasch ab und erreichte von der 80. Minute an Plateauwerte um 90% des Ausgangszellvolumens.

Parallel zur Messung des Zellvolumens wurde, wie auch in allen anderen Versuchen, während der gesamten Versuchsdauer die Zellvitalität anhand der Trypanblau-Ausschluß-Methode bestimmt. Wie in den Kombinationsversuchen (Abb. 20) sahen wir keine Abnahme der Zellvitalität über 120 Minuten gegenüber den Kontrollversuchen (Abb. 17).

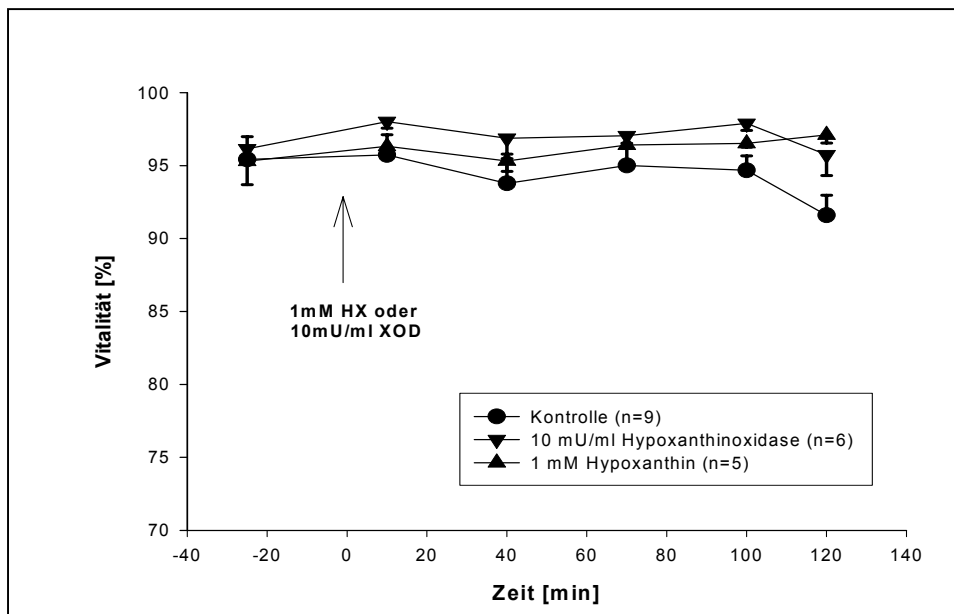


Abb. 17: Zellvitalität der C6-Gliomzellen nach Applikation von 1mM Hypoxanthin (HX) oder 10 mU/ml Xanthinoxidase (XOD).

In beiden Testreihen blieben die Zellen vital und waren über die gesamte Testphase in der Lage den Trypanblau-Farbstoff zu exkludieren. Der Anteil vitaler Zellen lag unter Hypoxanthineinfluß in einem Bereich von $97,1 \pm 0,5\%$ bis $95,3 \pm 0,7\%$. Nach Zugabe des Enzyms Xanthinoxidase war ebenfalls keine statistisch signifikante Abnahme der Zellvitalität festzustellen. Der Bereich vitaler C6-Gliomzellen lag in dieser Testreihe zwischen $98,0 \pm 0,5\%$ und $95,7 \pm 1,4\%$.

3.6. Wirkung von Menadion auf das Volumen und die Vitalität von C6-Gliozellen

Weitere Versuchsreihen sollten zeigen, welchen Einfluß die Applikation von Menadion (Vitamin K3, 2-Methyl-1,4-Naphtochinon) auf die Vitalität und das Volumen von C6-Gliomzellen hat. Menadion ist eine synthetische Substanz, die in der Tumorthherapie Anwendung findet (Driscoll et al.,1974). Die ausgeprägt zellschädigende Komponente ist auf das Semichinon-Radikal zurückzuführen. Flavoproteine katalysieren diese Reaktion unter der Bildung des Superoxidradikals (O_2^-). Menadion ist im Gegensatz zur Xanthinoxidase in der Lage, die Zellmembran zu passieren und generiert oxidativen Stress intrazellulär (Thor et al.,1982).

Wiederum unter Verwendung von C6-Gliomzellen wurden 25 und 50 μ M Menadion in die abgedunkelte Zellsuspension eingebracht (Tab. 8).

Zelltyp	MQ- Konzentration	Versuchszahl (n)
C6-Gliomzellen	25 μ M	n = 6
C6-Gliomzellen	50 μ M	n = 5

Tab. 8: *Versuchsgruppen zur Bestimmung des Einflusses von Menadion auf das Zellvolumen und die Vitalität von C6- Gliomzellen.*

In den Abbildungen 18 und 19 dargestellt ist die Zellvolumenänderung nach Menadionaufnahme. Es lässt sich eindeutig eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen beiden Testreihen erkennen. Während Menadion in einer Endkonzentration von 25 μ M keine Volumenänderung der Gliazellen im Vergleich zur Kontrollgruppe provozierte, zeigte die Dosierung mit 50 μ M MQ einen ganz anderen Verlauf der Volumina in der Testphase. Sofort nach Applikation des Substrates war eine leichte, tendenzielle Abnahme des Zellvolumens festzustellen. In unregelmäßigen Abständen konnten statistisch signifikante Werte erhoben werden. Ein zusammenhängender Verlauf ließ sich in dieser Testphase jedoch nicht erheben. Erst ab der 70. Minute zeigte sich eine eindeutige und statistisch relevante Zellschrumpfung mit raschem und zusammenhängendem Verlauf. Das kleinste Zellvolumen wurde nach 120 Minuten mit $88,9 \pm 1,3\%$ gemessen.

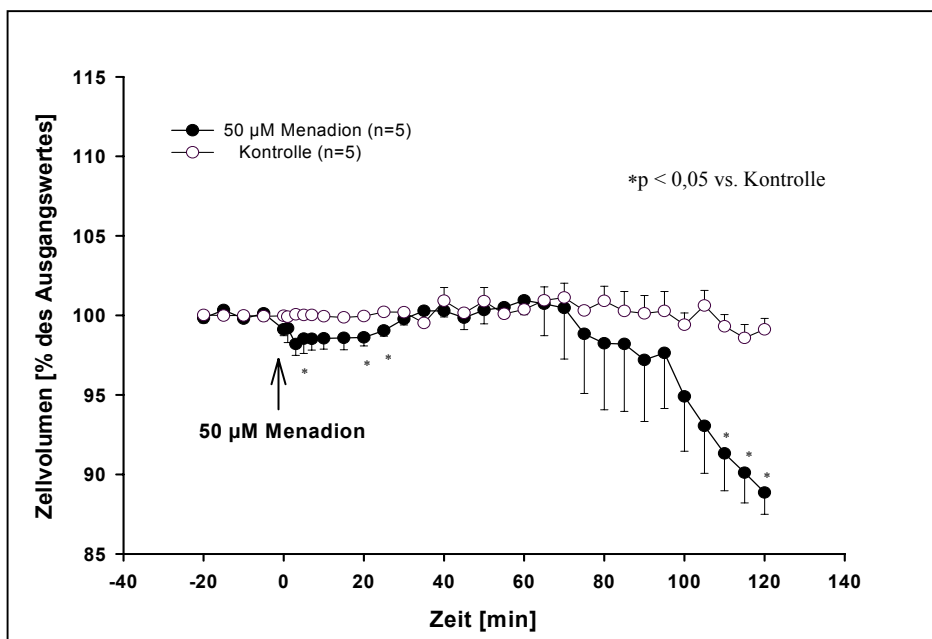
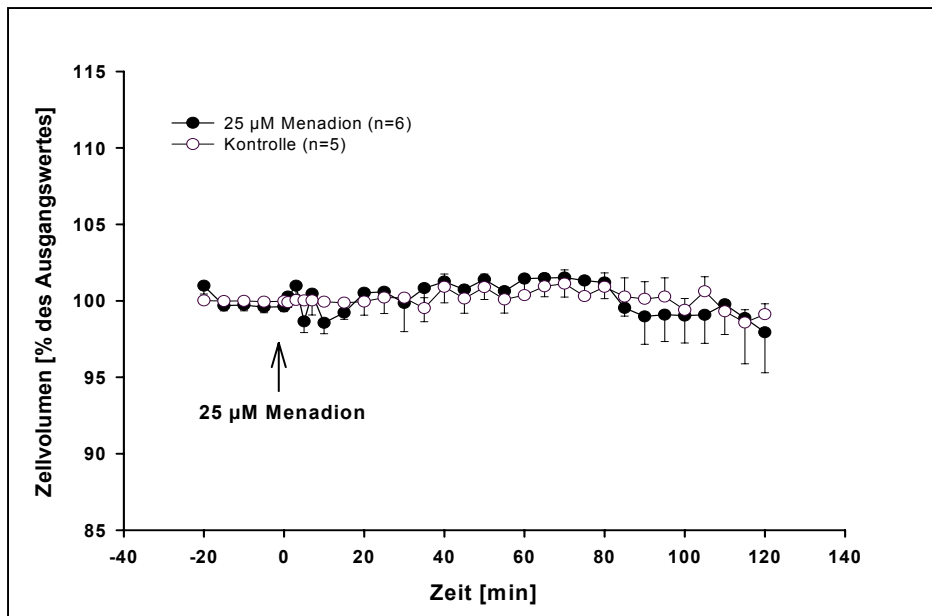


Abb. 18 und 19: Volumina von C6-Gliomzellen nach Applikation von 25µM und 50µM Menadion (MQ).

In der Graphik ist die Kinetik der Zellvolumenänderung nach Inkubation mit Menadion dargestellt. 25µM MQ bewirkte keinen messbaren Größenunterschied der Zellen. Eine signifikante Zellschrumpfung setzte 70 Minuten nach Zufuhr von 50µM MQ zur Zellsuspension ein und erreichte ihren Minimalwert von $88,9 \pm 1,3\%$ in der 120. Minute.

3.7. Einfluß von Menadion und des Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems auf die Vitalität von C6-Gliazellen

Neben der durchflußzytometrischen Zellvolumenbestimmung wurde auch in diesen Versuchsreihen anhand der Trypanblau-Ausschlußmethode die Vitalität der Zellen zu Beginn der Kontrollphase, sowie in der 10., 40., 70., 100. und 120. Minute der Testphase bestimmt. Abbildung 20 repräsentiert den Verlauf der Zellvitalität nach Applikation von 25 und 50µM Menadion (MQ), sowie 1mM Hypoxanthin (HX) mit 10 und 20 mU/ml Xanthinoxidase. Die Anzahl der Einzelversuche wird ebenfalls wieder durch den Buchstaben (n) repräsentiert.

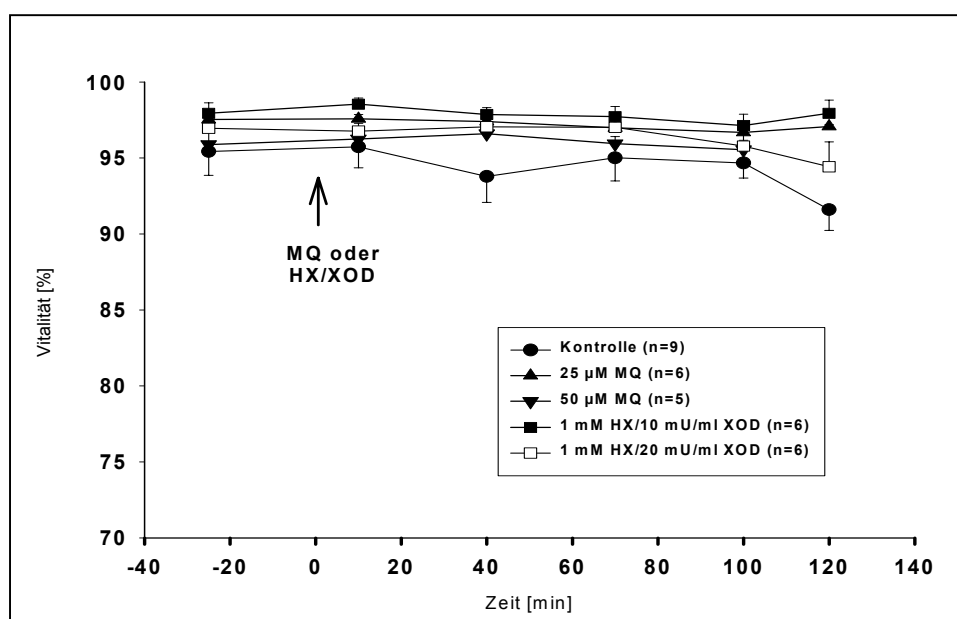


Abb. 20: *Vitalitätsnachweis der C6-Gliomzellen nach MQ und HX/XOD Exposition in unterschiedlichen Dosierungen.*

Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil vitaler Zellen der Gesamtpopulation. Weder unter intrazellulärem Menadioneinfluß, noch nach Applikation des extrazellulär oxidativen Stress generierenden Systems Hypoxanthin/Xanthinoxidase konnten in o.g. Dosierungen Vitalitätsabnahmen der Gliazellen verzeichnet werden.

3.8. Einfluß von oxidativem Stress mit Azidose oder Amilorid auf des Volumen und die Vitalität von C6-Gliazellen

	Zelltyp	Oxidativer Stress	pH/ Amilorid-Konz.	Versuchsanzahl (n)
Azidose	C6-Gliomzellen	HX/XOD 1mM/10mU/ml	6,8 0 mM	n = 6
Amilorid	C6-Gliomzellen	HX/XOD 1mM/10mU/ml	7,4 50 mM	n = 5

Tab. 9: Versuchsgruppen unter gleichzeitiger Exposition von oxidativem Stress und Amilorid oder Azidose

3.8.1. Einfluß des Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems und Azidose auf das Zellvolumen von C6-Gliazellen

Unsere Arbeitsgruppe hat in umfangreichen Forschungsprojekten Beiträge zur Aufklärung der Zellschwellung und –schädigung von Nerven- und Gliazellen und der zu Grunde liegenden Mechanismen geleistet. Unter Verwendung von C6-Gliomzellen und exakt den gleichen Versuchsbedingungen konnte die Milchsäureazidose ab einem pH-Schwellenwert von 6,8 eine Zellschwellung induzieren (Kempski et al,1988a, Staub,1992, Staub et al.,1990). Nach Induktion der Laktatazidose von pH 6,8 oder 6,2 wurde keine Vitalitätsabnahme beobachtet. Wurde der pH weiter gesenkt, kam es jedoch zum Absterben der Zellen (Staub, 1992).

Unter Kenntnis dieser Schwellenwerte wählten wir in unseren Versuchen den pH_e-Wert bei 6,8, um eine sichere Zellschwellung zu provozieren, ohne die Zellen signifikant zu schädigen (Abb 21). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen, erfolgte auch in den Kontrollgruppen eine Ansäuerung des Mediums mit pH 6,8. Wie zuvor von allen Untersuchern beschrieben, zeigte sich auch in unseren Versuchen eine rasch ansteigende, deutliche Schwellung der C6-Gliomzellen über 120 Minuten. Bereits in der ersten Minute stieg das Zellvolumen sprunghaft auf $106,3 \pm 1,7\%$ des Ausgangszellvolumens an. Im weiteren Verlauf nahm die Größe der Zellen nur noch langsam zu und erreichte etwa nach der 75. Minute Plateauwerte zwischen 114 bis 115%.

Die Testgruppe bildeten 6 Versuchsreihen unter dem kombinierten Einfluß des Superoxidanionen generierenden Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems (HX/XOD) mit Laktatazidose. Der pH-Wert wurde wiederum bei 6,8 konstant gehalten. Die Konzentration von Hypoxanthin betrug 1 mM, die Aktivität der Xanthinoxidase 10 mU/ml. Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigte die Kinetik der Zellschrumpfung in dieser Testgruppe einen annähernd spiegelbildlichen Verlauf zur Kontrollgruppe. Die hyperbelartige Kurve zeigt jedoch einen weniger sprunghaften Verlauf in den ersten Minuten nach Induktion des oxidativen Stresses und der Azidose. Die Abnahme des Zellvolumens setzte nach der 15. Minute ein und erreichte bis zur 65. Minute $89,8 \pm 1,5\%$. Mit fortschreitender Zeit zeigte sich keine weitere Schrumpfung der C6-Gliomzellen. Die Werte lagen bis zum Ende des Versuchs in einem Bereich von 87% bis 89% der Ausgangszellgröße. Die Statistik weist, ab der 5. Minute über die gesamte Versuchslänge andauernd, signifikante Ergebnisse aus.

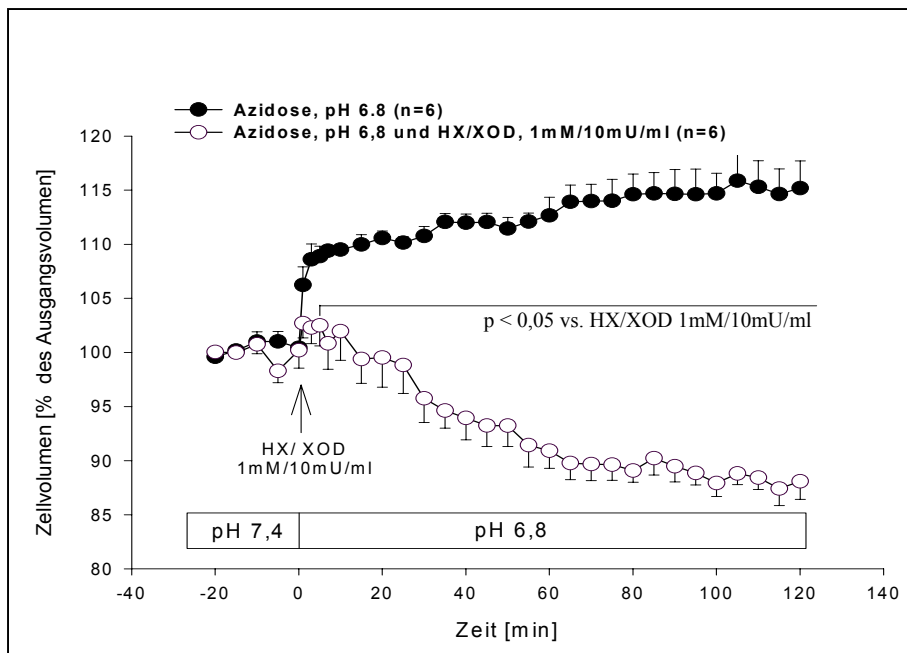


Abb. 21: Volumenänderung von C6-Gliomzellen unter oxidativem Stress und Milchsäureazidose:

Die pH-Änderung ist als Balken unterhalb der Verlaufskurven eingetragen. Die Kontrollgruppe wird durch die gefüllten Kreise repräsentiert und zeigt bekannte Volumenzunahme unter Azidose-Exposition bei pH 6,8. Die Testgruppe zeigt einen fast spiegelbildähnlichen Verlauf zur Kontrollgruppe. Der kombinierte Einfluß freier Sauerstoffradikale mit Azidose induzierte eine signifikante Zellgrößenabnahme unter 90% des Ausgangszellvolumens.

3.8.2. Einfluß des Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Systems und Amilorid auf das Volumen von C6-Gliazellen

Zur Untersuchung der beteiligten Mechanismen wurden Versuche zur Hemmung der Zellschrumpfung durchgeführt. Jean et al. erkannten, dass sich durch Amilorid bei physiologischem pH der Natriumeinstrom bei C6-Gliomzellen inhibieren ließ (Jean et al., 1986). Daraus leiteten sie eine basale Aktivität des Na^+/H^+ -Antiporters ab.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich unter azidotischen Verhältnissen die Volumenzunahme von C6-Gliomzellen durch Amilorid signifikant hemmen lässt (Staub, 1992).

Nach Stabilisierung der Versuchsbedingungen applizierten wir oxidativen Stress durch Hypoxanthin 1mM mit Xanthinoxidase 10 mU/ml und sahen die bekannte Abnahme des Zellvolumens. Aus den Messungen von 6 Versuchsreihen bildeten wir die Kontrollgruppe. (Abb. 22)

In der Testgruppe wurde Amilorid in einer Konzentration von 50 mM der Zellsuspension zugegeben, um die Funktion des Ionenaustauschers für die Zellvolumenänderung unter oxidativen Stressbedingungen zu analysieren.

Wir registrierten eine tendenzielle, geradlinig verlaufende Abnahme des Zellvolumens, bezogen auf das Ausgangszellvolumen. Der kleinste Volumenwert wurde in der letzten Messung mit $97,0 \pm 4,2\%$ erhoben. Die Volumenänderung lag somit in einem Bereich von nur 3%. Bezogen auf die Kontrollgruppe wird die Zellschrumpfung deutlich inhibiert. In der 120. Minute der Testphase betrug das Zellvolumen der Versuchsgruppe $91,2 \pm 0,8\%$ des AZV und stellte ebenfalls den Minimalwert dar. Aufgrund der recht großen Standardabweichungen (SEM) in der Testgruppe, ist nur zu einem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz gegeben (Abb. 22).

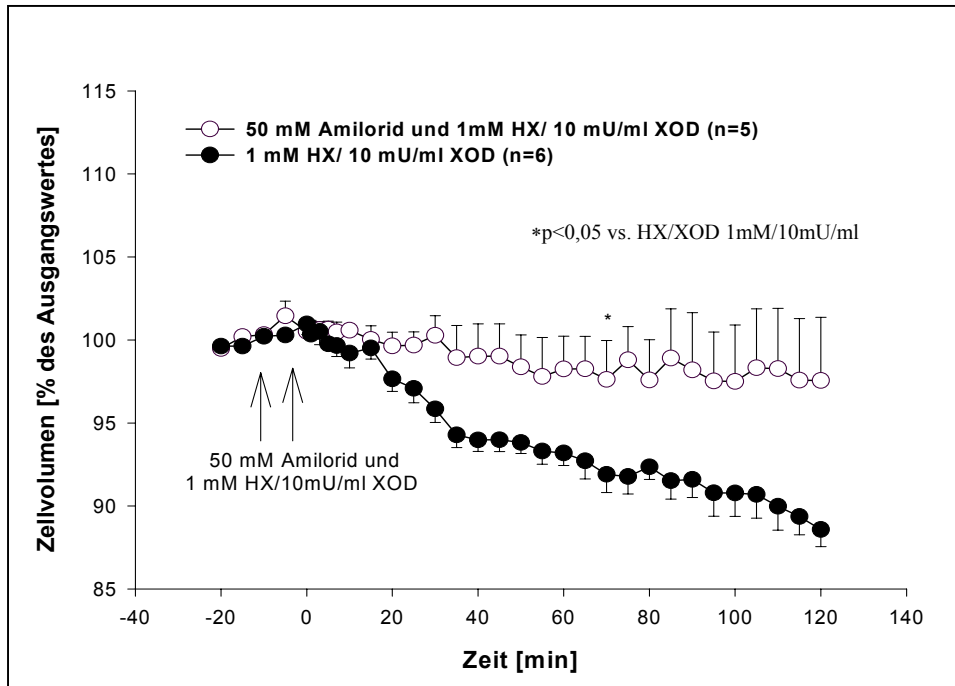


Abb. 22: *Wirkung von Amilorid auf die Volumenänderung von C6-Gliomzellen unter oxidativem Stress.*

Die Symbole zeigen den Mittelwert \pm SEM als Änderung des Referenzwertes im zeitlichen Verlauf. In jeder Versuchsgruppe wurden 5-6 Experimente durchgeführt. Amilorid wurde 10 Minuten vor Induktion des oxidativen Stresses in die Kammer injiziert, um Eigeneffekte des Pharmakons festzustellen. Tendenziell führte Amilorid zu einer Hemmung der Zellschrumpfung über die gesamte Versuchsdauer.

3.9. Wirkung von Azidose und Amilorid auf die Vitalität von C6-Gliomzellen unter oxidativem Stress

Wie zuvor erwähnt, konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass sich in einem azidotischen Milieu, bei pH 6,8 und 6,2, als auch unter Amilorid-Einfluß, die Vitalität der Zellen während einer 60 Minuten andauernden Testphase nicht verändert (Staub,1992). Basierend auf Voruntersuchungen von Grinstein und Mitarbeitern wurde in den damaligen Untersuchungen Amilorid in einer Konzentration von 1mM inkubiert (Grinstein et al.,1984). Abbildung 23 verdeutlicht, dass in unseren Versuchen die Zugabe von 50 mM Amilorid zur Zellsuspension unter oxidativem Stress ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellvitalität über 120 Minuten hatte. Auch nach Induktion der Milchsäureazidose mit

Einwirkung freier Sauerstoffradikale konnte keine Vitalitätsabnahme der C6-Gliomzellen verzeichnet werden. In diesen Versuchsreihen bewegte sich der Anteil vitaler Zellen zwischen $97,5 \pm 2,0\%$ und $95,7 \pm 1,3\%$. In einem vergleichbaren Bereich vitaler Zellen lagen die Ergebnisse nach kombinierter Exposition mit Amilorid und oxidativem Stress ($96,5 \pm 1,6\%$ bis $93,9 \pm 1,0\%$). Keine der Versuchsgruppen zeigte statistisch signifikante Abweichungen zu der jeweiligen Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer.

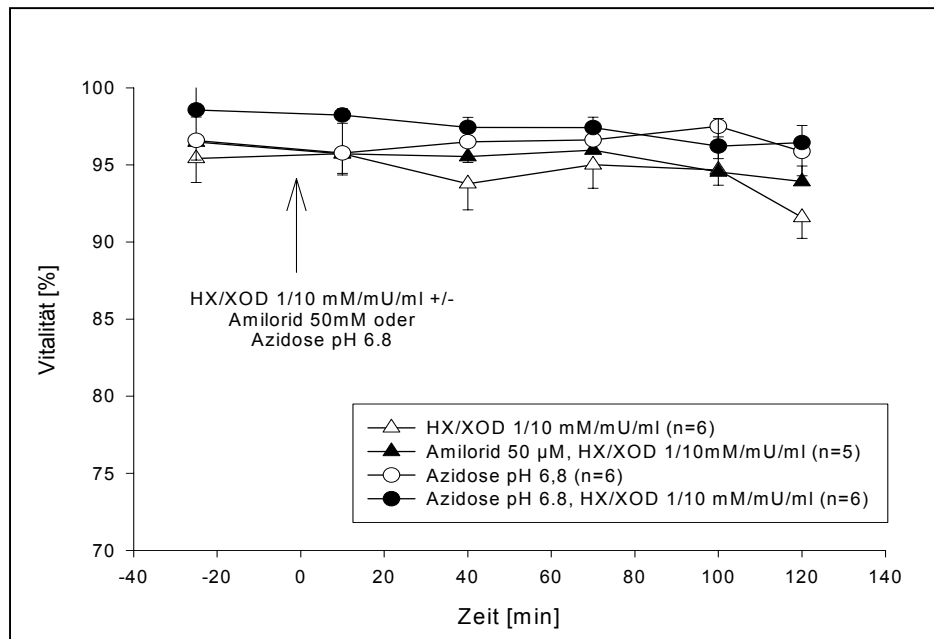


Abb. 23: *Vitalität von C6-Gliomzellen unter kombiniertem Einfluß von oxidativem Stress und Amilorid, sowie Lactatazidose pH 6,8.*

In beiden Versuchsreihen blieb die Vitalitätsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst. Über die gesamte Versuchsdauer von 120 Minuten waren die Gliomzellen in der Lage, den Trypanblau-Farbstoff in den Extrazellulärraum zu transportieren.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Das in vitro Modell

Seit vielen Jahren ist die Aufklärung der pathophysiologischen Vorgänge zerebraler Schäden nach schweren Schädel-Hirn-Traumen, globalen, wie fokalen Ischämien und die resultierenden Komplikationen, Gegenstand intensiver Forschung. Viele Arbeitsgruppen befassen sich mit dieser Problematik und erarbeiten zahlreiche experimentelle und klinische Studienansätze, um das Verständnis für die komplexen Mechanismen des sekundären Hirnschadens zu vertiefen. Zur Anwendung kommen zumeist tierexperimentelle Modelle (Kirino,1982, Hossmann et al.,1977, Clasen et al.,1953) aber mit zunehmender Häufigkeit werden auch in vitro-Systeme verwendet, wie z.B. Hirnschnitte und Glia- oder Nervenzellkulturen (Chan et al.,1978, Ames et al.,1983, Kempfski et al.,1983). Mit Hilfe dieser in vitro-Methoden können zellbiologische Vorgänge, wie sie beispielsweise der Zellvolumenregulation oder dem Zelluntergang zu Grunde liegen, isoliert analysiert werden (Kempfski et al.,1987c) und erlauben so eine Unterscheidung zwischen kausal verantwortlichen Mechanismen der Zellschädigung und den begleitenden Epiphänomenen.

Bei akuten zerebralen Insulten, wie Ischämie oder Trauma, werden in vivo vielfältige pathophysiologische Prozesse aktiviert. Mit der terminalen Depolarisation von Glia- und Nervenzellen kommt es zum Zusammenbruch transmembranöser Ionengradienten, einer Akkumulation von K^+ -Ionen im Interstitium und H^+ -Ionen im Gewebe. Es werden neben anderen Mediatoren der Zellschwellung Exzitotoxine, wie Glutamat und Aspartat, freigesetzt. Die Aktivierung der anaeroben Glykolyse und der gleichzeitige ATP-Abbau führen zur Akkumulation von Laktat und damit zum Absinken des Gewebe-pH, um nur einige wenige dieser Vorgänge zu nennen. In vivo ist es unmöglich, diese Faktoren isoliert auf quantitativer Basis zu analysieren. Bereits unter physiologischen Bedingungen wird die Homöostase des Gehirns durch experimentelle Manipulationen, wie z. B. die Eröffnung der Dura mater oder die Insertion von Elektroden in das Hirnparenchym, gestört. Es resultieren verfälschte Versuchsbedingungen.

Darüber hinaus besteht Hirngewebe aus verschiedenen Zelltypen, die unter pathophysiologischen Bedingungen unterschiedlich reagieren können. Das Verhalten von Glia- oder Nervenzellen ist unter in vivo-Bedingungen nur sehr schwer beurteilbar, da in

diesen Versuchen nur Reaktionen der Gesamtheit des Gehirns, untersucht werden können (Baethmann et al.,1986, Schürer, 1987). Deshalb sind den Untersuchungen zu den Mechanismen der Zellvolumenänderung oder –schädigung in vivo enge Grenzen gesetzt.

Mit leistungsfähigen in vitro-Modellen können individuelle Zelltypen, die aus ihrem Verband herausgelöst werden, unter definierten Bedingungen analysiert werden (Kempski et al.,1987c). Ein Beispiel ist die Erforschung der neurotoxischen Wirkung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat. Rothman und Olney konnten in vitro nachweisen, dass Glutamat für den neuronalen Zelluntergang in Anoxie durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors und Einstrom von Ca^+ -Ionen und Na^+ -Ionen von großer Bedeutung ist (Rothman et al.,1986, Rothman et al.,1987).

Das in dieser Arbeit verwendete in vitro-Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt. Es erlaubt gezielt, einzelne Versuchsparameter wie Sauerstoffpartialdruck, pH, Temperatur, Osmolalität, Ionenzusammensetzung des Extrazellulärraumes, etc. zu verändern, ohne dabei andere Parameter der Homöostase zu beeinflussen (Kempski et al.,1983, Kempfski et al.,1982). Durch den nahezu unendlich großen Extrazellulärraum im Vergleich zum Intrazellulärraum in der Versuchskammer können Sekundäreffekte, wie z.B. die Freisetzung von Ionen oder Mediatorsubstanzen aus der Zelle, vernachlässigt werden.

Dieses Modell erlaubt zur Untersuchung einzelner Zelltypen die Variationsmöglichkeit verschiedener Steuergrößen, wie z.B. der osmotischen Konzentration oder der Sauerstoffkonzentration in der Suspension (Kempski et al.,1983, Kempfski et al.,1988). Verschiedene Zellspezies, wie z.B. Glia-, Endothelzellen oder Astrozyten, wurden bisher anhand dieses Versuchsaufbaus analysiert (Kempski et al.,1985, Staub et al.,1993b, Plesnila et al.,1999). Darüber hinaus eignet sich das Modell auch zur Prüfung der an der Zellschädigung beteiligten Prozesse durch pharmazeutischen Substanzen. Es stellt somit ein probates Mittel zur Testung eines Pharmakons, vor dessen tierexperimentellen oder klinischen Einsatzes, dar. Für die Aufklärung von Zellschwellungsmechanismen stehen das Zellvolumen, die Zellvitalität, der intrazelluläre pH, der Sauerstoffverbrauch, intrazelluläre Na^+ -, K^+ - und Ca^+ -Konzentration, sowie Metabolite des Energiestoffwechsels im Vordergrund (Kempski et al.,1987c, Kempfski et al.,1983, Staub et al.,1990, Staub et al.,1993b).

Naturgemäß hat dieses Modell aber auch Nachteile. Den in Suspension befindlichen Zellen fehlen ihre im physiologischen Gewebeverband vorkommenden Zellkontakte und somit auch bedeutende Zellinteraktionen. Im zeitlichen Verlauf eines Versuches kommt es zunehmend zur Sedimentation und Fragmentation der Zellen in der Kammer. Weiterhin bleiben anatomische Besonderheiten der grauen und weißen Substanz unberücksichtigt. Die

Ergebnisse des in vitro Modells sind folglich nicht uneingeschränkt auf in vivo Bedingungen übertragbar und müssen in anschließenden tierexperimentellen Studien auf ihre Relevanz hin analysiert werden (Kimmelberg, 1998).

4.1.2. Der Modellcharakter der C6-Gliazellen

Für die hier beschriebenen Versuche wurden ausschließlich C6-Gliomzellen verwendet. Es sind dies Zellen mit gliaspezifischen Eigenschaften, die stellvertretend für Astrozyten untersucht werden. Aus licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass Astrozyten unter pathologischen Bedingungen zum Großteil am zytotoxischen Ödem beteiligt sind (Baethmann,1978, Kimmelberg et al.,1986, Bullock et al.,1991).

C6-Glioma wurde von Benda aus einem durch Methylnitroso-Harnstoff induzierten Tumor des Gehirns einer Ratte kloniert (Benda,1968). Bis heute sind weltweit eine Vielzahl von in vitro Versuchen mit dieser Zelllinie durchgeführt worden und so kann sie inzwischen als die am besten untersuchte und charakterisierte Gliazelllinie betrachtet werden (Pfeiffer et al., 1977). Astrozyten und C6-Gliomzellen haben qualitativ und quantitativ weitgehend übereinstimmende Merkmale (Pfeiffer et al.,1977, Kempfski et al.,1988a, Staub,1992). Die Zellen weisen eine hohe Expression von S-100, ein für Vertebraten spezifisches ZNS-Protein, auf (Zimmer et al.,1989) und synthetisieren Glia-typische Markerproteine wie GFAP (glial fibrillary acidic protein)(Backhovens et al.,1987). Darüberhinaus produzieren sie Glutaminsynthetase und haben hochaffine Uptake-Mechanismen für Neurotransmitter und deren Präkursoren, wie γ -Aminobutyrat (GABA), Aspartat, Glutamat, Cholin, Glyzin und Tryptophan (Pfeiffer et al.,1977, Erencinska et al.,1986, Hannumani et al.,1987, Cho et al.,1990). Das Vorkommen von Carrier-Systemen der Zellmembran, z.B. des Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters, sowie des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters, wurde bei C6-Gliomzellen ebenso, wie bei Astrozyten, nachgewiesen (Walz et al.,1984, Jean et al.,1986, Walz et al.,1986, Chassande et al.,1988). Der Sauerstoffverbrauch der C6-Gliomzelle entspricht dem der primär kultivierten Gliazellen (Kempfski et al.,1983). Analoge Volumenregulationsmechanismen konnten in Astrozyten und C6-Gliomzellen nach hypotoner Suspension beider Zelllinien gezeigt werden (Kempfski et al.,1983). Auch nach Glutamatexposition konnte bei beiden Zelltypen eine vergleichbare Volumenzunahme beobachtet werden (Schneider et al.,1992). Darüberhinaus haben Ausmaß und Kinetik der Zellschwellung unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. in Azidose oder in Gegenwart einer erhöhten Kalium- oder

Aspartatkonzentration, in beiden Zelllinien große Ähnlichkeiten (Kempski et al.,1988, Staub et al.,1990, Kimelberg,1995).

Prinzipiell hätten für die vorliegenden Untersuchungen auch Astrozyten Anwendung finden können. C6-Gliomzellen bieten jedoch einige wesentliche Vorteile gegenüber den Astrozyten, wie z.B. die bessere Verfügbarkeit der Zellen durch ihre sehr kurze Generationszeit und ihr sehr schnelles Zellwachstum. Des weiteren haben C6-Gliomzellen im Vergleich zu primär kultivierten Astrozyten eine sehr homogene Volumenverteilung, was die Erfassung geringer Zellvolumenänderungen erlaubt (Kempski et al.,1986).

4.1.3. Die Volumenmessung

Verschiedene direkte und indirekte Methoden sind heute zur Messung des Volumens kultivierter Zellen bekannt. Dazu zählen u.a. mikroskopische Volumenbestimmungen, Messungen des intrazellulären Wassergehalts, Impedanzmessungen in der Zellkultur, sowie optische und durchflußzytometrische Verfahren. Jede dieser Methoden weist Vor- und Nachteile auf (Macknight et al.,1989, Kimelberg et al.,1992).

Anhand der mikroskopischen Methoden bietet sich die Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung des Zellvolumens und der Zellmorphologie. Nachteil dieser Methoden jedoch ist, dass nur einzelne, wenige Zellen beurteilt werden können und die statistische Aussagekraft somit gering ist (Kimelberg et al.,1992).

Für die Bestimmung des intrazellulären Wassergehalts mit radioaktiven Markersubstanzen, ist eine gleichmäßige Verteilung der Indikatoren nach Äquilibrierung im Intra- und Extrazellulärraum notwendig. Ob diese Voraussetzung erfüllt wird, konnte bislang jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Weitere Nachteile der Methode sind die extra-intrazelluläre Äquilibrierung der Markersubstanz, die der schnellen Zellvolumenänderung zeitlich hinterherhinkt, und Volumenänderungen unter 10%, die nicht erfasst werden können (Kletzien et al.,1975, Kimelberg et al.,1992).

Die Messung der Impedanz in vitro wäre ein geeignetes Mittel zur zeitlich fortlaufenden Bestimmung des Zellvolumens in Kombination mit Fluoreszenzmessungen. Die Genauigkeit und auch das Auflösungsvermögen dieses Verfahrens sind bisher allerdings nicht ausreichend (McManus et al.,1993, Echevarria et al.,1992, Kimelberg et al.,1992).

Bei den durchflußzytometrischen Meßmethoden stehen die Detektion von Streulicht oder die in dieser Arbeit verwendete Impedanzmessung nach Coulter zur Verfügung (Kachel et al.,

1990). Durch Hilfsgrößen, wie das Vorwärts- oder Seitwärtsstreulicht, kann das Zellvolumen nicht gemessen werden. Anhand dieses Verfahrens kann die Form und Struktur von Zellen beurteilt werden. Weiter lässt es Aussagen über die Dichte von Zellorganellen und die Oberflächenbeschaffenheit von Zellen zu (Steen,1990).

Als direktes Maß für das Zellvolumen gilt das Coulter-Signal. Nach dem Coulter-Prinzip steht die Änderung des Widerstandes, bzw. der Spannung beim Durchtritt eines Partikels, also der Zelle, durch eine Meßapertur, als Maß für das Zellvolumen. Der elektrische Widerstand der Zellen wird als unendlich groß gegenüber dem Widerstand des Mediums angesehen und so ist beispielsweise der spezifische Widerstand von Erythrozyten im Messloch mehr als hundertmal so hoch, wie der Widerstand einer physiologischen Kochsalzlösung (Kachel, 1976). Wesentliche Vorteile der Volumenmessung nach dem Coulter-Prinzip liegen in der schnellen Durchführbarkeit und der hohen Messgenauigkeit. Bereits Volumenänderungen von 2% lassen sich mit dieser Methode erfassen. Hinsichtlich des Parameters Zellvolumen ist sie damit o.g. Bestimmungen weit überlegen. Darüber hinaus erlaubt bisher keine andere Methode eine kombinierte Bestimmung des Zellvolumens mit der Zellvitalität, pH_i , Ca^{2+}_i und weiteren Parametern (Kachel et al.,1977, Kachel et al.,1990).

Als wesentlicher Nachteil der Coulter-Methode ist die Notwendigkeit der Zellsuspension anzusehen. Die Zellen werden unmittelbar vor den Versuchen enzymatisch durch Trypsin von ihrem Untergrund in der Petrischale getrennt, was zu einer Schädigung der Zellen führen kann. Hensel und Mitarbeiter berichten über Schrumpfung und Abrundung der C6-Gliomzellen nach Ablösung mit Trypsin (Hensel et al.,1997).

Unklar ist darüber hinaus bis heute, ob der damit verbundene Verlust der Zell-Zell-Interaktionen einen Einfluß auf die zellulären Eigenschaften hat (Kimmelberg et al.,1992).

4.1.4. Die Vitalitätsbestimmung

Ein gebräuchliches Verfahren zur Bestimmung der Zellvitalität ist der Trypanblau-Ausschluß (Evans et al., 1914, Phillips, 1973, Pappenheimer, 1917). Bei dieser Methode werden Zellen mit einer Trypanblau-Lösung inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Mit Trypanblau angefärbte Zellen gelten als abgestorben. Wie in Kapitel 2.5. erwähnt, wurden zur Ermittlung des Anteils avitaler Zellen 16 Felder im Neubauer-Hämatocytozometer unter dem Mikroskop ausgezählt und das Verhältnis aus vitalen zu avitalen Zellen gebildet. Die Vitalität wird also in einem relativ kleinen Stichprobenumfang ermittelt. Weitere Nachteile der Methode sind in der subjektiven Bewertung der trypanblaupositiven Zellen und in der pH-Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme in die Zellen zu sehen (Phillips, 1973).

Der Ausschluß von Trypanblau basiert auf der Integrität der Zellmembran vitaler Zellen. Der Test gibt an, wieviel Prozent der Zellen einer Zellpopulation eine intakte, für den Farbstoff undurchlässige Membran haben. Nur diese Zellen werden als vital angesehen. Sind aber intrazelluläre Strukturen, wie z.B. DNA, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Reticulum isoliert betroffen, könnte das Ausmaß der Zellschädigung mit diesem Farbstoff-Ausschluß-Verfahren unterschätzt werden (Roper et al., 1976, Bhuyan et al., 1976).

Auch die Folgerung, dass alle gefärbten Zellen unabdingbar avital sind, muß nicht vollständig richtig sein. Bereits bei einer geringfügigen, zeitlich begrenzten Schädigung der Zellmembran oder einer reversiblen erhöhten Membranpermeabilität, die nicht unmittelbar zum Zelltod führen muß, kann Trypanblau, wie aber auch Propidiumjodid, akkumulieren und zu einem falsch-positiven Ergebnis führen (Gambihler et al., 1992). Für detailliertere Aussagen müssen Verfahren, wie die Bestimmung der Proteinbiosynthese oder der Zellproliferation und Ausbildung von Zellkolonien, zu rate gezogen werden (Pegg, 1989, Cook et al., 1989).

Wesentliche Vorteile der Trypanblau-Ausschluß-Methode gegenüber diesen aufwendigen Methoden, sind die sehr gute Praktikabilität, sowie die schnelle Durchführbarkeit. Für unsere Versuche waren diese Argumente wesentlich. Zwischen den einzelnen, zu Beginn der Testphase sehr engmaschigen, durchflußzytometrischen Volumenmessungen blieb nur wenig Zeit für die Vitalitätsbestimmung.

4.2. Freie Sauerstoffradikale

4.2.1. Physiologie der freien Sauerstoffradikale

Allgemein werden alle Moleküle, die durch ein einzelnes, unpaares Elektron charakterisiert sind, als freie Radikale bezeichnet (Löffler et al.,1985).

Das Sauerstoffmolekül nimmt im Periodensystem der Elemente eine Sonderstellung ein, da es nur ein Orbital besitzt. Ein Orbital ist gesättigt, wenn sich darauf zwei Elektronen in kovalenter Bindung mit entgegengesetztem Spin befinden. Sauerstoff (O_2) ist ein sehr starkes Oxidans und somit ein guter Akzeptor freier Elektronen. Es bilden sich freie Sauerstoffradikale, die durch das einzelne Elektron sehr reaktiv sind.

Die Reduktion des Sauerstoffmoleküls zeigt Abbildung 24: Sauerstoff (O_2) nimmt ein Elektron (e^-) auf und bildet das Superoxidradikal (O_2^-). Dieses reagiert sofort mit Wasserstoff (H_2) und einem weiteren Elektron, wodurch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Im Sinne o.g. Definition ist Wasserstoffperoxid kein freies Sauerstoffradikal. Es besitzt kein freies Elektron, zeigt aber alle „Wesensmerkmale“ freier Radikale. Unter Aufnahme eines weiteren Elektrons wird das äußerst reaktive Hydroxylradikal ($\cdot OH$) gebildet. Superoxidanionen gelten im Vergleich zu Hydroxylanionen als weniger reaktiv, besitzen aber eine längere Halbwertszeit (Chan,1996). Die Bildung des Hydroxylradikals über Wasserstoffperoxid aus Superoxidanionen wird Haber-Weiss-Reaktion genannt. In Einbeziehung von Eisen, das als Fe^{2+} diese Reaktion katalysiert, wird der Vorgang in der Biochemie als Fenton-Reaktion bezeichnet (Fridovich,1978, Hogg et al.,1992).

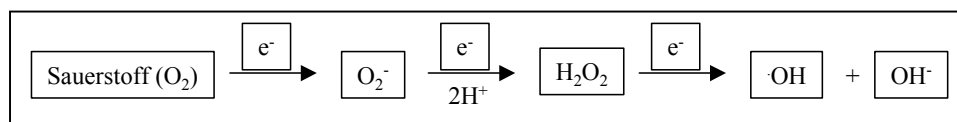


Abb. 24: Reduktion von Sauerstoff unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

Über einen anderen Bildungsweg wird das Hydroxylradikal durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid (NO) mit Superoxidanionen (O_2^-) synthetisiert. Diese Reaktion läuft extrem schnell ab und die konstante Bildung des Produktes Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist nur

durch die Diffusion des Superoxidradikals durch Membranen von Zellen oder Zellorganellen limitiert (Hue et al.,1993). Bei physiologischem pH zerfällt das Peroxynitrit sofort zu Stickstoffdioxid ($\text{NO}_2\cdot$) und OH^- (Abb. 25).

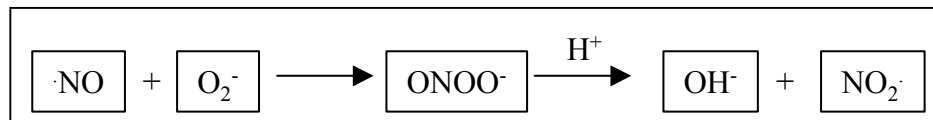


Abb. 25: Bildung des Hydroxylradikals über Peroxynitrit.

Peroxynitrit kann Makromoleküle durch Produktion des Hydroxylradikals und Stickstoffdioxid sowohl direkt, als auch indirekt, attackieren. Bevorzugte Zielzellen sind Endothelzellen, wodurch ursächlich die Läsion der Blut-Hirnschranke ausgelöst wird (Mikawa et al.,1996).

4.2.2. Pathophysiologie der freien Sauerstoffradikale

Bei pathophysiologischen Prozessen, wie dem Schädel-Hirn-Trauma oder der zerebralen Ischämie, werden im Gehirn erhöhte Konzentrationen von freien Sauerstoffradikalen gefunden (Kontos,1985, Kontos et al.,1986, Armstead et al.,1989, Siesjö et al.,1989, Hall et al.,1993, Hyslop et al.,1995). Läsionen des Hirnparenchyms und zerebraler Gefäße durch freie Radikale entstehen durch oxidative Schädigung von Proteinen, DNS und Lipiden (Kontos, 1985, Farber et al.,1990, Folbergrova et al.,1993).

Die genauen Mechanismen der exzessiven Bildung freier Sauerstoffradikale unter pathologischen Bedingungen sind nur unvollständig geklärt. Im Folgenden sollen die wichtigsten Generierungswege freier Sauerstoffradikale dargestellt werden.

Durch direkte Zellschädigung, z. B. nach einem schweren Schädel-Hirn-Trauma, kommt es zur Läsion von Zellorganellen, wie den Mitochondrien. Unter physiologischen Bedingungen werden über den Krebszyklus intramitochondrial Elektronen, Wasserstoffionen, NADH und FADH_2 zur Bereitstellung des notwendigen Energievorrates in Form von ATP, gebildet. Dies geschieht zum einen über die oxidative Phosphorylierung, zum anderen über den mitochondrialen Elektronentransport. Membranständige Enzyme oder Proteine katalysieren in vier Schritten die Reduktion von O_2 zu H_2O . 1-2% des Sauerstoffs werden unter physiologischen Bedingungen in Mitochondrien zu Superoxidradikalen konvertiert. Daran beteiligt ist die Cytochromoxidase, ein Hämprotein, welches das Endglied der Kaskade der

mitochondrialen Atmungskette darstellt und reduzierten Sauerstoff in Bindung hält. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird die Cytochromoxidase geschädigt und ihre Aktivität nimmt ab. Die Folge ist ein relatives Überangebot von reduziertem O₂ und somit die vermehrte Freisetzung freier Sauerstoffradikale, v.a. Superoxidradikale (O₂⁻) (Kowaltowski et al.,1999).

Ein zweiter mitochondrialer Bildungsweg von Superoxidradikalen verläuft über den vermehrten Ca²⁺-Influx unter pathologischen Bedingungen. Ausgelöst durch strukturelle Veränderungen der inneren Mitochondrienmembran, wird das Elektronentransportsystem gestört und es werden vermehrt freie Sauerstoffradikale gebildet (Kowaltowski et al.,1995).

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, die Rolle aktivierter Entzündungszellen nach Ischämie und Trauma zu klären (Arvin et al.,1996, Kochanek et al., 1992, Weiss,1989). In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Studien mit widersprüchlichen Aussagen zu schädigenden oder schützenden Einflüssen der Leukozyten. Tatsache ist, dass unter pathologischen Bedingungen, neutrophile Granulozyten aus dem Gefäßsystem ins Parenchym einwandern und dort akkumulieren (Barone et al.,1992). Die schädigende Wirkung von neutrophilen Granulozyten kann über zwei Wege vermittelt werden: zum einen über lokale Gefäßverschlüsse, zum anderen über die Bildung freier Sauerstoffradikale durch Aktivierung von Proteasen oder der NADPH-Oxidase (Jaeschke et al.,1997, Matsuo et al.,1995, Weiss,1989, Walder et al.,1997). Neben neutrophilen Granulozyten werden auch andere phagozytierende Zellen aktiviert, wie z.B. Monozyten, eosinophile Zellen und Makrophagen verschiedenen Typs, Mikrogliazellen eingeschlossen (Colton et al.,1987).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Aminosäure Glutamat als wichtiger Akteur des sekundären Hirnschadens herauskristallisiert. Heute gilt Glutamat als einer der wenigen gesicherten Mediatoren des Hirnödems (Baethmann et al.,1993). Neben seiner zentralen Rolle als Metabolit des Intermediärstoffwechsel, besitzt Glutamat im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren im Hirngewebe eine außerordentliche Bedeutung als exzitatorischer Neurotransmitter. Bis zu 20% der synaptischen Aktivitäten des Gehirns werden durch Glutamat vermittelt (Walker,1983).

Glutamat ist im Hirngewebe streng intrazellulär kompartimentiert. Kommt es auf Grund einer Störung der Durchblutung oder durch einen Zelluntergang zur Freisetzung von Glutamat, oder versagt die zelluläre Aufnahme, durch eine Störung des Energiestoffwechsels, wird der Extrazellulärraum mit dem „Exzitotoxin“ überschwemmt. Dies führt nicht nur zur Schwellung

von Nerven- und Gliazellen, sondern auch in Abhängigkeit von Konzentration und Dauer zum neuronalen Tod (Rothman et al.,1987, Rothman,1983). Pathologische Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum führen durch Aktivierung membranständiger NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren, benannt nach dem potentesten Agonisten) zur intrazellulären Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass bereits kurze Expositionen mit hohen Glutamatkonzentrationen zu anhaltenden Veränderungen an diesen Rezeptoren führen können (Obrenovitch et al.,1997). Verschiedene Enzyme können durch die erhöhten intrazellulären Kalziumwerte aktiviert werden. Unter anderem vermitteln sie über Enzyminduktion die Konversion der Xanthindehydrogenase (XD) zur Xanthinoxidase (XOD), der aktiven Isoform des Enzyms (Kinuta et al.,1989).

Xanthinoxidase wiederum katalysiert in zwei Schritten den Abbau der Purinbase Adenosin (AMP = Adenosinmonophosphat) über Hypoxanthin zur Harnsäure (McCord,1985, Roy et al.,1983). Hierbei werden freie Sauerstoffradikale, vornehmlich Superoxidradikale als Nebenprodukt, synthetisiert. Daneben fällt über die aufgebrauchten Energiedepots und den damit einhergehenden Zellzerfall vermehrt Adenosin an. Dieses erhöhte Substrataufkommen wird ebenfalls auf die oben beschriebene Weise durch Xanthinoxidase abgebaut.

Neben der Aktivierung der Xanthindehydrogenase, können erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen auch Phospholipasen, vornehmlich den Subtyp Phospholipase A_2 , anregen (Murdoch et al.,1990). Die Membranen von Neuronen und Gliazellen sind reich an Phospholipiden. Diese werden unter pathophysiologischen Bedingungen vermehrt durch die Phospholipase A_2 zu freien Fettsäuren, i.e. Arachidonsäure, metabolisiert. Die vermehrte Freisetzung von Fettsäuren führt ihrerseits wieder zu höheren Aktivitäten der Lipo- und Cyclooxygenasen. Diese katalysieren den Abbau freier Fettsäuren zu Prostaglandinen und Leukotrienen unter exzessiver Synthese freier Sauerstoffradikale, v.a. O_2^- . Abbildung 26 gibt einen zusammenfassenden Überblick der o.g. Generierungswege reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

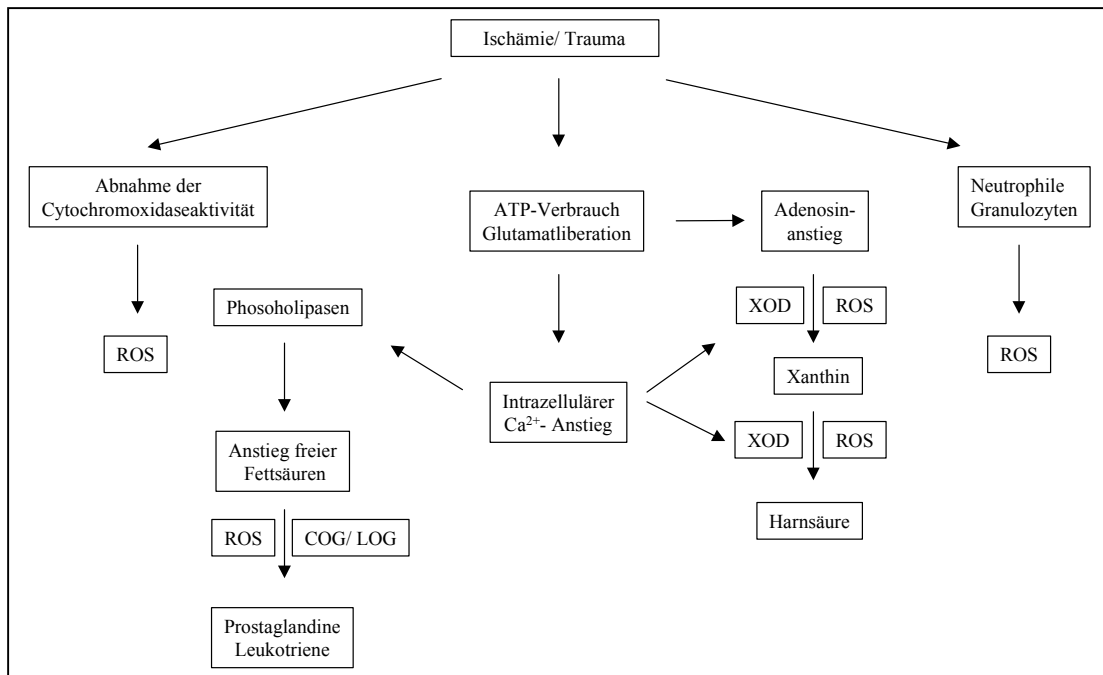


Abb. 26: Bildung freier Sauerstoffradikale unter pathophysiologischen Einflüssen.

Durch Trauma und Ischämie kommt es im Hirngewebe zum ATP-Verbrauch und zur Liberation des Neurotransmitters Glutamat in das extrazelluläre Kompartiment. Über membranständige Rezeptoren werden vermehrt Ca^{2+} -Ionen intrazellulär aufgenommen. Die Folge ist eine Aktivierung verschiedener Enzymsysteme, wie der Xanthinoxidase (XOD) oder der Phospholipase A_2 . In einer zwei-Stufen-Reaktion katabolisiert XOD Adenosinmonophosphat zu Harnsäure. Phospholipasen bedingen einen Anstieg freier Fettsäuren, v.a. der Arachidonsäure (AA), die über Lipo- und Cyclooxygenasen (COG, LOG) zu Prostaglandinen und Leukotrienen verstoffwechselt werden. In beiden Systemen werden exzessiv freie Sauerstoffradikale (ROS) gebildet. Desweiteren erfolgt eine vermehrte Liberation von ROS durch aktivierte Leukozyten sowie durch Störung der mitochondrialen Atmungskette.

4.2.3. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist im Hirngewebe weit verbreitet (Hope et al.,1991). NO ist ein pleiotropes Molekül, das unter physiologischen Bedingungen Funktionen bei der Durchblutungsregulation und als Neurotransmitter besitzt (Moncada et al.,1991). Unter

pathophysiologischen Umständen kann es zytotoxische Wirkungen mit Schädigung des Hirngewebes entfalten. Diese Effekte können direkt durch das Stickstoffmonoxid-Molekül, als auch indirekt über die Bildung reaktiver Zwischenformen, wie NO-Radikale oder Peroxynitrit, hervorgerufen werden (Beckmann,1991, Lander,1997). Durch glutamatinduzierte NMDA-Rezeptoraktivierung, wird wiederum über erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen die konstitutive NO-Synthase (cNOS) angeregt. Es werden konstitutive sowie induzierbare Isoformen der NO-Synthase unterschieden. Sie bilden unter O_2^- und NADPH-Verbrauch aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO). Cofaktoren dieser Reaktionen sind u.a. Tetrahydrobiopterin, Flavinadenin-Dinucleotid und Flavin-Mononucleotid. Die cNOS wird in Neuronen (nNOS) und in Endothelzellen (eNOS) gebildet (Nathan,1992, Vincent,1994).

Die Mechanismen der NOS-Induktion sind noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die NOS-Expression in aktivierten Astrocyten, Mikrogliazellen und Makrophagen sehr eng mit der Entstehung des ischämischen Hirnödems in Zusammenhang steht (Gotoh et al., 1996). Erhöhte NOS-Expression konnte auch nach Kälteläsion im Cortex, im Hippocampus, im Amygdalum und im olfactorischen Zentrum von Rattenhirnen nachgewiesen werden (Gotoh,1998). Die Autoren gehen davon aus, dass NO eine Schlüsselrolle bei degenerativen Veränderungen in der weißen Substanz spielt. In Verbindung mit Superoxidanionen (O_2^-) bildet Stickstoffmonoxid Peroxynitrit ($ONOO^-$) und schließlich die äußerst reaktiven Hydroxylradikale (OH^-), die eine Myelindegeneration durch Fragmentation der DNS-Stränge von Oligodendrozyten und die Lipidperoxidation von Zellmembranen bewirken (Merrill et al.,1993).

4.2.4. Die Lipidperoxidation

Das zerebrale Gewebe ist sehr reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Fallen unter pathologischen Umständen vermehrt freie Sauerstoffradikale, v.a. Peroxid- und Hydroxylradikale, an, wird in Gegenwart dieser Fettsäuren die Lipidperoxidation in Gang gesetzt. Sauerstoffradikale haben große Affinität zu Wasserstoffatomen. Besonders sensitiv reagieren an C=C-Doppelbindungen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LH) vorhandene Wasserstoffatome. Das Lipidradikal (L^-) entsteht durch Lösung eines Wasserstoffatoms vom Fettsäurerest. Das entstandene Radikal reagiert mit Sauerstoff zum Lipidperoxidradikal (LOO^-). Dieser Schritt initiiert eine Kettenreaktion, in deren Folge weiteren Fettsäuren

Wasserstoffatome entzogen werden und Hydroperoxylipide (LOOH) zusammen mit neuen Lipidradikalen entstehen (Abb. 27)(Braugler et al.,1989, Farber et al.,1990).

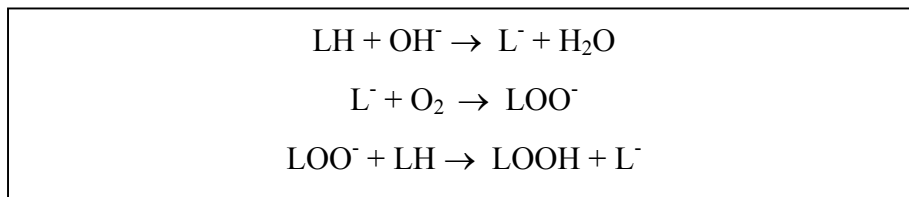


Abb. 27: *Kettenreaktion der Lipidperoxidation.*

Durch Arachidonsäure kann die Lipidperoxidation induziert werden (Lewen et al.,2000). So entstehen, wie oben erwähnt, beim Abbau von Arachidonsäure freie Radikale und zudem steht die Fettsäure als Substrat der Peroxidation zur Verfügung. Als Reaktionsprodukt der Lipidperoxidation konnte Malondialdehyd in mit arachidonsäureinkubierten, zerebrovaskulären Endothelzellen und Gliazellen nachgewiesen werden (Chan et al.,1988, Villacara et al.,1989). Die durch Lipidperoxide induzierte Membranschädigung führt ihrerseits zu Störungen der Funktion von Mitochondrien und membranständiger Transportsysteme von Ionen und Neurotransmittern (Hillered et al.,1983, Malis et al.,1986). Desweiteren kommt es zur erhöhten Permeabilität der Zellmembran für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen (Braugler et al.1985 a,b).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Schwellung von Gliazellen unter Arachidonsäureexposition, vom Grad der Sättigung der Fettsäuren abhängig ist. Somit spielt die Lipidperoxidation eine entscheidende Bedeutung bei der Schwellung von Gliazellen in vitro nach Zugabe von Arachidonsäure. Das jeweils gefundene Ausmaß der Zellschwellung zeigte, dass die Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäuren eine Rolle spielen (Staub, 1992). Dies trifft auch für die Produktion von freien Radikalen zu. Die Liberation von Superoxid- und Lipidradikalen durch Astrozyten nach Inkubation mit Fettsäuren ist ebenfalls abhängig vom Grad ihrer Sättigung. Bei Verwendung gesättigter Fettsäuren wurde keine Radikalbildung beobachtet (Chan et al,1988).

4.3. Antagonisierung freier Sauerstoffradikale und der Lipidperoxidation

Dem Gehirngewebe stehen zur Inaktivierung freier Radikale enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse zur Verfügung. Unter den Enzymen ist an erster Stelle die Superoxiddismutase (SOD) zu nennen. Sie gehört zu den Oxidoreduktasen und kommt im Gehirn in hohen Konzentrationen vor. SOD dismutiert Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid (Freeman et al.,1982). Basierend auf der Verfügbarkeit bestimmter Metallionen und abhängig von anatomischen Strukturen, kommen im Gehirngewebe drei Isoformen der Superoxiddismutase vor. Die Metallionen fungieren gleichsam als „Radikalfänger“. Die Kupfer,Zink-SOD (CuZnSOD oder SOD1) ist ein zytosolisches Enzym, das Kupfer und Zink als Kofaktoren beinhaltet. Es ist ein dimeres Enzym, dessen Genlocus beim Menschen auf dem Chromosom 21 codiert ist (Fridovich,1975). In Mitochondrien findet sich die Mangan-SOD (MnSOD, SOD2). Kupfer,Zink-SOD konnte auch im extrazellulären Kompartiment nachgewiesen werden (SOD3), spielt aber im Gehirn auf Grund der geringen Konzentrationen nur eine untergeordnete Rolle (Oury et al.,1999).

Hydroxyperoxidasen, wie die Gluthationperoxidase (GSPx) und die Katalase, bauen Wasserstoffperoxid ab. Katalase wandelt H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff um, ist jedoch nur in Spuren im Gehirngewebe vorhanden. Dieses Enzym findet sich v.a. in Leber- und Nierengewebe oder auch in Erythrozyten, intrazerebral lediglich in der Substantia nigra und dem Hypothalamus.

H_2O_2 wird im Gehirn fast ausschließlich durch die Gluthationperoxidase (GSPx) umgewandelt. Dieses Enzym findet sich zerebral ubiquitär, bindet Selen als Kofaktor und ist NADPH-abhängig, welches aus dem Pentosephosphatweg bezogen werden muß. Aus Wasserstoffperoxid entsteht in dieser Reaktion H_2O und die oxidierte Form des Gluthations (GSSG).

Zu den nicht-enzymatischen Radikalfängern werden im Gehirn Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (α -Tocopherol) gezählt.

Vitamin C besitzt hinsichtlich seiner Interaktion mit freien Sauerstoffradikalen einen dualen Charakter. In niedrigen Konzentrationen agiert es als Prooxidans, in hohen Konzentrationen wiederum als Antioxidans. Der Plexus choroideus verfügt deshalb über ein aktives Transportsystem, das die Vitamin-C-Konzentration im Liquor um ein zehnfaches gegenüber der Plasmakonzentration steigern kann. Neurone vermögen über ein zusätzliches Transportsystem die Konzentration nochmals zu erhöhen (Shukla et al.,1995).

Vitamin E wird auf Grund seiner Lipidlöslichkeit eine besonders potente antioxidative Wirksamkeit nachgesagt. Als strukturelle Komponente biologischer Membranen soll es Sekundärschäden vermeiden, indem es zerebrale Membranen gegen die Radikal-induzierte Lipidperoxidation schützt (Halks-Miller et al.,1984, Meydani et al.,1988). Einige in vivo-Studien belegen, dass Vitamin E signifikante antioxidative Fähigkeiten besitzt (Burton et al.,1983, Kagan et al.,1990). Darüberhinaus soll es den Abbau von Arachidonsäure hemmen, indem es modifizierend auf die Aktivität beteiligter Enzymsysteme, wie der Lipooxygenase, wirkt (Reddanna et al.,1989, Toivanen,1987, Stoffel et al.,1997).

Unter physiologischen Umständen kann dieses System eine gute neuroprotektive Wirkung gegen freie Sauerstoffradikale entfalten. Beim schweren Schädel-Hirn-Trauma oder einem ischämischen Insult, kann die intrazerebrale Konzentration freier Radikale jedoch um ein hundertfaches ansteigen und die Kapazitäten der geschilderten Abwehrmechanismen weit übersteigen.

4.4. Diskussion der Ergebnisse

In unserer Arbeit wurde der Einfluß freier Sauerstoffradikale (ROS) auf die Volumenänderung und die Vitalität von C6-Gliomzellen untersucht. Die Volumenkontrolle zerebraler Zellen ist auf Grund der engen räumlichen Limitierung durch knöcherne Strukturen von besonderer Wichtigkeit. Durch das vergrößerte Gewebevolumen im Rahmen eines zytotoxischen Hirnödems, steigt der intrakranielle Druck, es kommt zur Herniation von Gehirnteilen durch den Tentoriumschlitz und zuletzt zum Versiegen der zerebralen Perfusion. Aus diesen Gründen ist es von größtem wissenschaftlichen Interesse, die Mechanismen, die der Entwicklung des zytotoxischen Hirnödems zugrunde liegen, zu klären. Erst wenn die pathophysiologischen Abläufe vollständig verstanden sind, können effektive therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

Zunehmend wird postuliert, dass auch freie Radikale Mediatorfunktionen, die zur Bildung des zytotoxischen Hirnödems führen, besitzen sollen (Baethmann et al.,1986, Kempfski et al.,1988a, Baethmann et al.,1988). Der Antwort auf diese Frage wollten wir mit der vorliegenden Arbeit einen Schritt näher kommen.

Die Generierung der ROS erfolgte zum einen durch direkte Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Freeman et al.,1982), zum anderen durch das extrazellulär Superoxidanionen

produzierende System Xanthinoxidase mit Hypoxanthin (Roy et al.,1983), oder durch Menadion, welches intrazellulär Hydroxyl- und Superoxidanionen produziert (Bellomo et al., 1990, Thor et al.,1982).

Die Versuchsbedingungen entsprechen der sogenannten ischämischen Penumbra, bzw. des perifokalen Areales nach traumatischer Läsion in vivo (Astrup et al.,1977). Wie in der Einleitung bereits dargelegt, ist die Penumbrazone von klinischer Bedeutung, weil sie - im Gegensatz zum primären Schaden - prinzipiell therapierbar ist. In diesem Areal wird das vitale Parenchym, dessen Strukturstoffwechsel bei erloschenem Funktionsstoffwechsel noch erhalten ist, mit Metaboliten aus dem irreversibel geschädigten Fokus „überschwemmt“. Konsekutiv kommt es dadurch zur irreversiblen Schädigung der Penumbra und zum sekundären Gewebeuntergang. In der Abfolge der Pathologie besitzt das zytotoxische Ödem eine Schlüsselstellung. Das Hirnödem kann, mit deletären Folgen, zur intrakraniellen Hypertension führen. Das zytotoxische Hirnödem ist durch einen Elektrolyt- und Wassershift aus dem Extra- in den Intrazellulärraum charakterisiert. Astrozyten, jedoch auch Neurone, sind von der zytotoxischen Zellschwellung betroffen. Dieser Typ des Hirnödems findet sich u.a. bei der zerebralen Ischämie, sekundär beim Schädel-Hirn-Trauma, nach metabolischen Entgleisungen oder toxischer Schädigung des Hirngewebes.

Zahlreiche Faktoren sind als Mediatoren des Hirnödems untersucht worden. Als so gut wie identifiziert gelten das Kallikrein-Kinin-System, die Azidose und auch der Neurotransmitter Glutamat. Freien Sauerstoffradikalen wird ebenfalls eine Funktion als Mediatoren zugesprochen (Baethmann et al.,1986, Kempinski et al.,1988a, Baethmann et al.,1988).

Es besteht heute allgemeine Übereinstimmung, dass unter pathophysiologischen Bedingungen freie Sauerstoffradikale (ROS) im Gehirngewebe akkumulieren. Die ROS-induzierten Interaktionen sollen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie auch bei der Ischämie und beim Schädel-Hirn-Trauma, nach den gleichen Prinzipien ablaufen (Evans,1993). Der direkte Nachweis von freien Radikalen in vivo ist wegen deren hoher Reaktivität und damit verbundenen Kurzlebigkeit nur sehr schwer zu führen. Über indirekte Methoden, wie der Bestimmung von Stoffwechselprodukten der Lipidperoxidation, DNS-Strangbrüchen, oder Strukturänderungen von Proteinen durch Oxidation, können freie Sauerstoffradikale nachgewiesen werden. Infolge der gestörten Balance zwischen exzessiver ROS-Bildung und deren vermindertem Abbau, kommt es schließlich zum Untergang von Gliazellen, Astrozyten und Neuronen (Chan et al.,1995, Hall et al.,1993, Halliwell,1992, Ikeda et al.,1990b, Kontos et al.,1986, Siesjö et al.,1996).

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird im Gehirn v.a. durch Hydroxyperoxidasen, wie der Gluthationperoxidase und in geringerem Maße durch die Katalase, oxidiert. In einer ersten Versuchsreihe inkubierten wir C6-Gliomzellen mit H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1, 0,5, 1,0 und 5,0 mM. In regelmäßigen Abständen wurde das Zellvolumen und die Vitalität der Zellen über einen Zeitraum von 120 Minuten bestimmt. Die Vitalität der Zellen blieb auch unter dem Einfluß höherer Konzentrationen von H_2O_2 während der gesamten Versuchsdauer konstant. Es muß jedoch angemerkt werden, dass die absolute Zellzahl mit zunehmender Dauer bei allen Versuchen stark abnahm und vermehrt freie Farbstoffpartikel zu registrieren waren. Dieses Phänomen könnte Folge der Zellfragmentation durch die Ablösung der Zellen mit Trypsin oder durch den Magnetrührer sein. Denkbar ist auch eine zunehmende Sedimentation der Zellen in der Suspensionskammer.

Mit Induktion von H_2O_2 kam es dosisabhängig zu einer raschen Abnahme des Zellvolumens, die nach etwa 15 Minuten ihren Maximalwert erreichte. Es folgte dann eine Volumenzunahme, die das Ausgangszellvolumen nach 40 bis 60 Minuten wieder erreichte und unter Exposition von 5,0 mmol H_2O_2 dieses in der zweiten Stunde des Beobachtungszeitraumes signifikant überstieg. Verschiedene Autoren berichten über eine Volumenabnahme von Endothelzellen und Hepatozyten unter ROS-Einfluß innerhalb von Sekunden bis Minuten (Dreher et al.,1994, Lemasters et al.,1987, Saha et al.,1993). In der Rattenleber scheint die Zellschrumpfung während der Reperfusionphase zusätzliche Zellschäden zu verursachen (Wettstein et al.,1997).

Schlenker und Mitarbeiter untersuchten das Volumen von Rattenhepatozyten unter direktem Einfluß von H_2O_2 . Wie in unseren Versuchen zeigte sich eine biphasische Volumenänderung. Zunächst kam es zur Zellschrumpfung auf $85 \pm 0,06\%$ des Ausgangszellvolumens (AZV) in der 4. Minute nach Induktion von 10^{-3} mol/l H_2O_2 . Bis zur 10. Minute war das Zellvolumen wieder auf $97 \pm 0,05\%$ angestiegen. In natriumfreier Lösung wurde keine Rückregulation des Zellvolumens beobachtet. Sie schlossen aus diesen Befunden, dass oxidativer Stress biphasische Effekte auf das Zellvolumen habe, welches zunächst durch eine Zellschrumpfung gekennzeichnet sei. Im weiteren zeitlichen Verlauf käme es durch Einstrom von osmotisch wirksamen Na^+ -Ionen zu einer regulatorischen Volumenzunahme der Hepatozyten (Schlenker et al.,2000). Weitere Studien belegen eine initiale Zellschrumpfung von pulmonalen und renalen Zellen unter dem Einfluß freier Sauerstoffradikale (Koong et al.,1993, Filipovic et al.,1997). Die Mechanismen, die dieser kurzzeitigen Volumenabnahme in unterschiedlichen Zelllinien, ausgelöst durch oxidativen Stress, zugrunde liegen, sind ebenfalls nicht geklärt.

Yannet war vermutlich der Erstbeschreiber einer Volumenkontrolle zerebraler Zellen. Er demonstrierte, dass unter hypoosmolaren Bedingungen der Wassergehalt des Gehirns durch Elektrolytausgleich über eine gewisse Zeit konstant bleibt (Yannet,1940). In weiteren Untersuchungen konnte dies auch unter hyperosmolaren Bedingungen belegt werden (Arieff et al.,1977, Pollock et al.,1980).

1983 veröffentlichten Kempinski und Mitarbeiter ihre Untersuchungsergebnisse zur Volumenregulation von C6-Gliomzellen unter hypo- und hyperosmolaren Bedingungen. Die Zellen in Suspension zeigten keine Rückregulation des Volumens während der dreistündigen Testphase. Erst nach Wiederherstellung der isotonen Bedingungen, regulierte sich die Zellgröße auf das Ausgangszellvolumen (Kempinski et al.,1983). Basierend auf Untersuchungen von Cala und Mitarbeitern wurde geschlossen, dass der Volumenkontrolle eine Vielzahl simultan ablaufender Austauschmechanismen für Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ und HCO_3^- zugrunde liegen müssen (Cala,1980).

Für die Reduktion des Zellvolumens müssen osmotisch wirksame Solute, als Grundlage für den Efflux von Wasser in den Extrazellulärraum, die Zelle verlassen. Diese, in kurzer zeitlichen Abfolge verlaufende dynamische Interaktionen zwischen der Zellvolumenkontrolle, dem oxidativem Stress und der erhöhten Permeabilität der Zellmembran für Natriumionen, könnten auf Adaptations- und Schutzmechanismen der Zellen schließen lassen. Kurzfristig können die Zellen durch Abnahme des Volumens ihre Funktionen und ihren pH_i aufrecht erhalten. Unter ATP-Verbrauch könnten dabei osmotisch wirksame Substanzen, wie Natrium-Ionen, durch die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle gepumpt werden. Sind die energetischen Vorräte erschöpft, könnte es zum Einstrom von Na^+ in das Zellinnere und konsekutiv zur Aufnahme von H_2O kommen. Weitere Studien berichten auch über eine direkte Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch H_2O_2 (Matsuoka et al.,1990, Garner et al.,1984). Jussofie und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Zelltoxizität von H_2O_2 in L929 Zellen in Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Natrium stehen muß. In natriumfreier Lösung, in der das Elektrolyt durch Cholin ersetzt wurde, war die Zytotoxizität signifikant reduziert (Jussofie et al., 1998).

In unseren Versuchen erbrachten die Ergebnisse eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung. 0,1mM H_2O_2 zeigte keine Volumenänderung der C6-Gliomzellen. Unter dem Einfluß von 0,5 und 1,0 mM H_2O_2 war eine spontane Volumenabnahme zu erkennen. Die Rückregulation verlief langsamer als nach Induktion des oxidativen Stresses mit 5,0 mM H_2O_2 . Es kommt hier zu einer deutlichen Zellschwellung in der zweiten Stunde der Testphase. Die Klärung der

zugrundeliegenden Wirkmechanismen ist anhand dieser Versuchsanordnung jedoch nicht möglich.

Eine prompte Volumenabnahme der C6-Gliomzellen konnte nach Induktion des oxidativen Stresses durch Xanthinoxidase mit seinem Substrat Hypoxanthin beobachtet werden. Die Kinetik der Zellvolumenänderung unterschied sich jedoch zu den zuvor zitierten Versuchen grundlegend. Eine statistisch signifikante Volumenabnahme konnte unmittelbar nach Zugabe von XOD/HX registriert werden. Diese setzte sich über die gesamte Dauer der zweistündigen Versuchsphase fort und zeigte keinen eindeutigen Minimalwert in diesem Zeitraum. Dosisunabhängig zeigte sich eine Volumenabnahme unter 90% des Ausgangszellvolumens. Eine Rückregulation des Zellvolumens konnte während der 120 Minuten nicht beobachtet werden.

Xanthinoxidase generiert wie o.a. mit seinem physiologischen Substrat Hypoxanthin Superoxidanionen (O_2^-). In dem Versuchsmedium befinden sich unter den anorganischen Salzen auch Eisenanionen. Über die Fe^{2+} -katalysierte Fenton-Reaktion bilden sich die sehr reaktiven Hydroxylradikale (OH^\cdot). Diese können in der Zellmembran befindliche Proteinstrukturen, wie z.B. NMDA-Rezeptoren, oxidieren und deren Funktionen modifizieren. Somit könnte es zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation im Zytoplasma kommen. Viele physiologische Reaktionen im Gehirn, wie die Regulierung metabolischer Prozesse, der Genexpression und des Ionentransportes, werden durch vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Kalziumwerte (Ca^{2+}_i) getriggert. Kalzium kann eine Vielzahl von signalgebenden Funktionen steuern und muß deshalb intrazellulär in sehr engen Grenzen reguliert werden. Die pathophysiologische Konzentrationserhöhung von Ca^{2+}_i könnte eine Schlüsselposition in der Vermittlung der Zytotoxizität freier Sauerstoffradikale haben. Wie schon erwähnt, könnten freie Radikale NMDA-Rezeptoren in einer „glutamatähnlichen“ Weise modulieren, und einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration bewirken. Da in Gliazellen, wie auch in anderen eukaryontischen Zellen, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration etwa 50 mal kleiner ist, als im Extrazellulärraum, könnte sich unter pathologischen Bedingungen, wie der Induktion oxidativen Stresses in der Suspension, die Permeabilität der Zellmembranen steigern. Der Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zellen könnte eine Folge sein. Reguliert wird Ca^{2+}_i durch ein sensibles System Ca^{2+} -permeabler Kanäle, Ca^{2+} -Transporter, zytoplasmatischer Puffer und intrazellulärer Speicher, die Kalziumionen aufnehmen können. Durch intrazelluläre Generierung freier Sauerstoffradikale, wie z.B. durch Menadion (MQ), könnte auch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern erfolgen. Unterschiedliche

Mechanismen sind in diesem Zusammenhang denkbar. Einer davon stellt die Inositol-1,4,5-Triphosphat-vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum dar, dessen Membranen durch ROS alteriert werden könnten.

Es könnte sich ein Circulus vitiosus entwickeln. Durch extrazelluläre Bildung freier Radikale könnten Transportsysteme in der Zellmembran oxidiert werden und ROS direkt in die Zelle einschleusen oder Ca^{2+} -Kanäle aktivieren. Intrazellulär käme es zur Akkumulation freier Radikale und/ oder Ca^{2+} -Ionen. Freie Radikale greifen die Membranen von Zellorganellen direkt an und könnten so wiederum Kalziumionen aus intrazellulären Speichern freisetzen. Die erhöhten Konzentrationen von Ca^{2+}_i aktivieren Phospholipasen und andere Enzymsysteme, wie die Xanthinoxidase. Es folgt eine weitere Generierung freier Sauerstoffradikale, welche die Verselbständigung des Prozesses initiieren.

Die genauen Mechanismen der Zellschrumpfung bleiben jedoch in diesem Zusammenhang unklar. Weitere in vitro- und auch in vivo-Untersuchungen müssen folgen. Ballanyi und Mitarbeiter beschrieben 1990 eine Serotonin induzierte K^+ -vermittelte Membranhyperpolarisierung mit konsekutiver Zellschrumpfung in Gliomzellen (Ballanyi et al.,1990). Strupp und Mitarbeiter beschrieben Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (Strupp et al.,1993). Ob die Aktivierung dieser Mechanismen ROS induziert sein könnten, bleibt noch zu klären.

Das Phänomen der Volumenverkleinerung von C6-Gliomzellen ist bekannt. Die Schrumpfung der Zellen ist bei pH 8,2, gegenüber der Kontrolle bei pH 7,4 während der initialen 25 Minuten signifikant (Staub,1992). Die Vorgänge, die bei einer extrazellulären Alkalose zur Verkleinerung der Zellen führen, sind nicht vollständig geklärt. Einige Möglichkeiten sollen kurz angesprochen werden.

Eine Alkalisierung des Mediums auf pH 7,8 verdoppelte den Efflux von Chloridionen bei Fibroblasten auf etwa das Doppelte (Lin et al.,1990). Konsekutiv stieg der intrazelluläre pH innerhalb von 10 Minuten auf 7,6 an. Die Autoren diskutierten die Aktivierung eines Cl^- /Anion-Austauschmechanismus. In vivo-Untersuchungen bei Hunden zeigten, dass unter metabolischer Alkalose Bikarbonat im Austausch gegen Cl^- -Ionen aus dem Liquor transportiert wird. Es wurde das Vorhandensein von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschsystemen in der Blut-Hirn-Schranke und/oder in Astrozyten postuliert (Javaheri et al.,1984). Möglicherweise werden diese Austauschsysteme durch freie Sauerstoffradikale aktiviert.

Eine stetige Schrumpfung der C6-Gliomzellen und Astrozyten aus Primärkultur über eine 120 Minuten andauernde Beobachtungsphase konnte bei Inkubation in aminosäurefreiem Medium beobachtet werden (Schneider,1998). Die Volumenabnahme geht mit einer Freisetzung von Aminosäuren in das Medium einher. Gliazellen könnten zur Homöostase des

Milieus Aminosäuren freisetzen, solange bis ein für die Zelle „tolerabler“ Spiegel im Extrazellulärraum erreicht ist. Der erhobene Konzentrationsverlauf der verschiedenen Aminosäuren im Medium spricht auch dafür, dass die freigesetzten Aminosäuren von den suspendierten Gliazellen wieder aufgenommen und metabolisiert werden können. Der Verlauf der Zellschwellung zeigt einen sinusartigen Verlauf um eine gedachte Gerade als biologischen Regelvorgang (Nechayeva et al., 1986). Auch die Beeinflussung dieser Regelmechanismen durch freie Sauerstoffradikale wäre denkbar.

In einer weiteren Versuchsreihe provozierte die Zugabe von Hypoxanthin ohne das Enzym Xanthinoxidase keine Änderung des Zellvolumens über o.g. Beobachtungszeitraum. Im Unterschied dazu, erbrachten die Versuche unter alleiniger Xanthinoxidasexposition ebenfalls wieder eine statistisch signifikante Zellvolumenabnahme ohne Rückregulation. Die Xanthinoxidase gehört, wie auch die Alkoholdehydrogenase oder die Katalase, zur Gruppe der Metallenzyme. Als Substrat zur Generierung freier Radikale könnte so beispielsweise Eisen gedient haben, das als anorganisches Salz im Versuchsmedium vorliegt.

Um freie Sauerstoffradikale intrazellulär zu generieren, fügten wir der Suspension Menadion in den Endkonzentrationen 25 μM und 50 μM zu. Die erste Versuchsgruppe unter dem Einfluß von 25 μM zeigte keine Volumenänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine tendenzielle Zellschrumpfung war in der ersten Hälfte der Testgruppe nach Zugabe von 50 μM Menadion zu sehen. Eine signifikante Abnahme des Zellvolumens konnte ab der 100. Minute der Testphase beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass Menadion zelluläre Membranen passieren kann (Bellomo et al., 1990). Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen lässt sich keine eindeutige Aussage zur Dosis-Wirkungsbeziehung treffen. Dafür müssten die Testphasen in diesen Versuchsreihen länger gewählt werden. Die zeitliche Verzögerung der Wirkung von Menadion auf das Zellvolumen, könnte mit dem Transport der Substanz durch die Lipidmembran erklärt werden. Nach Induktion des oxidativen Stresses mit 50 μM wurde das kleinste Zellvolumen in der letzten Messung in der 120. Minute mit $88,9 \pm 1,3\%$ ermittelt. Über den weiteren Verlauf läßt sich nur spekulieren. Eine weitere Abnahme des Zellvolumens ist aber vorstellbar. Wir sahen über die gesamte Versuchsdauer keine Abnahme der Vitalität der suspendierten Zellen unter Menadioneinfluß in o.g. Endkonzentrationen.

Menadion (2-Methyl-1,4-Naphtochinon) wird als experimentelles Pharmakon in der Onkologie eingesetzt. In isolierten Hepatozyten erfolgt die Metabolisierung von Menadion durch ein- oder zwei-Elektronen-Reduktion. Die NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, ein mitochondriales und mikrosomales Enzym, katalysiert die ein-Elektronen-Reduktion von

Menadion. Die zwei-Elektronen-Reduktion wird katalysiert durch das mitochondriale Flavoprotein NAD(P)H (DT-Diaphorase). Über beide Wege werden intramitochondrial und intramikrosomal Superoxidanionen, z.T. auch Hydroxylanionen als Nebenprodukte, generiert. Deren zytotoxische Wirkungen sind bekannt. Sie führen zu DNS-Strangbrüchen, zur Lipidperoxidation und zur Oxidation von Thiol-Gruppen in Proteinen (Thor et al.,1982). Thor und seine Mitarbeiter berichten zudem über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung unter Menadion-Exposition in Hepatozyten. Im Zusammenhang damit sahen sie elektronenmikroskopisch deutliche Änderungen in der Oberflächenbeschaffenheit der Zellen mit „blebbing“. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind natürlich nicht vorbehaltlos auf C6-Gliomzellen übertragbar. Wie zuvor bereits angesprochen, könnte jedoch die Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch Menadion und dessen Radikalproduktion zur Zellvolumenabnahme beitragen. Auf der anderen Seite sind Bildung von „blebbs“ in Zellmembranen und die Zellschrumpfung auch Symptome der Apoptose, auf die ich später noch eingehen werde.

In Kombinationsversuchen wollten wir der Klärung zugrundeliegender Mechanismen der Zellvolumenänderung unter oxidativem Stress mit Azidose oder Amilorid, einem Inhibitor der Na^+/H^+ -Antiporters, einen kleinen Schritt näher kommen.

Tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Laktatazidose im Hirngewebe, in einer ausgeprägten Ödembildung resultiert (Myers,1979, Pulsinelli et al.,1982a, Warner et al.,1987, Morimoto et al.,1993). Diese ist charakterisiert durch vasogene und zytotoxische Komponenten (Siesjö,1988). In vitro-Untersuchungen konnten diese Befunde bestätigen. Azidotische Verhältnisse im Suspensionsmedium induzieren eine ausgeprägte Volumenzunahme bei Astrozyten und Gliazellen (Kempski et al.,1988, Staub et al.,1990, Kimelberg et al.,1986). Der Einstrom von Natrium und Chlorid wird für die Zellschwellung verantwortlich gemacht. O. Kempski und F. Staub führten unter Federführung von A. Baethmann am Institut für Chirurgische Forschung in München systematische Untersuchungen zur Charakterisierung der azidoseinduzierten Schwellung und Schädigung von C6-Gliomzellen und primär kultivierter Astrozyten durch. Die suspendierten Zellen wurden pH_e -Werten von 7,2 bis 4,2 ausgesetzt und deren Größe sowie Vitalität bestimmt. Es gelang Schwellenwerte herauszuarbeiten. Ab pH_e -Werten von 6,8 und darunter kam es zur dosisabhängigen Schwellung, bei pH_e -Werten unterhalb 5,6 konnte ab der 60. Minute zusätzlich eine Vitalitätsabnahme der Zellen verzeichnet werden. Die Schwellungstendenz war abhängig von extrazellulären Natriumionen, da natriumfreies Suspensionsmedium die

Volumenzunahme hemmte. Darüber hinaus konnte neben dem Na^+/H^+ -Antiport-Inhibitor Amilorid, eine Reihe weiterer Substanzen und Pharmaka gefunden werden, die die Zellschwellung durch extrazelluläre Azidose *in vitro* modifizieren.

Basierend auf diesen Ergebnissen führten wir eine weitere Versuchsreihe unter kombiniertem Einfluß von Laktatazidose (pH_e 6,8) und extrazellulärer Induktion von oxidativem Stress mit Xanthinoxidase (XOD)/Hypoxanthin (HX) durch. Wir wählten den pH-Wert 6,8, um eine Schwellung der Zellen ohne Vitalitätsabnahme zu provozieren. Unter der Einwirkung von HX/XOD 1mM/10 mU/ml sahen wir in Vorversuchen eine über die gesamte Versuchsdauer anhaltende Schrumpfung der Zellen ohne Vitalitätsverlust. Deshalb wählten wir für die Kombinationsversuche wieder diese Konzentrationen.

Die gebildete Kontrollgruppe wurde mit Laktatazidose pH_e 6,8 inkubiert. Eine spontane Zellschwellung mit Plateauwerten bei 115% des Ausgangszellvolumens war zu verzeichnen. Die Zellen der Testgruppe wurden mit pH_e 6,8 und HX/XOD 1mM/10 mU/ml inkubiert. Es zeigte sich eine annähernd spiegelbildlich verlaufende Volumenabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. *In vitro* wird somit die milchsäureinduzierte Zellschwellung von C6-Gliomzellen durch Zugabe eines sauerstoffradikalbildenden Systems in o.g. Konzentrationen antagonisiert. Die Zellen der Kontroll- und der Testgruppe zeigten in der Trypanblau-Ausschlußmethode über die gesamte Versuchsdauer unverändert gute Vitalitätsmerkmale.

Siesjö und Mitarbeiter postulierten in ihrer 1996 veröffentlichte Studie, dass einer der wesentlichen pathophysiologischen Mechanismen des sekundären Hirnschadens, die in Azidose erhöhte Produktion freier Radikale zu sein scheint (Siesjö et al.,1996). Die Zellvolumenabnahme unter oben beschriebenen Bedingungen in der Testgruppe könnte Ausdruck eines Schutzmechanismus oder apoptotischer Veränderungen sein. Zur Klärung der zugrundeliegenden Parameter sind weitere Untersuchungen erforderlich. Ansätze weiterführender Arbeiten könnte z.B. die simultane Induktion von Arachidonsäure und freier Radikale sein. Die Volumenzunahme von Gliazellen durch Arachidonsäure (AA) 0,1 mM konnte durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) 300mU/ml signifikant verringert werden (Staub,1994). Zugabe der SOD mit HX/XOD könnte ebenfalls weitere Erkenntnisse bringen. Um die Signifikanz der Lipidperoxidation für die Gliaschrumpfung herauszuarbeiten, könnte der spezifische, synthetische Inhibitor 21-Aminosteroid U-74389F eingesetzt werden. Aminosteroide sind potente Antagonisten der Lipidperoxidation. Als Scavenger neutralisieren sie Lipid- und Lipidperoxidradikale (Braugher et al.,1989, Braugher et al.,1987). Eine andere Möglichkeit zur Klärung der Mechanismen besteht u.U. in der Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Eine schwerwiegende Folge der Schädigung der

Zellmembran ist u.a. die Erhöhung der Ca^{2+} -Permeabilität als Ursache des Ca^{2+} -Overloads im Zytosol und in den Mitochondrien. Dadurch kann es zur irreversiblen Schädigung dieser Zellorganellen kommen, sowie zur Aktivierung von Proteasen, Endonukleasen und Lipasen mit Freisetzung von Arachidonsäure und Bildung freier Radikale (Siesjö,1988, Siesjö et al.,1989, Orrenius et al.,1989, Dux et al.,1987). In vitro wurde ein vermehrter Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in Synaptosomen und Neuronen des Rückenmarks durch freie Radikale und Produkte der Lipidperoxidation registriert (Braugher et al.,1985b). Der Ca^{2+} -Influx konnte durch Antioxidantien, nicht aber durch Inhibitoren von Ca^{2+} -Kanälen, verhindert werden. Die Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen in der Zelle wird zudem durch saures Milieu begünstigt, weil die Mechanismen der Ca^{2+} -Homöostase, z.B. die Ca^{2+} -ATPase und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter, durch Azidose gehemmt werden (Siesjö et al.,1989, Siesjö,1988).

Die chemischen Eigenschaften der Arachidonsäure können ebenfalls zur Schädigung der Zellen beitragen. Sie hat als amphophiles Molekül hydro- und lipophile Eigenschaften. Die polare Carboxylgruppe hängt an einer langen unpolaren Kohlenwasserstoffkette. Wenn amphophile Fettsäuren in hoher Konzentration vorliegen, nehmen sie Eigenschaften von Detergenzien an und sind in der Lage, Mizellen zu bilden (Katz et al.,1981). Die Zellschädigung könnte dabei durch Hydrolyse von Membranlipiden, sowie durch Inkorporation von Membranbestandteilen durch diese Mizellen verursacht werden. Nun wäre es denkbar, dass dies eine Verkleinerung der Zelloberfläche und damit des Zellvolumens haben könnte, wenn die entstandenen Löcher der Zellmembran geschlossen worden wären. Andererseits könnten durch Arachidonsäure verursachte Defekte der Zellmembran zur Verminderung des elektrischen Widerstandes dieser Zellen bei der Volumenmessung mit Metrizell geführt haben. Wie in der Methodik ausgeführt, ist der Widerstand der Zellen gegenüber der Suspensionslösung als unendlich groß zu betrachten (Kachel et al.,1990). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung des Zellvolumens nach dem Coulter-Prinzip. Ein durch Membranschädigung verminderter Widerstand der Zellen könnte zu einer Verringerung des Spannungsimpulses beim Durchtritt der Zellen durch die Meßapertur geführt haben und damit ein kleineres Zellvolumen vortäuschen. Zur Beantwortung dieser Frage, ob tatsächlich eine Verkleinerung des Zellvolumens oder eine Abnahme des Zellwiderstandes vorliegt, müsste der elektrische Widerstand bestimmt oder eine vom Widerstand unabhängige Methode der Zellvolumenmessung, wie Vorwärtsstreulicht oder Bildanalyse, herangezogen werden (Hüller et al.,1991, Peters,1994).

Amilorid und Analoga sind spezifische Hemmstoffe des Na^+/H^+ -Antiporters (Mahnensmith et al.,1985, Grinstein et al.,1986, Grinstein et al.,1984, Jean et al.,1986). Die Pharmaka wirken

kompetitiv, indem sie mit Na^+ -Ionen an der Außenseite der Zellmembran um die Bindung am Transporter konkurrieren. So wird durch Amilorid die Ausschleusung von intrazellulären H^+ -Ionen und die Aufnahme von Na^+ -Ionen in die Zelle eingeschränkt. Winkler und Mitarbeiter zeigten am Modell suspendierter Gliazellen, dass die initiale Schwellungsphase der Zellen nach Applikation von Arachidonsäure (0,1mM) durch Amilorid (0,1mM) nicht beeinflusst wurde. 10 Minuten nach Zugabe der Fettsäure war die Zunahme jedoch abgeschwächt und erreichte signifikante Werte nach 40 Minuten (Winkler et al.,2000). Die Autoren folgerten, dass Arachidonsäure über drei Mechanismen die intrazelluläre Na^+ -Konzentration steigern könne. Einer davon sei die Aktivierung des Na^+/H^+ -Antiporters. Darüber hinaus führte die in Gang gesetzte Lipidperoxidation zu einer Störung von Ionenkanälen in Zellmembranen und steigere somit zusätzlich den zellulären Influx von Na^+ -Ionen (Chan et al.,1988). Somit seien auch freie Sauerstoffradikale und signalübertragende Systeme in diese komplexen Mechanismen involviert. Der Vollständigkeit sei erwähnt, dass die ausgeprägteste Hemmung der Zellschwellung nach Zugabe von Ouabain, einem selektiven Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase, beobachtet wurde.

Wir verwendeten in unseren Versuchen Amilorid 50mM und induzierten oxidativen Stress wiederum mit HX/XOD 1mM/10mU/ml. Die Applikation des Pharmakons zur Zellsuspension erfolgte 10 Minuten vor Zugabe von Hypoxanthin/Xanthinoxidase, um Eigenwirkungen des Pharmakons erfassen zu können. Die Kontrollgruppe setzte sich aus Gliazellen unter der Einwirkung von HX/XOD 1mM/10mU/ml zusammen. Wir sahen, dass etwa 20 Minuten nach Induktion des oxidativen Stresses das Volumen in der Kontrollgruppe abnahm, während diese Tendenz in der Testgruppe nicht festgestellt werden konnte. Die Volumenabnahme betrug in dieser Gruppe lediglich 3% und der Minimalwert wurde in der letzten Messung mit $97,0 \pm 4,2\%$ gemessen. Die Zellschrumpfung der Kontrollgruppe lag bei 91% des Ausgangzellvolumens. Obwohl die Hemmung der Zellschrumpfung durch Amilorid keine signifikanten Ergebnisse zeigte, lässt sich dennoch eine sehr deutliche Reduktion der Volumenabnahme erkennen. Die Streuung der Werte war in der Testgruppe bei einem kleinen Stichprobenumfang ($n=5$) relativ groß und die Testphase mit 120 Minuten wiederum zu knapp bemessen. Der Na^+/H^+ -Antiporter scheint jedoch in den Prozess der Zellvolumenabnahme unter oxidativem Stress involviert zu sein. Versuche unter kombiniertem Einfluß von oxidativem Stress mit Ouabain oder in natriumfreien Medium könnten weitere Aufschlüsse bringen, da scheinbar noch andere Systeme zur Zellschrumpfung beitragen.

4.5. Freie Sauerstoffradikale und Apoptose

Apoptose ist eine Form des Zelltods, bei dem die Zelle eine aktive Rolle bei ihrem eigenen Untergang spielt (Kerr et al.,1972). Die Apoptose ist nicht nur für die Entwicklung des Zentralnervensystems ein notwendiger Vorgang, sondern spielt scheinbar auch bei vielen pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. bei der fokalen zerebralen Ischämie oder der Exzitotoxizität, eine große Rolle (Bredesen,1995). Bei Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie konnten anhand der TUNEL-Färbung im histologischen Präparat DNS-Strangbrüche nachgewiesen werden (Li et al.,1995, Chopp et al.,1996, Li et al.,1998). Das morphologische Korrelat bildet auf biochemischer Ebene die DNS-Fragmentierung („DNS-laddering“) in internukleosomalen Regionen, die ein wichtiges Merkmal der Apoptose darstellen (Wyllie,1980). Die Intravenöse Applikation von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle konnte die Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach einem Insult signifikant verringern (Chopp et al.,1996). Weiterhin konnte durch spezifische Hemmung von Caspasen eine ausgeprägte Hemmung der Infarktausdehnung nach fokaler zerebraler Ischämie erreicht werden (Hara et al.,1997b), was durch Experimente mit „Knock out“-Mäusen ohne Gen für das Caspase Interleukin Converting Enzyme (ICE) bestätigt werden konnte (Hara et al.,1997a). Die Inhibition von Caspasen scheint darüber hinaus synergistische Therapiewirkungen mit dem NMDA-Antagonisten MK-801 bei der Reduktion des Infarktolumens nach fokaler zerebraler Ischämie zu haben (Ma et al.,1998). Nach fokaler Kälteläsion konnten ebenfalls TUNEL-positive Zellen beobachtet werden (Murakami et al.,1998).

Zunehmend erlangen freie Radikale im Zusammenhang mit der Apoptose großes wissenschaftliches Interesse (Mikawa et al.,1996, Murakami et al.,1997, Fujimura et al.,2000, Sullivan et al.,1999, Whalen et al.,2000). ROS können die Apoptosekaskade initiieren (Buttke et al.,1994, Jabs,1999, Liu et al.,1996, Fiskum 2000, Hakem et al.,1998, Kuida et al.,1998, Slee et al.,1999, Enari et al.,1998, Buki et al.,2000, Cai et al.,1998). Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass freie Radikale die Apoptose durch Aktivierung der Transkription von NF- κ B, des Aktivator Proteins 1 (AP1), Fas/APO-1 und des p53-Proteins induzieren können (Maziere et al.,1999, Sun et al.,2000, Uberti et al.,1999). Ausgelöst durch H₂O₂-induzierten oxidativen Stress, gilt das p53-Protein als Mediator vieler zellulärer Prozesse, wie z.B. der Hemmung des Zellwachstums und der Aktivierung der Apoptose (Uberti et al.,1999). Das p53-Protein kann zudem über Transkription Fas/APO-1 aktivieren. Dies ist ein Apoptose bezogenes Gen, das zur Familie der TNF-Rezeptoren (Tumor-Nekrose-Faktor) zählt. Diese

Rezeptoren aktivieren Caspasen, die Schlüsselenzyme im Ablauf apoptotischer Prozesse (Sheard et al.,1997). Sun et al. konnte in in-vitro Versuchen mit Gliomzellen zeigen, dass OHAP-1 (Okinawa Habu Apoxin Protein-1), ein spezifisches Protein aus Okinawa-Habu-Gift (*Trimeresurus flavoviridis*), die intrazelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid erhöhte. Das erhöhte H₂O₂ initiierte konsekutiv Apoptose über vermehrte Expression des p53-Proteins (Sun et al.,2003).

Unter der Vorstellung, dass apoptotische Vorgänge durch die Induktion oxidativen Stresses in unseren Versuchen eine Rolle gespielt haben könnten, muß die Volumenabnahme der C6-Gliomzellen aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden. Die im Metrizell gemessene Zellschrumpfung kann unter diesen Kautelen nicht als Adaptationsvorgang oder Schutzmechanismus gedeutet werden.

Morphologische Kriterien unterscheiden die Apoptose von der Zellnekrose (Kerr et al.,1972). Bereits im Frühstadium der apoptotischen Kaskade können Zellveränderungen beobachtet werden. Die Chromatinmargination bezeichnet einen Vorgang, bei dem Chromatin kondensiert und an den Rand des Zellkerns wandert. Die Zellmembran entwickelt Ausstülpungen, sogenannte „blebbs“. Zellfragmente, mit oder ohne Zellkernbestandteile, werden dabei als „apoptotic bodies“ abgeschnürt. Im weiteren Verlauf fragmentiert der Kern. Während dieser Vorgänge bleiben die Zellmembran und Zellorganellen intakt.

Bezogen auf unsere Versuche könnten somit „apoptotic bodies“ eine Abnahme des Zellvolumens vortäuschen. Dies steht in gutem Einklang mit der Beobachtung, dass die Zellvitalität in allen unseren Versuchsreihen unter oxidativem Stress erhalten blieb.

4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Aufklärung der Mechanismen, die bei der Ausbildung der zytotoxischen Glia- und Nervenzellschwellung beteiligt sind, hat große klinische Bedeutung. Experimentelle wie klinische Absicht ist es, das zytotoxische Hirnödem therapeutisch zu beeinflussen. Grundsätzlich sollte in Zukunft die Prognose von Patienten mit zerebraler Ischämie oder einem Schädel-Hirn-Trauma nur noch von Art und Ausmaß des Primärschadens abhängen, nicht jedoch vom sekundären Hirnschaden.

Wie bereits erwähnt, zeigten experimentelle Untersuchungen in vivo, wie in vitro, eine Vielzahl von Mechanismen, die an der Ausbildung des zerebralen Sekundärschadens beteiligt sind. Die Bildung und Freisetzung neurotoxischer Mediatoren auf zellulärer Ebene stehen

dabei im Mittelpunkt wissenschaftlicher Bemühungen. Die Arbeit soll zum Verständnis beitragen, welche Rolle freie Sauerstoffradikale bei der Bildung des zytotoxischen Hirnödems spielen.

Freie Sauerstoffradikale (ROS) werden nach akuten zerebralen Insulten und Traumen vermehrt im Hirngewebe gebildet. Physiologische Antioxidationsmechanismen werden durch das gesteigerte Angebot an ROS überlastet. Durch ihre ausgeprägte „Reaktionsfreudigkeit“ gehen sie mit dem nächstgelegenen Molekül eine Bindung ein und können so Membranen von Zellen und Zellorganellen, sowie Proteine und DNS-Bindungen zerstören.

Die demonstrierten in vitro Versuche von suspendierten Gliazellen unter oxidativem Stress zeigten, dass freie Sauerstoffradikale nicht an der zytotoxischen Gliazellschwellung beteiligt sind. Weiter konnte gezeigt werden, dass C6-Gliomzellen in vitro sehr resistent gegen oxidativen Stress sind.

In Verbindung mit extrazellulärer Laktatazidose nahm das Zellvolumen nach Applikation freier Radikale ebenfalls ab. Amilorid, ein spezifischer Inhibitor des Na^+/H^+ -Antiporters, kann die Zellschrumpfung reduzieren. Dies legt den Schluß nahe, dass der Na^+/H^+ -Antiporter neben anderen Mechanismen in den Prozess der Zellvolumenabnahme involviert ist.

Die Arbeit kann nur einige, wenige Fragen über freie Sauerstoffradikale in Verbindung mit dem zytotoxischen Hirnödem beantworten. Die Beantwortung dieser offenen Fragen muß im Interesse zukünftiger wissenschaftlicher Bemühungen stehen, um die grundlegenden Charakteristika freier Radikale zu verstehen und kausale Therapien einsetzen zu können.

Notwendig dazu sind sowohl in vitro-, wie auch in vivo-Versuche. Tierexperimentelle Untersuchungen mit „Knock out“-Mäusen bieten einen erfolgversprechenden Ansatz. Ebenso wichtig sind aber auch in vitro Versuche, da nur sie die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer Ebene ermöglichen können.

5. Zusammenfassung

Das zytotoxische Hirnödem ist eine wichtige Manifestation des zerebralen Sekundärschadens nach zerebraler Ischämie und Schädel-Hirn-Trauma. Der Analyse von Schwellungs- und Schädigungsmechanismen auf zellulärer Ebene *in vivo* ist durch die Komplexität der zeitgleich ablaufenden Ereignisse enge Grenzen gesetzt. Für die vorliegenden Experimente wurde deswegen ein *in vitro* Modell verwendet, welches die Untersuchung von C6-Gliomzellen als Einzelzellsuspension unter definierten und kontrollierten Bedingungen bei Veränderung verschiedener Parameter erlaubt. In den letzten Jahren konnten am Institut für Chirurgische Forschung anhand dieses Modells einige Mediatoren des zytotoxischen Ödems *in vitro* identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der durchgeführten Untersuchungen zur Aufklärung der Mechanismen der zytotoxischen Zellschwellung. Sie befasst sich mit der Frage, welchen Einfluß freie Sauerstoffradikale (ROS) auf das Zellvolumen und die Zellvitalität von C6-Gliazellen *in vitro* haben. Freie Sauerstoffradikale werden unter akuten pathologischen Bedingungen vermehrt im Gehirn freigesetzt. Sie erzeugen durch ihre starke Reaktionsfähigkeit vielfältige pathophysiologische Wirkungen im Gehirn, die zur Zerstörung von Zellmembranen, Oxidation zellulärer Strukturen und DNS-Strangbrüchen führen.

Für die Analyse des im Mittelpunkt stehenden Parameters Zellvolumen wurde die Durchflußzytometrie eingesetzt. Die Vitalität der Zellen wurde anhand der Trypanblau-Ausschlußmethode ermittelt.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluß von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf das Volumen und die Vitalität von C6-Gliomzellen untersucht.

Die Zellvolumenänderung von C6-Gliomzellen durch H_2O_2 unterliegt einer Dosis-Wirkungsbeziehung. 0,1 mM H_2O_2 bewirkte über den Beobachtungszeitraum von 120 Minuten keine Volumenänderung. Ab einer Endkonzentration von 0,5 mM H_2O_2 kam es zu einer raschen Zellvolumenabnahme. Es folgten biphasische Verläufe der Volumenänderungen unter 0,5, 1,0 und 5,0 mM H_2O_2 . Das Zellvolumen erreichte nachfolgend das Ausgangszellvolumen. Unter der Applikation von 5,0 mM H_2O_2 kam es in der zweiten Stunde des Beobachtungszeitraumes zu einer signifikanten Zellschwellung.

In weiteren Versuchen induzierten wir oxidativen Stress extrazellulär durch das Enzym Xanthinoxidase mit dem Substrat Hypoxanthin (HX/XOD) in den Enkonzentrationen 1 mM HX, 10 oder 20 mU/ml. HX/XOD provozierte in beiden Versuchsreihen eine prompte Abnahme des Zellvolumens auf Werte um 90% des Ausgangszellvolumens. Das Zellvolumen zeigte während des Beobachtungszeitraumes keine Rückregulation, wie in den Versuchen mit H₂O₂. XOD 10 mU/ml ohne HX zeigte einen ähnlichen Verlauf der Volumenänderung. Die Applikation von HX alleine bewirkte keine Volumenänderung.

Mit dem Pharmakon Menadion (MQ), das Zellmembranen passieren kann, induzierten wir oxidativen Stress intrazellulär. Menadion wurde in den Enkonzentrationen 25 und 50 µM verwendet. Während nach Applikation von 25 µM Menadion keine Volumenänderung bei C6-Gliomzellen zu verzeichnen war, provozierte 50 µM Menadion eine signifikante Zellschrumpfung nach einer Latenzphase von 100 Minuten.

Eine extrazelluläre Laktatazidose von 6,8 führte, wie bereits bekannt, zu einer Schwellung von C6-Gliomzellen auf 115% des Ausgangswertes. Die Zellvitalität blieb unverändert. In Kombination mit oxidativem Stress mittels HX/XOD 1/10 mM/mU/ml, zeigte sich eine dazu spiegelbildlich verlaufende Zellschrumpfung. Offensichtlich hemmen freie Radikale demnach die Mechanismen die zur azidoseinduzierten Zellschwellung führen, wie z.B. den Na⁺/H⁺-Antiporter.

Diese Annahme haben wir mit dem Na⁺/H⁺-Inhibitor Amilorid bestätigt. Die radikalinduzierte Zellvolumenänderung konnte mit Amilorid fast vollständig gehemmt werden. Die Vitalität der C6-Gliomzellen zeigte in keiner der Versuchsreihen eine Abnahme über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass freie Sauerstoffradikale in vitro zu einer Schrumpfung von C6-Gliomzellen führen. Die Ergebnisse legen somit den Schluß nahe, dass freie Sauerstoffradikale nicht an der Pathogenese des zytotoxischen Hirnödems beteiligt sind. Freie Sauerstoffradikale sind allerdings in der Lage, die Clearance-Funktion von Gliazellen zu stören. So konnten ROS die Aufnahme von H⁺-Ionen (zusammen mit der konsekutiven Aufnahme von Na⁺-Ionen) und die daraus folgende kompensatorische Zellschwellung hemmen. Freie Radikale scheinen also nicht direkt toxisch zu wirken, sondern über die Hemmung Astrozyten-vermittelter neuroprotektiver Mechanismen, wie z.B. die Clearance von H⁺ aus dem Extrazellulärraum. Weitere Untersuchungen müssen diesen Anfangsverdacht im Detail klären.

6. Literatur

Abrahamse SL, Vis A, Bindels RJ, van Os CH. Regulation of intracellular pH in crypt cells from rabbit distal colon. *Am J Physiol* 267 (3Pt1): G 409-415, 1994

Ames A, Nesbett FB. Pathophysiology of ischemic cell death: II. Changes in plasma membrane permeability and cell volume. *Stroke* 14: 227-233, 1983a

Arieff AI, Guisado R, Lazarowitz VC. Pathophysiology of hyperosmolar states. In Andreoli, Grantham and Rector (eds.) *Disturbances of body Fluid osmolality*. Amer Physiol Soc Bethesda 227-249, 1977

Armstead WM, Mirro R, Leffler CW, Busija DW. Cerebral superoxide anion generation during seizures in newborn pigs. *J Cereb Blood flow Metab* 9: 175-179, 1985

Arvin B, Neville LF, Barone CF, Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 445-452, 1996

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

Astrup J, Siesjö BK und Symon L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725, 1981

Auer LM, Pfurtscheller G, Abobaker S, Ott E, Marguc KJ, Lechner H. Penumbra around chronic cerebral infarction? *Neurol Res* 10: 246-251, 1988

Backhovens H, Gheuens J, Slegers H. Expression of glial fibrillary acidic protein in rat C6 glioma relates to vimentin and is independent of cell-cell contact. *J Neurochem* 49: 348-354, 1987

Baethmann A, Go KG, Unterberg A. (eds.) Mechanisms of Secondary Brain Damage, NATO ASI Series A: Life Sciences, Vol. 115, Plenum Press, New York- London, 1986

Baethmann A, Kempfski O. Pathophysiologie des Hirnödems. Anästhesiologie und Intensivmedizin 7/8 (38): 347-356, Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, 1997

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

Baethmann A. Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. Neurosurg Review 1:85-100, 1978

Baethmann A, Schürer L, Unterberg A, Wahl W, Staub F, Kempfski O. Mediatorsubstanzen des Hirnödems bei der zerebralen Ischämie Arzneim-Forsch/Drug Res 41 (1): Nr. 3a, 1991

Baethmann A. Die Erforschung des Hirnödems durch deutsche Laboratorien- ein historisches Fragment. 2000

Baethmann A, Maier Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schürer L. Mediators of brain edema and secondary brain damage. Crit Care Med 16: 972-978, 1988

Baethmann A, Maier-Hauff K, Staub F, Schneider G-H, Rothenfuß W, Kempfski O. Glutamat as a mediator of secondary brain damage. In: glutamate-transmitter and toxin. Kempfski O, ed. Zuckschwerdt, München-Bern-Wien-New York, 65-75, 1993

Baethmann A. BMBF-Verbund „Neurotrauma“ München. Multizentrische Systemanalyse der prä- und frühklinischen Versorgung von Patienten mit schwerem Schädel-Hirntrauma in Oberbayern und Schwaben.(bisher unveröffentlichte Studie), 2001

Ballanyi K, Grafe P, Serve G, Schlue WR. Electrophysiological measurements of volume changes in Leech neurophile glial cells. Glia 3:151-158, 1990

Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* 23: 1337-1348, 1992

Beckmann JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 15: 53-59, 1991

Bellomo G, Thor H, Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. *Methods Enzymol* 186: 627-635, 1990

Beloqui O, Cederbaum AI. Microsomal interactions between iron, paraquat, and menadione: effect on hydroxyl radical production and alcohol oxidation. *Arch Biochem Biophys* 242(1): 187-196, 1985

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine I, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371, 1968

Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ. Comparison of different methods of determining of cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res* 97: 275-280, 1976

Bignami A, Swanson J, Dahl D. GFA expression in aggregation cultures of rat C6-glioma. *Experientia* 35: 1170-1171, 1979

Bolli M. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy began at the time of reperfusion. *Circ Res* 65: 607-622, 1989

Bonita R, Stewart A, Beaglehole R. International trends in stroke mortality: 1970-1985 [see comments]. *Stroke* 21: 989-992, 1990

Bortner CD, Hughes MFJ, Cidowski JA. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32436-32442, 1997

Branston NM, Symon L, Crockard HA, Pasztor E. Relationship between the cortical evoked potential and local cortical blood flow following acute middle cerebral artery occlusion in the baboon. *Exp Neurol* 45: 195-208, 1974

Braugher JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 6:289-301, 1989

Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. Interaction of lipidperoxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2:269-283, 1985a

Braugher JM, Duncan LA, Goodman T. Calcium enhances in vitro free radical-induced damage to brain synaptosomes, mitochondria, and cultured spinal cord neurons. *J Neurochem* 45:1288-1293, 1985b

Braugher JM, Pregenzer JF, Chase RL, Duncan LA, Jacobsen EJ, McCall JM. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262:10438-10440, 1987

Bredesen DE. Neuronal apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851, 1995

Buki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 20: 2825-2834, 2000

Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM, Adams JH. Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neuro Neurosurg Psych* 54: 427-434, 1991

Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221: 281-290, 1983

Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Tod* 15: 7-10, 1994

Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273: 11401-11404, 1998

Cala PM. Volume regulation by amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J Gen Physiol* 683-708, 1980

Chan PH, Fishman RA. Brain edema: induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* 201: 358-360, 1978

Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996

Chan PH, Chen SF, Yu AC. Induction of intracellular superoxide radical formation by arachidonic acid and by polyunsaturated fatty acids in primary astrocytic cultures. *J Neurochem* 50: 1185-1193, 1988

Chan PH, Epstein CJ, Li Y. Transgenic mice and knockout mutants in the study of oxidative stress in brain injury. *J Neurotrauma* 12: 815-824, 1995

Chan PH, Kawase M, Murakami K. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 18: 8292-8299, 1998

Chassande O, Frelin C, Farahifar D, Jean T, Lazdunski M. The Na⁺/K⁺/Cl⁻-cotransport in C6 glioma cells : properties and role in volume regulation. *Eur J Biochem* 171: 425-433, 1988

Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 55: 2091-2097, 1990

Chopp M, Li Y. Apoptosis in focal cerebral ischemia. In: *Mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and Trauma* (A Baethamnn, O Kempfski, N Plesnila and F Staub, Hg.) *Acta Neurochir Suppl* 66: 21-26, Springer Verlag Wien, 1996

Clasen RA, Brown DV, Leavitt S and Hass GM. The production by liquid nitrogen of acute closed cerebral lesions. *Surg Gynaecol Obstet* 96: 605-616, 1953

Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. FEBS Lett 223: 284-288, 1987

Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem 179: 1-7, 1989

Coulter WH. Means for counting particles in a fluid. US Patent No 2,656,508, 1953

Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. Proc Natl El Conf 12: 1034-1040, 1956

Demopoulos HB, Flamm ES, Seligmann ML, Mitamura JA, Ransohoff J. Membrane perturbations in central nervous system injury: theoretical basis for free radical damage and a review of the experimental data. In: Popp AJ, Bourke RS, Nelson LR, Kimelberg HK (eds) Neural trauma. Raven Press, New York: 63-78, 1979

Dhillon HS, Dose JM, Scheff SW, Renuka Prasad M. Time course of changes in lactate and free fatty acids after experimental brain injury and relationship to morphologic damage. Exp Neurol 146: 240-249, 1997

Doroshov J.H. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinines. Proc Natl Acad Sci 86: 4513-4518, 1986

Dreher D, Jornot L, Junod AF. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca^{2+} -stores and protein synthesis in human endothelial cells. Circ Res 76: 388-395, 1994

Driscoll JS. Hazard GF, Wood HB, Goldin A. Cancer Chemother Rep Part 2 4: 1-362, 1974

Dux E, Hossmann KA, Siklos L. Calcium in the mitochondria following brief ischemia of gerbil brain. Neurosci Lett 78: 295-300, 1987

Echevarria M, Verkman AS. Optical measurement of osmotic water transport in cultured cells. Role of glucose transporters. J Gen Physiol 99: 573-589, 1992

Enari M, Sakahira A, Yooyama H, Okawa K, Iwamatsu K, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998

Erecinska M, Troeger MB, Wilson DF, Silver IA. The role of glial cells in regulation of neurotransmitter amino acids in the external environment. I. Transmembrane electrical and ion gradients and energy parameters in cultured glial-derived cell lines. *Brain Res* 369: 193-202, 1986

Eriskat J. Wachstumskinetik der Parenchymnekrose des Gehirns nach fokalem Trauma. Dissertation 1999, Medizinische Fakultät der LMU München

Eriskat J, Schürer L, Kempfski O, Baethmann A. Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir [Suppl]* 60: 425-427, 1994

Evans HM, Schulemann W. The action of vital stains belonging to the benzidin group. *Science* 39: 443-454, 1914

Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49:577-587, 1993

Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 62:670-679, 1990

Fisher M, Takano K. The penumbra, therapeutic time window and acute ischaemic stroke. *Baillieres Clin Neurol* 4:279-295, 1995

Filipovic DM, Reeves BW. Hydrogen peroxide activates glibenclamide sensitive K^+ channels in Ilc-pk1 cells. *Am J Physiol* 272: C737-C743, 1997

Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neuronal cell death. *J Neurotrauma* 17: 843-855, 2000

Folbergrova J, Kiyota Y, Pahlmark K, Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain? *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 145-152, 1993

Frangakis MV, Kimelberg HK. (1984) Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 9: 1689-1698, 1984

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982

Fridovich I. Superoxide dismutases. *Biochem Biophys Acta* 877:147-159, 1975

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity. Superoxide dismutase provides an important defense. *Science* 201: 251-259, 1978

Fujimoto T, Walker JT, Spatz M, Klatzo I, in HM Pappius, W Feindel (eds.) *Dynamics of Brain Edema*. Pp. 171-180, Springer Berlin-Heidelberg-New York, 1976

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH: The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrom c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 20: 2817-2824, 2000

Fukuhara T, Gotoh M, Kawauchi M, Asari S, Ohmoto T. Endogenous superoxide dismutase activity in reperfusion injuries. *Acta Neurochir* 60: 250-252, 1994

Gambihler S, Delius M. Transient increase in membrane permeability of L1210 cells upon exposure to lithotripter shock waves in vitro. *Naturwissenschaften* 79: 328-329, 1992

Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623-635, 1993

Garner MH, Garner WH, Spector A. Kinetic cooperativity change after H₂O₂ modification of (Na,K)-ATPase. *J Biol Chem* 259: 7712-7718, 1984

Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke [editorial; comment]. *Ann Neurol* 36: 553-554, 1994

Gotoh K, Kikuchi H, Kataoka H, Nagata I, Nozaki K, Takahashi JC, Hazama F. Altered nitric oxide synthase immunoreactivity in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathol* 92: 123-129, 1996

Gotoh K. Nitric oxide synthase immunoreactivity related to cold-induced brain edema. *Neurol Res* 20:637-642, 1998

Gottstein U. (1969) Therapy of circulatory disorders of the brain and the spinal cord. *Bibl Psychiatr Neurol* 139: 517-549, 1969

Graf J, Häussinger D. Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 24:53-77, 1996

Granger A, Korthuis SM. Physiological mechanisms of postischemic tissue injury. *Annual Rev Physiol* 57: 311-332, 1995

Grinstein S, Rothstein A. Mechanisms of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol* 90:1-12, 1986

Grinstein S, Cohen S, Rothstein A. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amilorid-sensitive Na⁺/H⁺ antiport. *J Gen Physiol* 83: 341-369, 1984

Grover NB, Naamann J, Sasson B, Dolianski F. Electrical sizing of particles in suspension. *J Theory Biophys* 9: 1398-1414, 1969

Hakem R, Hakem A, Duncan GS. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339-352, 1998

Halks-Miller M, Henderson M, Eng LF. Alpha tocopherol decreases lipid peroxidation, neuronal necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 45 : 471-484, 1986

Hall ED Andrus PK, Yonkers PA. Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 60: 588-594, 1993

Hall ED. The role of oxygen radicals in traumatic injury: clinical implications. *J Emerg Med* 11: 31-36, 1993

Halliwell B. Reactive oxygen spezies and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992

Hannuniemi R, Pajari Backas M, Oja OS, Oja SS. Transport of leucine, lysine, glycine and aspartate in neuroblastoma C1300 and glioma C6 cells. *Acta Physiol Scand* 131: 575-581, 1987

Hara H, Fink K, Endres M, Friedlander RM, Gagliardini V, Yuan J, Moskowitz MA. Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:370-375, 1997a

Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci* 94: 2007-2012, 1997b

Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyck U, Wagner R, Wienhard K. Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke . *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 193-203, 1992

Hensel M, Volk T, Kox WJ. The influence of cellular hypoxia and reactive oxygen spezies on the development of endothelial cell edema. *Int J Microcirc* 17: 67-74, 1997

Hillered L, Ernster L. Respiratory activity of isolated rat brain mitochondria following in vitro exposure to oxygen radicals. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:207-214, 1983

Hogg N, Darley-USmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *J Biochem* 281: 419-424, 1992

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2811-2814, 1991

Hossmann KA, in G. Paal (Hrsg.) *Therapie der Hirndurchblutungsstörungen*, Pp. 37-84, Edition Medizin, Weinheim, 1984

Hossmann KA. Development and resolution of ischemic brain swelling , in HM. Pappius, W. Feindel (eds.) *Dynamics of Brain Edema*. Pp. 219-227 Springer, Berlin-Heidelberg, 1976

Hossmann KA, Sagaki S, Zimmermann V. Cation activities in reversible ischemia of the cat brain. *Stroke* 8: 77-81, 1977

Hossmann KA. The pathophysiology of experimental brain edema. *Neurosurg Rev* 12: 263-280, 1989

Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia [see comments] *Ann Neurol* 36: 557-565, 1994

Hue RT, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199, 1993

Hüller R, Päßgen W, Glossner E, Hummel P, Kachel V. A PC-AT based video device for flow cytometrically triggered cell imaging in flow. *Comp Med Imag Graph* 15: 85-91, 1991

Hyslop PA, Zhang Z, Pearson DV, Phebus LA. Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrainischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro. *Brain Res* 671:181-186, 1995

Ikeda Y, Anderson JH, Long DM. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. *Neurosurg* 24: 679-685, 1989

Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 27: 1-11, 1990b

Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 57: 231-245, 1999

Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 61: 654-666, 1997

Javaheri S, Weyne J, Demeester G, Leusen I. Effects of SITS, an anion transport blocker, on CSF ionic composition in metabolic alkalosis. *J Appl Physiol* 57: 92-97, 1984

Jean T, Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The Na^+/H^+ exchange system in glial cell lines. Properties and activation by an hyperosmotic shock. *Eur J Biochem* 160: 211-219, 1986

Jennett B. Minimising brain damage from head injury by appropriate early management. In: *Neuropsychological Rehabilitation* (v. Steinbüchel N, v. Cramon DY, Pöppel E. eds.) Pp 139-145. Berlin: Springer, 1992

Jussofie A, Kirsch M, De Groot H. Ca^{2+} -dependent cytotoxicity of H_2O_2 in L929 cells: The role of H_2O_2 -induced Na^+ -influx. *Free Radic Biol Med* 6:712-719, 1998

Kachel V. An electronic method for the improvement of volume analysis in Coulter's particle sizing volumetric technic. *Blut* 27(4): 270-274, 1973

Kachel V. Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument "Metrizell". *J Histochem Cytochem* 24: 211-230, 1976

Kachel V, Glossner E, Kordwig E, Ruhstroth-Bauer G. (1977) Fluvo-metricell, a combined cell-volume and cell fluorescence analyser. *J Histochem Cytochem* 25(7): 774-780, 1977

Kachel V, Messerschmidt R, Hummel P. Eight-parameter PC-AT based flow cytometric data system. *Cytometry* 11(7): 805-812. Review, 1990

Kagan VE, Serbinova EA, Bakalova RA. Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol. The role of hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 40: 2403-2413, 1990

Katz AM, Messineo FC. Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium. *Circ Res* 48: 1-16, 1981

Kazuo G, Haruhiko K, Hideo K, Izumi N, Kazuhiko N, Fumitada H. Nitric oxide synthase immunoreactivity related to cold-induced brain edema. *Neurol Res* 20: 637-642, 1998

Kempski O: Cell swelling mechanisms in brain, in: Baethmann A, Go KG, Unterberg A, Hrsg.: "Mechanisms of Secondary Brain Damage", NATO ASI Series A: Life Sciences, Vol. 115: 203-220, Plenum Press New York, 1986

Kempski O, Gross U, Baethmann A. An in vitro model of cytotoxic brain edema: Cell volume and metabolism of cultivated glial- and nerve cells. In: *Advances in Neurosurgery*, Vol.10 (Driesen W, Brock M, Klinger M, eds.), Berlin, Springer, Pp 254-258, 1982

Kempski O, Spatz M, Valet G, Baethmann A. Cell volume regulation of cerebrovascular endothelium in vitro. *J Cell Physiol* 123: 51-54, 1985

Kempski O, Staub F, v. Rosen F, Zimmer M, Neu A, Baethmann A. Molecular mechanisms of glial swelling in vitro. *Neurochem Pathol* 9: 109-125, 1988b

Kempski O, Staub F, Zimmer M, Schneider GH, Baethmann A. (1987c) Neurosurgical research in vitro: contradiction or promise? In. *Surgical research: recent concepts and results* (Baethmann A, Messmer K, eds), Berlin, Springer Verlag, Pp 9-17, 1987c

Kempski O, Staub F, Jansen M, Schödel F, Baethmann A. Glial swelling during extracellular acidosis in vitro. *Stroke* 19: 385-392, 1988a

Kempfski O, Chaussy L, Gross U, Zimmer M, Baethmann A. Volume regulation and metabolism of suspended C6 glioma cells: An in vitro model to study cytotoxic brain edema. *Brain Res* 279: 623-628, 1983

Kempfski O, Baethmann A, Neu A, Staub F. Analysis of molecular mechanisms causing ischemic cell swelling in-vitro. *Elsevier Sci Pub* 131-139, 1986

Kempfski O, Staub F, Schneider GH, Weigt H, Baethmann A. Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high K⁺ concentrations and acidosis. In: *Progress in Brain Research* (Yu ACH, hertz L, Norenberg MD, Sykova E, Waxman SG eds) Elsevier Science Publishers B.V.: 69-75, 1992

Kerr JFR, Whyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Canc* 26: 239-257, 1972

Kimelberg Hk, O'Connor ER, Sankar P, Keese C. Methods for determination of cell volume in tissue culture. *Can J Physiol Pharmacol* 70, Suppl: 323-333, 1992

Kimelberg HK, Ransom BR. (1986) Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: *Astrocytes* (Fedoroff S, Vernadakis A, eds.) Pp 129-166. San Diego: Academic Press, 1986

Kimelberg HK. Methodological concerns: commentary on forum position paper. *Neurotoxicol* 19: 27-34, 1998

Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 83: 1051-1059, 1995

Kinuta Y, Kimura M, Itokawa Y, Ishikawa M, Kikuchi H. Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. *J Neurosurg* 71: 417-420, 1989

Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982

Klatzo I. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropath Exptl Neurol* 26: 1-14, 1967

Kletzien RF, Pariza MW, Becker JE, Potter VR. A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Anal Biochem* 68: 537-544, 1975

Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 23: 1367-1379, 1992

Kogure T, Kogure K. Molecular and biochemical events within the brain subjected to cerebral ischemia (targets for therapeutical intervention). *Clin Neurosci* 4: 179-183, 1997

Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57: 508-516, 1985

Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellies EF. Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G₂. *Science* 209: 1242-1245, 1980

Kontos HA. In: George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57: 508-516, 1985

Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 3: 257-263, 1986

Kontos Ha, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57: 142-151, 1985

Koong AC, Giaccia AJ, Hahn GM, Saad AH. Activation of potassium channels by hypoxia and reoxygenation in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *J Cell Physiol* 156: 341-347, 1993

Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26: 463-471, 1999

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Calcium-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am J Physiol* 269: C141-147, 1995

Kraus JF, McArthur DL and Silberman TA. Epidemiology of mild brain injury. *Semin Neurol* 14:1-7, 1994

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY. Reduced apoptosis and cytochrom c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94: 325-337, 1998

Lander HM. An essential role for free radicals and derived spezies in signal transduction. *FASEB J* 11: 118-124, 1997

Lehr D, Baethmann A, and study group. Management of patients with severe head injury in the preclinical phase: A prospective analysis. *J Trauma: Injury, Infection, and Crit Care* 42, No.5: 71-75, 1997

Lemasters JJ, DiGiuseppe J, Nieminen A-L, Herman B. Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325: 78-81, 1987

Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17: 871-890, 2000

Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C. Induction of fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26: 1252-1257, 1995

Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci* 156: 119-132, 1998

Lin P, Ahluwalia M, Gruenstein E. An alkaline pH-activated Cl^- -anion exchanger regulates pH homeostasis in fibroblasts. *Am J Physiol* 258: C132-C139, 1990

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirements for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996

Löffler G, Petrides PE. Physiologische Chemie, Intermediärstoffwechsel: Purine und Pyrimidine, S.479-482, 1985

Ma J, Endres M, Moskowitz MA. Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol* 124: 756-762, 1998

Macknight AD, Leader JP. Volume regulation in epithelia: experimental approaches. *Methods Enzymol* 171: 744-792, 1989

Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 56: 773-788, 1985

Maier-Hauff K, Baethmann A, Lange M, Schürer L und Unterberg A. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J Neurosurg* 61: 97-106, 1984a

Malis CD, Bonventre JV. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *J Biol Chem* 261: 14201-14208, 1986

Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, Kogure K. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 941-947, 1995

Matsuoka T, Kato M, Kako K. Effect of oxidants on Na,K,ATPase and its reversal. *Basic Res Cardiol* 85: 330-341, 1990

Maziere C, Conte MA, Degonville J, Ali D, Maziere JC. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF kappaB. *Biochem Biophys Res Comm* 265: 116-122, 1999

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985

McManus M, Fischbarg J, Sun A, Herbert S, Strange K. Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am J Physiol* 265: C562-C570, 1993

Memezewa H, Minamisawa H, Smith ML and Siesjö BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* 89:67-78,1992

Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151: 2132-2134, 1993

Meydani M, Macauley JB, Blumberg JB. Effect of dietary vitamin E and selenium on susceptibility of brain regions to lipid peroxidation. *Lipids* 23: 405-409, 1988

Mikawa S, Hiroyuki K, Hideyuki K, Gobbel GT, Chen S, Carlson E, Epstein CJ and Chan PH. Attenuation of acute and chronic damage following traumatic brain injury in copper, zink-superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurosurg* 85: 885-891, 1996

Miller JD, Becker DP, Ward JD, Sullivan HG, Adams WE, Rosner MJ. Significance of intracranial hypertension in severe head injury. *J Neurosurg* 47: 503-516, 1977

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991

Mori T, Kawamata T, Katayama Y, Maeda T, Aoyama N, Kikuchi T, Uwahodo Y. Antioxidant, OPC-14117, attenuates edema formation, and subsequent tissue damage following cortical contusion in rats. *Acta Neurochir* 71: 120-122, 1998

Morimoto Y, Yamamura T, Kemmotsu O. Influence of hypoxic and hypercapnic acidosis on brain water content after forebrain ischemia in the rat. *Crit Care Med* 21: 907-913, 1993

Morooka H, Hirotsune N, Wani T, Ohmoto T. Histochemical demonstration of free radicals in ischemic brain edema and protective effects of human recombinant superoxide dismutase on ischemic neuronal damage. *Acta Neurochir* 60: 307-309, 1994

Murakami K, Kondo T, Kawase M, Epstein CJ, Chan PH. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 28: 1797-1804, 1997

Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH. Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotr* 15: 825-835, 1998

Murdoch J, Hall R. Brain protection: Physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. *Can J Anaesth* 6: 663-671, 1990

Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020 : Global Burden of Disease Study. *Lancet*. May 24; 349(9064): 1498-1504, 1997

Myers RE. Lactic acid accumulation as cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. In: *Advances in perinatal neurology*. (Korbkinand R, Guilleminault G. eds.) 85-114, 1979

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064, 1992

Nechayeva NV, Litinskaya LL, Hartman J, Liza V, Lodin Z. Circahoralian changes in the size and dry mass of glioma C-6 cells in culture. *Physiologica Bohemoslovaca* 35: 162-170, 1986

Nishio S, Yunoki M, Noguchi Y, Kawauchi M, Asari S, Ohmoto T. Detection of lipid peroxidation and hydroxyl radicals in brain contusion in rats. *Acta Neurochir* 70: 84-86, 1997

Nutter LM, Ngo EO, Fisher GR, Gutierrez PL. DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells: correlation with cytotoxicity and role of NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase. *J Biol Chem* 267: 2474-2479, 1992

Obrenovitch TP, Urenjak J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J Neurotrauma* 14: 677-698, 1997

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10: 281-285, 1989

Oury TD, Card JP, Klann E. Localization of extracellular superoxide dismutase in adult mouse brain. *Brain Res* 850: 96-103, 1999

Pappenheimer AM. Experimental studies upon lymphocytes. I. The reaction of lymphocytes under various experimental conditions. *J Exp Med* 25: 633-650, 1917

Pappius HM. Fundamental aspects of brain edema. In: Vinken PJ, Bruyn GW, (Hg) *Handbook Clin Neurol* 16, Part I: Tumors of brain and skull, Pp 167-185. American Elsevier, 1974

Parker KK, Norenberg MD, Vernadakis A. „Transdifferentiation“ of C6 glial cells in culture. *Science* 208: 179-181, 1980

Paul J. *Cell & Tissue Culture*. Churchill Livingstone 5, Edinburgh London New York, 1975

Pegg DE. Viability assays for preserved cells, tissues, and organs. *Cryobiology* 26: 212-231, 1989

Peters J. Verbesserung der Mehrparameter-Durchflußzytometrie mit Fluvo II: Multidimensionale Datenaquisition und- analyse, Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1994

Pfeiffer SE, Betschart B, Cook J, Mancini P, Morris R. Glial cell lines. In: *Cell, Tissue and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S, Hertz L, eds), New York, Academic Press 287-346, 1977

Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue culture* (Kruse DF, ed), New York, Academic Press, 406-408, 1973

Plesnila N, Haberstock J, Peters J, Kölbl I, Baethmann A, Staub F. Effect of Lactacidosis on Cell Volume and Intracellular pH of Astrocytes. *J Neurotrauma* 16: 831-841, 1999

Poeck K. *Neurologie* 8. Auflage, Springer, Berlin, 1990

Pollock AS, Arieff AI. Abnormalities of cell volume regulation and their functional consequences. *Am Physiol Soc* F195-F205, 1980

Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32:1239-1246, 1982a

Reddanna P, Whelan J, Burgess JR. The role of vitamin E and selenium on arachidonic acid oxidation by way of the 5-lipoxygenase pathway. *Ann NY Acad Sci* 570: 136-145, 1989

Reichardt M. Zur Entstehung des Hirndrucks bei Hirngeschwülsten und anderen Hirnkrankheiten und über eine bei diesen zu beobachtende besondere Art von Hirnschwellung. *Dtsch Z Nervenheilk* 28: 306-355, 1905

Reilly PL, Graham DI, Adams JH, and Jannet B. Patients with head injury who talk and die. *Lancet* 2: 375-377, 1975

Rodell TC. The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. *Immunopharmacol* 33: 279-283, 1996

Roper PR, Drewinko B. Comparison of in vitro methods to determinate drug-induced cell lethality. *Cancer Res* 36: 2182-2188, 1976

Rothman SM, Olney JW. Glutamat and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111, 1986

Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 10: 229-302, 1987

Rothmann SM. Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 220: 536-537, 1983

Roy RS, McCord JM. Oxyradicals and their Scavenger systems. *Cellular and Medical Aspects*, (Greenwald RA, Cohen G, eds.) Vol.II: 145-153, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1983

Saha N, Schreiber R, Dahl VS, Lang F, Gerok W, Häussinger D. Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K⁺ balance in perfused rat liver. *J Biochem* 296: 701-717, 1993

Schlenker T, Feranchak AP, Schwake L, Stremmel W, Roman RM, Fitz GJ. Functional interactions between oxidative stress, membrane Na⁺ permeability, and cell volume in rat hepatoma cells. *Gastroenterol* 118: 395-403, 2000

Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70, Suppl: 334-343, 1992

Schneider GH. Molekulare Mechanismen der Glutamat-induzierten Gliazellschwellung. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1998

Schürer L. Hirnstoffwechsel und -funktion beim experimentellen Schädel-Hirntrauma. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1987

Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J. Upregulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionising radiation. *Int J Canc* 73 :757-762, 1997

Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17: 1007-1019, 1997

Shukla A, Dikshit M, Srimal RC. Status of antioxidants in brain microvessels of monkey and rat. *Free Radic Res* 22:303-308, 1995

Siesjö BK, Agardh CD, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1: 165-211, 1989

Siesjö BK. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann Emerg Med* 2: 959-969, 1993

Siesjö BK, Siesjö P. Mechanisms of secondary brain damage. *Eur J Anaesthesiol* 12 : 247-268, 1996

Siesjö BK. Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol* 9:31-88, 1988

Slee EA, Harte MT, Kluck RM. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281-292, 1999

Smith MT, Thor H, and Orrenius S. In: *Microsomes. Drug Oxidation and Drug Toxicity* (Sato, R., and Kato, R., eds.) Japan Scientific Societies Press, Tokyo 605-612, 1982

Sosin DM, Sacks JJ, Smith SM. Head injury-associated deaths in the United States from 1979 to 1986 [see comments]. *JAMA* 262: 2251-2255, 1989

Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H and Kempfski O. Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 866-876, 1990

Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J, Baethmann A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol Sci* 119: 79-84, 1993b

Staub F, Peters J, Kempfski O, Schneider GH, Schürer L, Baethmann A. Swelling of glial cells in lactacidosis and by glutamate: Significance of Cl⁻-transport. *Brain Res* 610: 69-74, 1993a

Staub F. Schwellung und Schädigung von Gliazellen durch Azidose. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1992

Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A. Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 1030-1039, 1994

Staub F. Arachidonsäure als Mediator des zytotoxischen Hirnödems: Eine experimentelle in vitro Studie. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1994

Steen HB. Light scattering measurement in an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry* 11: 223-230, 1990

Stoffel M, Berger S, Staub F, Eriskat J, Jakob K, Baethmann A. The effect of dietary α -Tocopherol on the experimental vasogenic brain edema. *J Neurotrauma* 14: Nr.5, 339-348, 1997

Strupp M, Staub F, Grafe P. A Calcium- and pH-dependent K^+ -channel of rat C6 glioma cells and its possible role in acidosis-induced cell swelling. *Glia* 9: 136-145, 1993

Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global ischemia. *J Neurosci* 19: RC39(1-6), 1999

Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 19: 6248-6254, 1999

Sun LK, Yoshii Y, Miyaki K. Cytotoxic effect through Fas/APO-1 expression due to vitamin K in human glioma cells. *J Neuro-Onc* 47: 31-38, 2000

Sun LK, Yoshii Y, Hyodo A, Tsurushima H, Saito A, Harakuni T, Li YP, Kariya K, Nozaki M, Morine N. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu venom in relation to oxidative stress. *Tox in Vitro* 17:169-177, 2003

Suzuki O, Yagi K. Formation of lipoperoxide in brain edema induced by cold injury. *Experientia* 30: 248, 1974

Symon L, Pasztor E, Branston NM. The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke* 5: 355-364, 1974

Symon L, Branston NM, Strong AJ, Hope TD. The concepts of thresholds of ischemia in relation to brain structure and function. *J Clin Pathol Suppl R Coll Pathol* 11:1982, 1977

Takashi M, Asano T, Matsui T, Muramatsu H, Ueda M, Kamiya T, Katayama Y, Abe T. Intraluminal increase of superoxide anion following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 816: 350-357, 1999

Thom TJ. Stroke mortality trends. An international perspective. *Ann Epidemiol* 3: 509-518, 1993

Thor HM, Smith T, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 257: 12419-12425, 1982

Toivanan JL. Effects of selenium, vitamin E, and vitamin C on human prostacyclin and thromboxane synthesis in vitro. *Prostaglandins Leukot Med* 26: 265-280, 1987

Uberti D, Yavin E, Gil S, Ayasola KR, Goldfinger N, Rotter V. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Mol Brain Res* 65: 167-175, 1999

Unterberg A, Wahl M, Hammersen F und Baethmann A. Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol* 73: 209-219, 1987

Unterberg A, Schmidt W, Wahl M, Ellis EF, Marmarou A, Baethmann A. Evidence against leukotrienes as mediators of brain edema. *J Neurosurg* 74: 773-780, 1991

Unterberg A, Baethmann A. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J Neurosurg* 61: 87-96, 1984

Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A und Müller-Esterl W. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J Neurosurg* 64: 269-276, 1986

Van Harreveld A. The extracellular space in the vertebrate central nervous system, in: Bourne GH (ed.) "The structure and function of nervous tissue". Acad Press 4: 447-511, 1972

Van Harreveld A, Fifkova E. Light- and electron-microscopic changes in central nervous tissue after electrophoretic injection of glutamate. *Exp Mol Pathol* 15: 61-81, 1971

Villacara A, Spatz M, Dodson RF, Corn C, Bembry J. Effect of arachidonic acid on cultured cerebromicrovascular endothelium: permeability, lipid peroxidation, and membrane "fluidity". *Acta Neuropathol Berl* 78: 310-316, 1989

Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42: 129-160, 1994

Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young AR. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacol* 33: 257-263, 1996

Walder CE, Green SP, Darbonne WC. (1997) Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke* 28: 2252-2258, 1997

Walker JE. Glutamate, GABA, and CNS disease: a review. *Neurochem Res* 8: 521-550, 1983

Walz W, Hertz L. Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Progr Neurobiol* 20: 521-550, 1983

Walz W, Hertz L. Sodium transport in astrocytes. *J Neurosci Res* 11: 231-239, 1984

Walz W, Hinks EC. Carrier-mediated KCL accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K⁺ levels by astrocytes. *Brain Res* 343: 44-51, 1985

Walz W, Hinks EC. A transmembrane sodium cycle in astrocytes. *Brain Res* 368: 226-232, 1986

Warner DS, Smith ML, Siesjö BK. Ischemia in normo- and hyperglycemic rats: effects on brain water and electrolytes. *Stroke* 18: 464-471, 1987

Watson BD, Busto R, Goldberg WJ, Santiso M, Yoshida S, Ginsberg MD. Lipid peroxidation in vivo induced by reversible global ischemia in rat brain. *J Neurochem* 42: 268-274, 1984

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376, 1989

Wettstein M, Häussinger D. Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 26:1560-1566, 1997

Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE. Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion-molecule-1. *J Leukoc Biol* 67: 160-168, 2000

Winkler AS, Baethmann A, Peters J, Kempfski O, Staub F. Mechanisms of arachidonic acid induced glial swelling. *Molec Brain Res* 00: 1-5, 2000

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980

Yannet H. Changes in the brain resulting from depletion of extracellular electrolytes. *Am J Physiol* 128: 683-689, 1940

Yasuma Y, Strasser A, Ruetzel C, McCarron R, Spatz M. The effect of nitric oxide inhibition on ischemic brain edema. *Acta neurochir* 70: 202-205, 1997

Zimmer DB, Van Eldick LJ. Analysis of the calcium-modulated proteins, S-100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma cell differentiation. *J Cell Biol* 108: 141-151, 1989

7. Danksagung

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung, Direktor Prof. Dr. A. Baethmann durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Baethmann bedanken. Durch die freundliche Aufnahme in sein Institut ermöglichte er mir die Durchführung der Experimente in der kooperativen, motivierenden und professionellen Atmosphäre, die diese Einrichtung auszeichnet. Durch offene Diskussionen und konstruktive Kritik hat er zur Arbeit beigetragen. Die wissenschaftliche Ausbildung und Förderung von Doktoranden am Institut für Chirurgische Forschung sind vorbildlich.

Herrn Privatdozent Plesnila gilt mein ganz herzlicher Dank - für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe, sowie für die geduldige, unermüdliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, Denken und Schreiben. Daß dabei Spaß, Faszination und Begeisterung nicht zu kurz kamen, ist sein besonderer Verdienst.

Bei Herrn Dr. Florian Ringel bedanke ich mich für die geduldige, sorgfältige und gründliche Einarbeitung in die experimentellen Techniken, die engagierte, tatkräftige Unterstützung bei der Lösung zahlreicher Probleme und für die offene, kritische Diskussion neuer Ideen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei den Assistentinnen Ingrid Kölbl und Ute Mamrak für die hervorragende Mithilfe bei den Laborarbeiten bedanken.

8. Lebenslauf

Name: Frank Markus Bieringer
Geburtsdatum: 21. März 1965
Geburtsort: Burghausen
Eltern: Ingrid Dietl, Buchhalterin
Emil Bieringer, Braumeister

Ausbildung

1985 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Traunreut
1985-1986 Grundwehrdienst an der Sanitätsakademie in München
1986-1987 Sprachenstudium in Padova/ Italien
Beginn des Studiums an der Humanmedizinischen Fakultät in Padova

Medizinische Ausbildung

1987-1994 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes in Homburg

Beruflicher Werdegang

07/1994-12/1994	Olympiapark-Klinik München	AIP Chirurgie
01/1995-12/1995	Kliniken Traunstein/ Trostberg GmbH	AIP Chirurgie
04/1996-03/1998	Kliniken Traunstein/ Trostberg GmbH	Assistenzarzt
04/1998-02/2000	Krankenhaus Freising GmbH	Assistenzarzt
03/2000-02/2001	Institut für Chirurgische Forschung	Doktorand
03/2001-03/2003	Orthopädische Kinderklinik Aschau	Assistenzarzt
05/2003-04/2004	Chiemgauklinik Marquartstein	Assistenzarzt
08/2004-07/2005	Praxis Dr. Paintner Bruckberg	Assistenzarzt

