

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der  
Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern  
Ehemaliger kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethmann  
Jetziger kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

# **Einfluß von Hypothermie auf die Volumenregulation von Gliazellen *in vitro***

## **Untersuchung zu zellulären Mechanismen**

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

vorgelegt von  
Edith Euringer  
aus Ingolstadt  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. N. Plesnila  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. R. Goldbrunner  
Prof. Dr. med. F.X. Beck  
Prof. Dr. med. H. Schad

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	3
1.1 EPIDEMIOLOGIE TRAUMATISCH/ISCHÄMISCHER HIRNSCHÄDEN.....	3
1.2 PATHOPHYSIOLOGIE DES ZEREBRALEN INSULTS: PRIMÄRER/SEKUNDÄRER HIRNSCHADEN, PENUMBRA....	5
1.3 HIRNÖDEM: VASOGENES, ZYTOTOXISCHES.....	7
1.4 THERAPEUTISCHE UND EXPERIMENTELLE ANSÄTZE BEI DER ANWENDUNG VON HYPOTHERMIE.....	9
1.5 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	11
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	13
2.1 VERSUCHSZELLEN.....	13
2.1.1 <b>C6 Gliomzellen</b> .....	13
2.1.1.1 Zellkultivierung.....	13
2.1.1.2 Subkultivierung.....	15
2.1.1.3 Zellgewinnung für den Versuch.....	15
2.1.2 <b>Primär kultivierte Astrozyten</b> .....	15
2.1.2.1 Zellkultur.....	15
2.1.2.2 Subkultivierung.....	16
2.1.2.3 Zellgewinnung.....	16
2.1.3 <b>Gewinnung von humanen Granulozyten</b> .....	17
2.2 SUSPENSIONSKAMMER.....	18
2.3 KONTROLLE DER SUSPENSIONSPARAMETER: TEMPERATUR- UND PH-MESSUNG.....	20
2.4 MESSUNG DES PARTIELLEN O <sub>2</sub> -, CO <sub>2</sub> -DRUCKS UND DER HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -KONZENTRATION.....	20
2.5 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL UND VITALITÄT.....	21
2.6 MESSUNG DER OSMOLARITÄT DES SUSPENSIONSMEDIUMS.....	21
2.7 DURCHFLUBZYTOMETRISCHE VOLUMENMESSUNG.....	21
2.8 VERSUCHSGRUPPEN.....	24
2.8.1 <b>Kontrollversuche</b> .....	24
2.8.2 <b>Einfluß von Temperaturveränderungen auf das Zellvolumen</b> .....	24
2.8.3 <b>Versuche zur Bedeutung von Ionentransportern während der Hypothermie-induzierten Gliaschwellung</b> .....	25
2.8.4 <b>Versuche zum therapeutischen Effekt von Hypothermie</b> .....	26
2.8.4.1 Inkubation in Milchsäureazidose.....	26
2.8.4.2 Inkubation mit Arachidonsäure.....	27
2.8.4.1 Inkubation mit Glutamat.....	27
2.9. VERSUCHSABLAUF.....	27
2.9.1 <b>Versuche in Hypo- und Hyperthermie in physiologischem Medium</b> .....	27
2.9.2 <b>Versuche zur Bedeutung osmotisch aktiver Ionen: Natrium, Chlorid</b> .....	29
2.9.3 <b>Versuche zur Bedeutung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters</b> .....	29
2.9.4 <b>Versuche nach Inkubation in Milchsäureazidose, Arachidonsäure und Glutamat</b> .....	29
2.10 DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK.....	30

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	31
3.1	KONTROLLVERSUCHE.....	31
3.1.1	<i>Temperaturabhängige Volumeneffekte verschiedener Zellen</i> .....	31
3.1.1.1	<i>C6 Gliomzellen in Hypo- und Hyperthermie</i> .....	31
3.1.1.2	<i>Einflußfluß von Hypothermie auf die Volumenregulation von C6 Gliomzellen</i> .....	32
3.1.1.3	<i>Primär kultivierte Astrozyten</i> .....	34
3.1.1.4	<i>Humane Granulozyten</i> .....	35
3.2	VERSUCHE ZUR BEDEUTUNG VON NATRIUM- UND CHLORID-IONEN BEI DER HYPOTHERMIE- INDUZIERTEN SCHWELLUNG VON GLIAZELLEN.....	36
3.2.1	<i>Natrium-freies Medium</i> .....	36
3.2.2	<i>Chlorid-freies Medium</i> .....	37
3.2.3	<i>Inhibition des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters</i> .....	39
3.3	EINFLUß VON HYPOTHERMIE AUF DIE MEDIATOR-INDUZIERTE ZELLSCHWELLUNG.....	40
3.3.1	<i>Milchsäureazidose</i> .....	40
3.3.2	<i>Arachidonsäure</i> .....	40
3.3.3	<i>Glutamat</i> .....	41
3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	44
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	44
4.1	C6 GLIOMZELLEN ALS MODELLZELLINIE FÜR PRIMÄR KULTIVIERTE ASTROZYTEN.....	44
4.2	DAS <i>IN VITRO</i> MODELL.....	46
4.3	SUBSTITUTION VON NATRIUM UND CHLORID-IONEN IM VERSUCHSMEDIUM.....	47
4.3.1	<i>Natrium-freies Medium</i> .....	47
4.3.2	<i>Chlorid-freies Medium</i> .....	48
4.4	INHIBITION DES Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -ANTIPORTERS MIT EIPA.....	49
4.5	HYPOTHERMIEEFFEKT AUF DIE ZYTOTOXISCHE SCHWELLUNG VON GLIAZELLEN.....	50
4.5.1	<i>Milchsäureazidose</i> .....	50
4.5.2	<i>Arachidonsäure</i> .....	51
4.5.3	<i>Glutamat</i> .....	52
4.6	SCHWELLUNG DES GLIAZELLEN IN HYPERTHERMIE.....	54
4.7	HYPOTHERMIEEFFEKT AUF HUMANE, NEUTROPHILE GRANULOZYTEN.....	54
4.8	GRUNDZÜGE DER VOLUMENREGULATION DER SÄUGETIER-ZELLE.....	56
4.9	KONZEPT DER HYPOTHERMIE-INDUZIERTEN SCHWELLUNG VON GLIAZELLEN.....	58
4.10	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	62
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	63
<b>6.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	96
<b>7.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	98

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie traumatisch/ ischämischer Hirnschäden

Die international verfügbaren epidemiologischen Daten zum Schädel-Hirn-Trauma sind insgesamt schwierig zu interpretieren. Schon die Definition des Begriffes Schädel-Hirn-Trauma erweist sich als heterogen, da zumeist Unterschiede in der differenzierten Erfassung reiner Schädel- oder kombinierter Schädelhirnverletzungen bestehen. Aus diesem Grund beschränkt sich die Datenbasis der meisten Studien auf kleinere Patientenkollektive. An nationalen Erhebungen stehen bisher nur zwei Studien aus England, Wales und Schottland zur Verfügung (Field JH, 1996; Jenett et al., 1996). Diese weisen jedoch teilweise recht divergente bzw. nicht problemlos miteinander vergleichbare Ergebnisse auf.

Erfreulicher stellt sich die Situation bei den nationalen Daten zum Schädel-Hirn Trauma in der Bundesrepublik Deutschland dar. Seit 1886 wird in Deutschland eine Sterbefallstatistik geführt. Seit 1968 werden auch in der Bundesrepublik Deutschland die Patientendaten nach ICD9 kategorisiert und katalogisiert. Die ICD9 (International Statistical Classification of Diseases, aktuell ICD10) ist eine einheitliche Klassifikation, nach der alle westeuropäischen Staaten Patientendaten kodieren. Zudem stellt das Statistische Bundesamt in Wiesbaden umfangreiches Datenmaterial zu den durchschnittlichen Liegezeiten und Krankenhauskosten zur Verfügung (Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden).

Die Klassifizierung nach ICD9 lässt eine genauere Aufschlüsselung nach Art und Schwere der Schädelverletzung zu. So haben 1996 bei einer Inzidenz von 340 Schädelhirnverletzungen (pro 100.000 Einwohner) rund 73% der Patienten eine *Commotio cerebri*, 12% eine Verletzung des Gesichtsschädels und rund 9% eine intracranielle Verletzung erlitten. Führt man zusätzlich eine Aufschlüsselung der intracraniellen Verletzungen nach Altersgruppen, bzw. eine altersgruppenspezifische Inzidenzberechnung durch, ergeben sich deutlich erhöhte Zahlen im Kleinkind- und Säuglingsalter, die nur langsam zum Erwachsenenalter hin abnehmen. Bei der näheren Betrachtung der einzelnen Diagnosen zeigen Frakturen des Schädeldaches und die *Commotio cerebri* eine deutlich erhöhte Inzidenz im Kleinkind- und Säuglingsalter (0-1 Jahr: Inzidenz 849,1, 25-35 Jahre: 178,7). Wohingegen es bei sub- und epiduralen Blutungen mit zunehmendem Alter zu einem Anstieg der Inzidenz kommt. Eine ausgeglichene Inzidenzverteilung in allen Altersgruppen weisen lediglich Kontusionen auf (Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Sterbefallstatistik 1996).

Bei der Analyse der Verweildauern im Krankenhaus ergeben sich für die verschiedenen ICD Ziffern große Unterschiede. Den kürzesten Krankenhausaufenthalt weisen die Patienten mit *Comotio cerebri* mit durchschnittlich 3,78 Tagen, die längsten Patienten mit Kontusionen (24,31 Tage) und intracraniellen Blutungen (26,63 Tage) auf. Legt man einer Hochrechnung aus Fallzahlen und durchschnittlicher Verweildauer die durchschnittlichen Kosten eines Krankenhaustages (1996: DM 543.-) zugrunde, so ergeben sich für das Jahr 1996 Gesamtkosten von über 900 Millionen DM für die vollstationäre Behandlung von Schädelhirnverletzungen (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Sterbefallstatistik 1996). Hierbei nicht inbegriffen sind die Kosten für operative Eingriffe, intensivmedizinische Betreuung oder anschließende Rehabilitationsmaßnahmen. Ebenso bleiben die enormen Aufwendungen für eventuell notwendig gewordene berufliche Umschulungsmaßnahmen, Langzeitpflege oder eine Frühberentungen in dieser Kalkulation unberücksichtigt, da es zu diesen Folgekosten keine konkreten Zahlen gibt.

Nicht weniger beeindruckend stellen sich die Zahlen beim ischämischen zerebralen Insult dar. Der Schlaganfall ist nach der koronaren Herzkrankheit und bösartigen Neubildungen die dritthäufigste Todesursache (Warlow et al., 1996). Zudem stellt er die häufigste neurologische Störung mit schwerwiegenden geistigen und körperlichen Behinderungen in der westlichen Welt dar (Martin et al. 1988). Einen Eindruck über die Anzahl der Erst-Schlaganfälle in der Bundesrepublik Deutschland vermitteln die 1998 erhobenen Daten der mittelfränkischen Stadt Erlangen. Basierend auf der Zahl von 1,74 Erst-Schlaganfällen pro 1000 Einwohner, ergibt sich für die 82 Mio Gesamtbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland eine Hochrechnung von 112.000 Erst-Schlaganfällen jährlich (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Einen wiederholten Schlaganfall erleiden 5-10 % der Betroffenen (Moroney et al., 1998), was hochgerechnet etwa 118.000-123.000 Schlaganfälle pro Jahr ergibt. Der Schlaganfall zeichnet sich zudem durch eine hohe Letalität aus (Weinfeld FD 1981; Baum et al., 1981, Warlow et al., 1996). Neben der Letalität sind die kurz- und langfristigen Folgen, die sich aus einer ischämischen Schädigung des Gehirns ergeben, gravierend. Wie beim Schädel-Hirn-Trauma können sich je nach Ausmaß der zerebralen Schädigung erhebliche Folgekosten für Rehabilitation und Langzeitpflege ergeben. Bezogen auf alle Verlaufsformen des Schlaganfalls bleiben etwa 30% der Patienten dauerhaft invalide und auf Pflege angewiesen. Nur ein Drittel erreicht nach dem Insult wieder die volle berufliche und soziale Rehabilitation (Wiebers et al., 1990).

Nach Schätzungen der neuen Krankheitskostenrechnung liegen allein die direkten Kosten zur Behandlung zerebrovaskulärer Erkrankungen 1994 bei knapp 12,2 Milliarden DM

(Gesundheitsbericht 1998). Allein diese Zahl lässt die große sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls erkennen. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat das Repertoire therapeutischer Optionen deutlich erweitert. Es umfasst unter anderem die Anwendung von rtPA zur Lyse von Thromben sowie Steroiden, Schleifendiuretika, Mannitol und Barbituraten zur Reduktion des Hirnödems. Sie alle tragen über unterschiedliche Mechanismen zur Protektion des noch vitalen Hirngewebes und zur Restitution reversibel geschädigter Areale nach einem Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma bei. Ein zentraler Punkt ist die Vermeidung des intrakraniellen Druckanstiegs, um die Versorgung des geschädigten Hirnareals zu verbessern und weitere Ischämien zu vermeiden (Rengachary et al., 1994).

Um neue, spezifische Therapieansätze zu entwickeln, ist jedoch die detaillierte Kenntnis der pathophysiologischen Vorgänge bei zerebralem Trauma oder Ischämie Voraussetzung.

## **1.2 Pathophysiologie des zerebralen Insults: Primärer/Sekundärer Hirnschaden, Penumbra**

Aufgrund der zeitlichen Abfolge werden die pathophysiologischen Prozesse eines traumatisch/ischämischen Insults in einen Primär- und Sekundärschaden gegliedert. Zum Primärschaden werden die Arten von Gewebeschädigung gezählt, die im Moment des Ereignisses auftreten. Dazu zählen unter anderem die Kontusion des Hirnparenchyms, Gefäßrupturen und der diffuse Axonschaden. Der Primärschaden zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß die Veränderungen irreversibel und nicht von therapeutischen Bemühungen zu beeinflussen sind (Siesjö BK, 1981).

Anders beim sekundären Hirnschaden. Er stellt eine Folge des Primärschadens dar und entwickelt sich erst im Laufe von Stunden, Tagen oder Wochen (Siesjö BK, 1988).

Am Beispiel der pathophysiologischen Vorgänge während einer zerebralen Ischämie, sollen die Ursachen dieses verzögerten Schadens näher erläutert werden. Zu Beginn steht der Substratmangel durch die mangelnde Durchblutung des Hirnparenchyms. Während der Blutfluß in gesundem Hirngewebe des Menschen 0,2-0,5 ml/g/min beträgt, ist der Blutfluß im Infarktkern auf 0,1-0,15 ml/g/min herabgesetzt (Astrup et al., 1981). Mit reduziertem Blutfluß stehen nur eingeschränkte Sauerstoff- und Glukosemengen zur Verfügung. Dieser Energiemangel führt zum Versagen energieabhängiger Ionenpumpen der Zellmembran, beispielsweise der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Siesjö BK, 1981). Dadurch können Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellularraum nicht aufrechterhalten werden. Das Membranpotential bricht zusammen und es kommt zur anoxischen Depolarisation der Zelle. Dadurch kann die Zelle ihre strukturelle Integrität nicht aufrechterhalten,

sie wird irreversibel geschädigt. Aus den geschädigten Zellen strömen Kalium- und Kalzium in das angrenzende Infarktgebiet. Zusätzlich werden exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat sowie Arachidonsäure freigesetzt (Baethmann et al., 1989; Siesjö et al., 1995; van Harreveld et al., 1971). Der Substrat- und Sauerstoffmangel führt zur Aktivierung der anaeroben Glykolyse mit der Produktion von Milchsäure. Diese akkumuliert und führt zum pH-Abfall im angrenzenden Gewebe, was zur weiteren Zellschädigung führt (Siesjö BK, 1981, Siesjö BK, 1988).

Bezeichnenderweise wird die Zone um den Infarktkern als Penumbra (= ‚Halbschatten‘) bezeichnet. Dieser Begriff stammt aus der Astronomie und beschreibt das nicht ganz dunkle Randgebiet um den Kern eines Sonnenflecks. Astrup, Symon und Lassen prägten und etablierten diesen Begriff für die Randzone des Infarktkerns Ende der 70er Jahre (Astrup et al., 1977; Siesjö BK, 1981). Von besonderem Interesse ist die Penumbra durch die Tatsache, daß der Blutfluß zwar auch hier herabgesetzt ist, der Energiemetabolismus jedoch noch zum Erhalt des Membranpotentials und der Zellvitalität ausreicht (Astrup et al., 1981, Memezawa et al., 1992). Mit Untergang der Zellen im Infarktkern ist die Penumbra zunehmend hohen Konzentrationen von Kalzium, Kalium, Glutamat und Milchsäure ausgesetzt (Siesjö et al., 1995). Die exzitatorische Aminosäure Glutamat akkumuliert im Extrazellularraum und aktiviert mit steigender Konzentration die Glutamat-abhängigen  $\text{Na}^+$ -Rezeptoren der umliegenden, noch lebenden Zellen. Diese unphysiologische Aktivierung Glutamat-abhängiger Rezeptoren führt zur Depolarisation der Zellen, die mit zunehmender Glutamatkonzentration ungehemmt immer wieder abläuft. Dieser Prozess endet mit dem Versiegen des Energienachschubs, da die Repolarisation - der Wiederaufbau des Ionengradienten zwischen Extra- und Intrazellularraum – nur von energieabhängigen Ionenpumpen bewerkstelligt werden kann. Das Membranpotential bricht endgültig zusammen, es kommt zum Absterben der Zellen (Mies et al., 1993, Kempinski et al., 2000).

Am Schluss der Schadenskaskade sind die Aktivierung der Mikroglia und die Apoptose zu finden (Stoll et al., 1998). Im Gegensatz zum Zelluntergang durch Nekrose weisen apoptotische Zellen keine fulminanten Zellschäden auf, sondern sind charakterisiert durch Chromatinkondensation und DNA-Zerstörung durch zelleigene Endonukleasen (Graham SH & Chen J, 2001).

In diesem Zusammenhang spricht man von einer ‚Reifung‘ des Infarktes. Die anfängliche Ischämie führt im Laufe von Stunden und Tagen durch die beschriebenen Schadenskaskaden zum Untergang des Gewebes um den primären Fokus. Das Resultat ist ein vergrößerter Parenchymschaden (Ginsberg MD & Pulsinelli WA, 1994). Es stellte sich die Frage, ob einige Abläufe der Schadenskaskade vermieden oder zumindest abgemildert werden könnten.



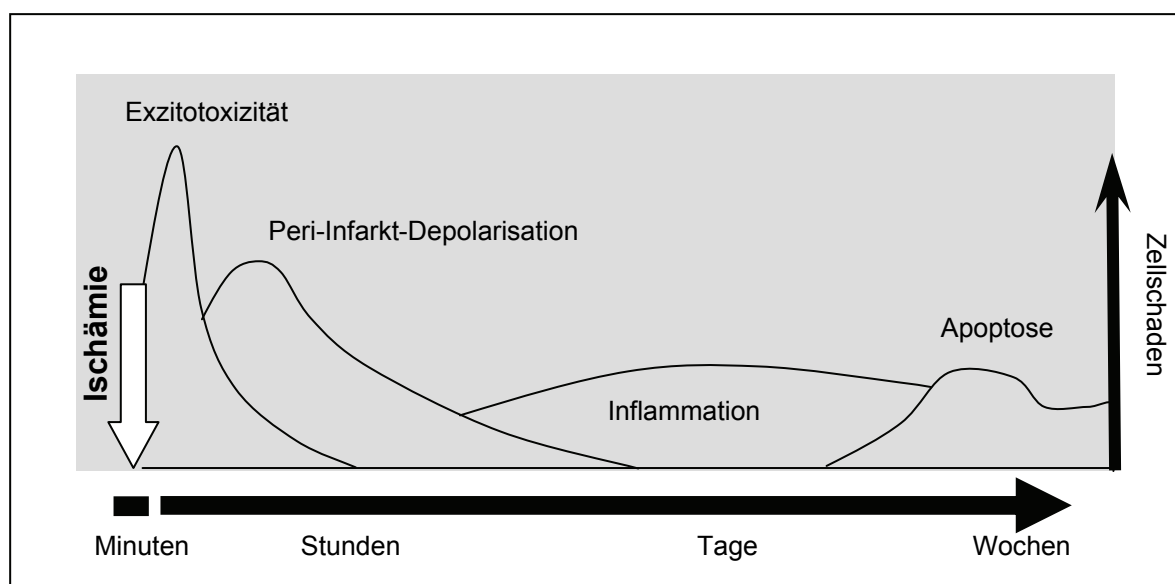


Abb. 1: Zeitlich versetzte Abfolge der Schädigung durch Ischämie, Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisation, Inflammation und Apoptose.

Ende der 80er Jahre fiel das Augenmerk auf einen weiteren Aspekt der pathophysiologischen Veränderungen in der Penumbra. Busto und Minamisawa beschrieben unmittelbar nach zerebraler Ischämie einen Temperaturabfall im betroffenen Hirnareal auf 30-32°C (Busto et al., 1987; Minamisawa et al., 1990). Diese Beobachtung erklärte man mit dem reduzierten Blutfluß im geschädigten Fokus. Die Absicht, Mechanismen des ischämisch/traumatischen Hirnschadens detailliert zu entschlüsseln, führte uns zu der Frage, ob diese Beobachtung nur ein Epiphänomen darstellt, oder ob milde Hypothermie bisher unverstandene Einflüsse auf zelluläre Vorgänge bei der ischämisch/traumatischen Hirnschädigung aufweist.

### 1.3 Hirnödem: vasogenes, zytotoxisches

Eine der gefürchteten Komplikationen des ischämisch/traumatischen Hirnschadens stellt das Hirnödem dar. Anders als Organe in anderen Körperregionen ist das Gehirn vom Schädel und den Meningen in seiner Volumenexpansion begrenzt. Übersteigt die Ausdehnung des Gehirns die intrakraniellen Reserveräume, kommt es durch den ansteigenden Druck zur Herniation des Gehirns und Erliegen der Blutzirkulation, letztendlich mit letalen Folgen (Baethmann et al., 1997).

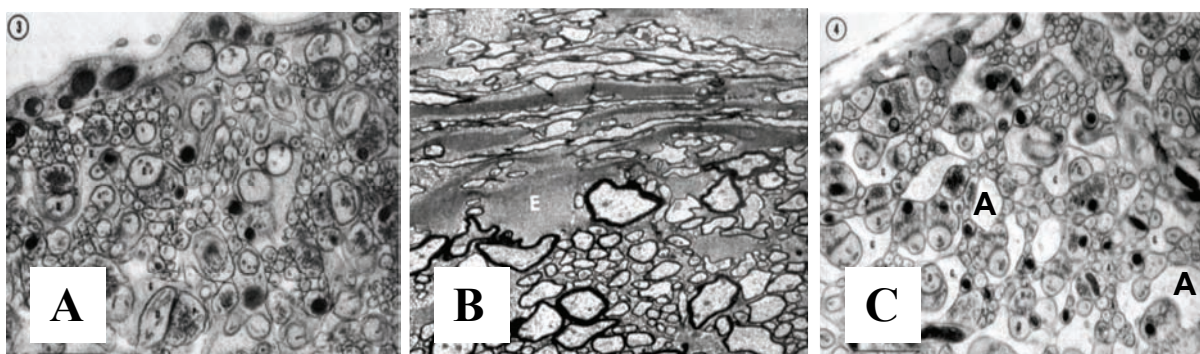
Aufgrund der Schwere dieser Komplikationen stellt das Hirnödem bei den zahlreichen Aspekten, die zum Sekundärschaden führen, einen besonders wichtigen Faktor dar. Bei den Todesfällen in den ersten Wochen nach einer zerebralen Ischämie zählt das Hirnödem zu den häufigsten

Ursachen, rund 50% der Opfer in Folge eines Schädel-Hirn-Traumas versterben am therapierefraktären Hirnödem (Schwab et al., 1996; Ropper AH & Shafran B, 1984).

Nach der Definition von Pappius ist beim Hirnödem der zerebrale Wassergehalt erhöht, was zur Zunahme der Gewebemasse und des Hirnvolumens führt (Pappius HM, 1970). Klatzo führte 1967 die noch heute verwendete Klassifikation in ein vasogenes und zytotoxisches Hirnödem ein, die auf neuropathologischen Veränderungen des Hirngewebes basiert (Klatzo I, 1967). Dabei ist das vasogene Ödem durch die Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke charakterisiert, die dem Schutz des Gehirns vor dem Übertritt von Makromolekülen aus dem Blut dient. Gebildet wird sie von sogenannten ‚tight junctions‘, den Verbindungsstellen zwischen den zerebrovaskulären Endothelzellen. Bricht diese Schranke - wie beim vasogenen Ödem - zusammen, kommt es zum unkontrollierten Übertritt osmotisch aktiver Substanzen aus dem Blutplasma in das Hirnparenchym. Es folgt der osmotisch bedingte Einstrom von Wasser und die daraus resultierende Volumenzunahme des Gehirns durch Vergrößerung des Extrazellularraums (Baethmann et al., 1997).

Anders beim sogenannten zytotoxischen Hirnödem. Hier bleibt die Blut-Hirn-Schranke intakt, die Schwellung findet hier auf zellulärer Ebene statt. Ursächlich hierfür ist -vereinfacht ausgedrückt- die eingeschränkte Leistung von Membrantransportern aufgrund des Ischämiebedingten Energiemangels. Durch unzureichende Bereitstellung energiereicher Phosphatverbindungen können regulatorische Aufgaben der Membrantransporter nicht adäquat ausgeführt werden. Es kommt zur Akkumulation von Mediatoren des zytotoxischen Ödems und zum intrazellulären Anstieg osmotisch aktiver Solute. Dem folgt der intrazelluläre Wassereinstrom mit dem Resultat der zytotoxischen Zellschwellung (Baethmann A & Kempski O, 1997; Siesjö BK 1981).

Nicht alle Zellen des Gehirns sind gleichermaßen vom zytotoxischen Ödem betroffen. Besonders ausgeprägt ist diese Ödemform bei Astrozyten und Oligodendrozyten (Hossmann KA, 1968). Das zytotoxische Ödem findet sich eher in ischämischen Hirnregionen, das vasogene Ödem oder Mischformen eher beim Schädel-Hirn-Trauma.



**Abb. 2: Mikroskopische Hirnschnitte.**

**A:** Maus, Zerebellum. Normale Gewebestruktur (Baethmann et al., 1973)

**B:** Vasogenes Hirnöde. Massive extrazelluläre Flüssigkeitsakkumulation, mit ‚E‘ markiert. Die zellulären Elemente werden komprimiert. (Hirano et al., 1969)

**C:** Zytotoxisches Hirnödem. Die mit einem ‚A‘ markierten Astrozyten sind in besonderem Maße von der Zellschwellung betroffen, der Extrazellularraum ist fast völlig aufgebraucht. (Baethmann et al., 1973)

#### 1.4 Therapeutische und experimentelle Ansätze bei der Anwendung von Hypothermie beim Hirnödem

Erste schriftliche Berichte über therapeutische Anwendung von Hypothermie in der Medizin stammen aus der Zeit von Napoleons Feldzug gegen Rußland. Ein französischer Militärarzt, Baron de Larrey führte schmerzlose Amputationen an in Eis gepackten Extremitäten aus. Im Jahre 1943 wurde von der ersten therapeutischen Anwendung von Hypothermie beim intrakraniellen Hirnödem nach einem Schädel-Hirn-Trauma durch den Neurochirurgen Temple Fay in Philadelphia berichtet (Fay T, 1943). In den 50er und 60er Jahren herrschte breites wissenschaftliches Interesse an Hypothermie. Zwischen 1958 und 1974 wurde an 121 Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma Hypothermie angewendet (Clifton GL, 1995). Dabei lagen die Temperaturen zwischen 28-34°C, die Dauer der Anwendung betrug zwischen zwei und zehn Tagen (Lazorthes G & Campan L, 1964; Drake CG, Jory TA, 1962; Hendrick EB, 1959). Allerdings unterschieden sich die Publikationen meist in mehreren Punkten wie dem Patientenkollektiv, Art und Schwere der Verletzung und Tiefe und Dauer der angewendeten Hypothermie. Ohne Kontrollgruppen fehlte die objektive Vergleichbarkeit, Schlussfolgerungen bezüglich der Effektivität konnten nicht gezogen werden (Clifton GL, 1995).

Den ersten experimentellen Ansatz zur Anwendung von Hypothermie lieferte Rosomoff 1956. Er konnte zeigen, daß Versuchstiere in tiefer bis moderater Hypothermie (25°C) nach Verschuß eines Hirngefäßes (ACM = Arteria cerebri media) ein verringertes sekundäres Nekrosewachstum hatten und daß deren Überlebenszeit signifikant verlängert war (Rosomoff HL, 1956).

Anfang der 60er Jahre beobachteten Brendel, Reulen, Meßmer und Mandler bei Experimenten in tiefer Hypothermie (<15°C) eine deutliche Volumenzunahme des Gehirns und prägten damals den Begriff der „Kälteschwellung“ des Gehirns. Neben der Zunahme an Volumen konnten sie im geschwollenen Hirnparenchym eine deutliche Konzentrationzunahme von Natriumionen nachweisen (Mandler N, 1968; Meßmer et al., 1966; Brendel et al., 1966). Jedoch wurden die Bemühungen, die Veränderungen auf zellulärer Ebene zu klären, durch den damaligen Stand der technischen Möglichkeiten limitiert. Die Methodik der Zellkultur und Volumenmessung von einzelnen Zellen wurde erst in den nachfolgenden Jahren etabliert.

Einen einstweiligen Schlußpunkt unter die Hypothermieforschung setzten die Ergebnisse von Michenfelder et al., die bei Experimenten mit Primaten und Katzen mit zerebraler Ischämie und 48 Stunden Hypothermie (29°C) feststellten, dass alle Versuchstiere der Hypothermiegruppe ein massives Hirnödem entwickelten und direkt nach der Ischämie verstarben (Michenfelder et al., 1977).

Ende der 70er Jahre verebbte das Interesse an der Hypothermie als Standardtherapie beim Hirnödem allmählich. Zum einen wurde in der Zwischenzeit zunehmend an der Entwicklung des Barbiturat-Komas gearbeitet, zum anderen stellten die zahlreichen und zum Teil schweren Nebenwirkungen, die bei der systemischen Anwendung von Hypothermie auftraten, ein ungelöstes Problem dar (Michenfelder et al., 1970). Mit zunehmender Tiefe der Temperatur traten Pneumonien, Thrombozytopenien, Neuropathien und Pankreatitiden auf (Sands et al., 1979; Fay T, 1943). Herzrhythmusstörungen und die Verringerung des Herzauswurfvolumens (z.B. auf 55% des Normalwertes bei 30°C) führten zu zirkulatorischen Problemen (Blair E 1964, Mouritzen CV & Andersen MN 1966). Nur geringe oder keine Komplikationen wurden im Temperaturbereich von 30-33°C beobachtet, so daß dieser Temperaturbereich als ‚sichere Zone‘ akzeptiert wurde (Bailey et al., 1954, Lewis et al., 1954).

Erst Anfang der 90er Jahre zeigten experimentelle Arbeiten von Busto und Ginsberg, Carroll, Beek und Wieloch, daß bereits milde Hypothermie (34-36°C) neuroprotektive Effekte aufweist (Busto et al., 1989, Carroll M & Beek O, 1992, Coimbra C & Wieloch T, 1994). Sie kamen in ihren Arbeiten zu dem Schluß, daß Dauer, Tiefe und Applikationszeitpunkt von

Hypothermie entscheidende Faktoren für den therapeutischen Effekt seien. Zahlreiche experimentelle Arbeiten der letzten Jahre bestätigten die neuroprotektiven Effekte der milden Hypothermie (36-34°C), die keine Nebenwirkungen verursachten (Bell et al., 1998; Maier et al., 1998; Corbett D & Thornhill J, 2000).

Insbesondere sind hier die klinischen Arbeiten von Metz und Marion zu erwähnen (Metz et al., 1996, Marion et al., 1997). Diese haben bei Schädelhirntrauma-Patienten unter anderem den Verlauf des intrakraniellen Druckanstiegs untersucht und konnten eine Reduktion des Druckanstiegs in der Hypothermiegruppe um jeweils 41% und 22% (33-35°C) verzeichnen. Auch wiesen die mit milder Hypothermie behandelten Patienten 12 Monaten nach dem Trauma weniger neurologische Defizite auf (Marion et al., 1997, Jiang et al., 2000). Zudem waren die gefürchteten Nebeneffekte tiefer Hypothermie nicht zu verzeichnen (Marion et al., 1997, Metz et al., 1997).

Die Divergenz zwischen der Neuroprotektion bei klinischen Arbeiten von Metz und Marion und den fulminanten Ergebnissen von Michenfelder weisen auf einen Schwachpunkt der bis dato betriebenen Forschung hin. Die Versuchsansätze unterscheiden sich meist in mehreren Punkten. Unterschiede in Temperaturtiefe, Dauer und Zeitpunkt der Kühlung sowie die Beurteilung von Lang- oder Kurzeiteffekten machen eine objektive Einschätzung sehr schwierig. Ebenso fehlen fundierte Erkenntnisse zu den Vorgängen auf zellulärer Ebene, die zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Ergebnisse beitragen könnten. Aus diesem Dilemma hat sich die Fragestellung für diese Arbeit herauskristallisiert, Untersuchungen *in vitro* durchzuführen um so zur Klärung pathophysiologischer Mechanismen auf zellulärem Niveau beizutragen.

## **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

In den letzten Jahren wurden viele Mechanismen des Sekundären Hirnschadens entschlüsselt. Zugleich haben sich zahlreiche Studien mit den neuroprotektiven Effekten milder und moderater Hypothermie nach zerebraler Ischämie oder Schädel-Hirn-Trauma beschäftigt. Letzteres erfolgte in erster Linie *in vivo*. Erstaunlicherweise liegen bis dato keine Erkenntnisse zum Effekt milder Hypothermie auf Gliazellen vor - weder unter physiologischen noch unter pathophysiologischen Bedingungen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war somit die Wirkung von Hypothermie auf Astrozyten zu untersuchen, den Zellen, die hauptsächlich vom zytotoxischen Ödem betroffen sind. Dabei sollten insbesondere der Bereich milder und moderater Hypothermie untersucht

---

werden. Zum einen wurden diese Temperaturen im ischämischen Fokus einer Primärläsion gemessen (Busto et al., 1987, Minamisawa et al., 1990), zum anderen wären sie aufgrund der geringen Nebenwirkungsrate für einen klinischen Einsatz relevant.

Somit ergeben sich für die vorliegenden Untersuchungen folgende Fragestellungen:

- I. Hat bereits milde und moderate Hypothermie Einfluß auf die Volumenregulation von Gliazellen?
- II. Welche Mechanismen liegen diesen Hypothermie-Effekten auf zellulärer Ebene zugrunde?
- III. Welchen therapeutischen Einfluß hat Hypothermie auf die zytotoxische Schwellung von Gliazellen?

Dazu wurde ein *in vitro*-Modell suspendierter Gliazellen gewählt, um einzelne Mechanismen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen gezielt untersuchen zu können. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen das Verständnis des Hirnödems auf zellulärer Ebene vertiefen und so zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen.

## **2. MATERIALIEN UND METHODEN**

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in der Zeit Januar 1997 bis Juni 1998 an suspendierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Zelltypen ausgewählt: C6 Gliomzellen, primär kultivierte Astrozyten der Ratte und primär isolierte, humane Granulozyten.

### **2.1 Versuchszellen**

#### **2.1.1 C6 Gliomzellen**

Die C6 Gliomzellen sind eine etablierte Modellzelllinie für Astrozyten. Sie entstammen einem mittels N-Nitrosomethylharnstoff induzierten Gliom der Ratte und wurden von Benda als Modellzelllinie etabliert (Benda et al., 1968). Eine Population dieser Gliomzellen wurde von American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, Probe F-12612) bezogen. Die erhaltenen Zellen wurden über mehrere Generationen kultiviert und nach 50-70 Passagen steril bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in DMSO-haltigem Medium eingefroren.

Für die Experimente wurden nur die Passagen 70-90 verwendet. Diese Bedingung ist von besonderer Bedeutung, da C6 Gliomzellen von niedrigem Passagealter eine hohe Aktivität der zyklischen Nukleotidphosphorylase (CNP) aufweisen, was dem Enzymmuster von Oligodendrozyten entspricht (Parker KK, Norenberg MD 1980). Mit zunehmenden Passagealter nimmt die Expression der CNP ab, gleichzeitig erhöht sich die Aktivität eines anderen Markerenzym, der Glutamin-Synthetase, was einer Transdifferenzierung zu einem astrozytärem Zelltyp entspricht.

##### **2.1.1.1 Zellkultivierung**

Die C6 Gliomzellen wurden als Monolayer in Kunststoff-Petrischalen (Falcon, Plymouth, UK) kultiviert. Dazu wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM, Seromed, Biochrom KG, Berlin) verwendet. Das DMEM besteht aus einer physiologischen Zusammensetzung von Vitaminen, Aminosäuren, anorganischen Salzen und Glukose. Zusätzlich wurde es noch mit dem pH-Indikator Phenolrot versetzt und mittels NaOH auf den physiologischen pH von 7,4 eingestellt (detaillierte Zusammensetzung s. Tab 1). Eine

bakterielle Kontamination wurde in diesem Medium durch die Zugabe von 100 IU/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) vermieden. Für die Subkultivierung wurde dem Medium zusätzlich 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Boehringer, Mannheim) zugesetzt.

Die Osmolarität des Mediums wurde mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) geprüft und - bei Bedarf durch die Zugabe des entsprechenden Salzes (NaCl, Na<sup>+</sup>-Gluconat, Cholin-Cl<sup>-</sup>) - auf 300 mosmol/l eingestellt. Die mit Zellen beladenen Petrischalen wurden in einem Brutschrank (Heraeus, B 5060) bei 37°C Wasserdampf gesättigter Luft und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine 90%ige Konfluenz der Monolayer wurde nach 24 Stunden erreicht.

<b>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)</b>					
		mg/l			mg/l
<b>Salze</b>	CaCl <sub>2</sub> (hyd)	264	<b>Aminosäuren</b>	Isoleucin	105
	Fe(NO <sub>3</sub> )	0,1		Leucin	105
	KCl	400		Lysin	146
	MgSO <sub>4</sub> (hyd)	200		Methionin	30
	NaCl	6400		Phenylalanin	66
	NaHCO <sub>3</sub>	3700		Serin	42
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	141		Threonin	95
<b>Varia</b>	Glucose	1000/4500	Tryptophan	16	
	Hepes	(5958)	Tyrosin	72	
	Phenolrot	15	Valin	94	
	Na-Pyruvat	110	<b>Vitamine</b>	Pathothenat	4
<b>Aminosäuren</b>	Arginin	84		Cholinchlorid	4
	Cystin	48		Folsäure	4
	Glutamin	580		Inositol	7,2
	Glycin	30		Nicotinamid	4
	Histidin	42		Pyridoxin	4
				Riboflavin	0,4
			Thiamin	4	

**Tab. 1: Zusammensetzung DMEM**



### 2.1.1.2 Subkultivierung

Nach konfluentem Wachstum der Zellen wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) gespült und mit 1 ml Trypsinlösung pro Schale (0,05% Trypsin/0,02% Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Sigma, München) für 1 Minute überschichtet. Nach dem Entfernen der Trypsinlösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Schalenboden gelöst und anschließend zur Inaktivierung des Trypsins in FKS-angereichertem Medium suspendiert. Die Zellen wurden bei ~200g für 5 min abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $3,0 \times 10^6$  Zellen/Schale neu ausgesät und mit 7 ml Kulturmedium überschichtet. Die kurze Generationszeit der C6 Gliomzellen machte eine tägliche Subkultivierung erforderlich.

### 2.1.1.3 Zellgewinnung für den Versuch

Die Ernte von Zellen für einen Versuch setzte voraus, daß die Subkultivierung für einen Tag ausgesetzt worden war, um eine 100%ige Konfluenz der Monolayer zu gewährleisten. Nach Abpipettieren des Nährmediums wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und das Trypsin anschließend wie oben beschrieben neutralisiert. Danach wurden die Zellen zwei mal in FKS-freiem Medium gewaschen und im jeweiligen Versuchsmedium suspendiert. Diese Arbeitsschritte waren notwendig, da die hohe Proteinkonzentration des fötalen Kälberserums zur Blasenbildung des Suspensionsmediums und zur Schädigung des Membranoxygenators in der Inkubationskammer führen würde. Um Zellaggregate zu vermeiden wurde die Zellsuspension vor der Inkubation in der Kammer zweimal durch ein Nylon-Sieb (Porengröße 100 µm, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) filtriert. Für einen Versuch wurden  $3,0-5,0 \times 10^6$  Zellen/ml bei insgesamt 14 ml Versuchsmedium verwendet.

## 2.1.2 Primär kultivierte Astrozyten

### 2.1.2.1 Zellkultur

Die Primärkulturen von Astrozyten wurden nach einer modifizierten Methode von Frangakis und Kimmelberg angelegt (Frangakis, Kimmelberg 1984; Kempfski 1988). Dazu wurden die Gehirne von 2-3 Tage alten Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Kisslegg, Deutschland) verwendet. Nach CO<sub>2</sub>-Anaesthesie wurden die Tiere dekapitiert, die Haut desinfiziert und die Gehirne entnommen. Der Hirnstamm, Kleinhirn, Meningen und Gefäße wurden unter einem

Präparationsmikroskop entfernt. Die verbleibenden Hemisphären wurden zerkleinert und mit 3 mg/ml Dispase (Boehringer, Mannheim) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) inkubiert. Dadurch lösten sich die bestehenden interzellulären Verbindungen zu einer Suspension einzelner Zellen. Nach 10 min wurden die im Überstand suspendierten Zellen abpipettiert und durch ein steriles 100 µm Sieb filtriert. Die so gewonnenen Zellen wurden in DMEM mit 20% FKS aufbewahrt. Die Inkubation in Dispase und das Abpipettieren der Zellen im Überstand wurde drei- bis viermal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen, um die Dispase vollständig zu entfernen, gewaschen und in DMEM mit 20% FKS in Petrischalen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach zwei Tagen, anschließend erfolgte alle drei Tage die Überschichtung mit 10%igem FKS-Medium. Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur wurde der immunzytochemische Nachweis (Peroxidase-Antiperoxidase-Methode, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) eines spezifisch von Astrozyten exprimierten Intermediärfilamentes, dem GFAP (glial fibrillary acidic protein = gliales fibrilläres saures Protein), herangezogen (Eng et al., 1971).

#### 2.1.2.2 Subkultivierung

Die Subkultivierung der Astrozyten erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den C6 Gliomzellen beschrieben (s. S.16). Nach Spülen der Monolayer mit PBS wurden die Zellen für eine Minute trypsiniert, vom Schalenboden abgelöst und in Kulturmedium suspendiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $3,0 \times 10^6$  Zellen/Schale ausgesät und mit Kulturmedium überschichtet.

#### 2.1.2.3 Zellgewinnung

Um Zellzyklus-abhängige Schwankungen der Zellgröße möglichst gering zu halten, wurden die Primärkulturen 24 Stunden vor der Ernte für ein Experiment mit 0,5 mM dB-cAMP (N6-2'-0-Dibutyryladenosine 3'-5'-cyclic monophosphate; Sigma, München) überschichtet. dB-cAMP ist ein stabiles cAMP-Analogon, das die Zellproliferation hemmt und die Differenzierung der Zellen (Pettmann et al., 1980) fördert. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Ernte somit in der G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus, was der Ruhephase entspricht. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gespült, für 1-1,5 min mit 1 ml Trypsin überschichtet, vom Schalenboden gelöst und in Kulturmedium suspendiert. Nach zweimaligem Waschen in FKS-freiem Medium wurden die Zellen in Versuchsmedium

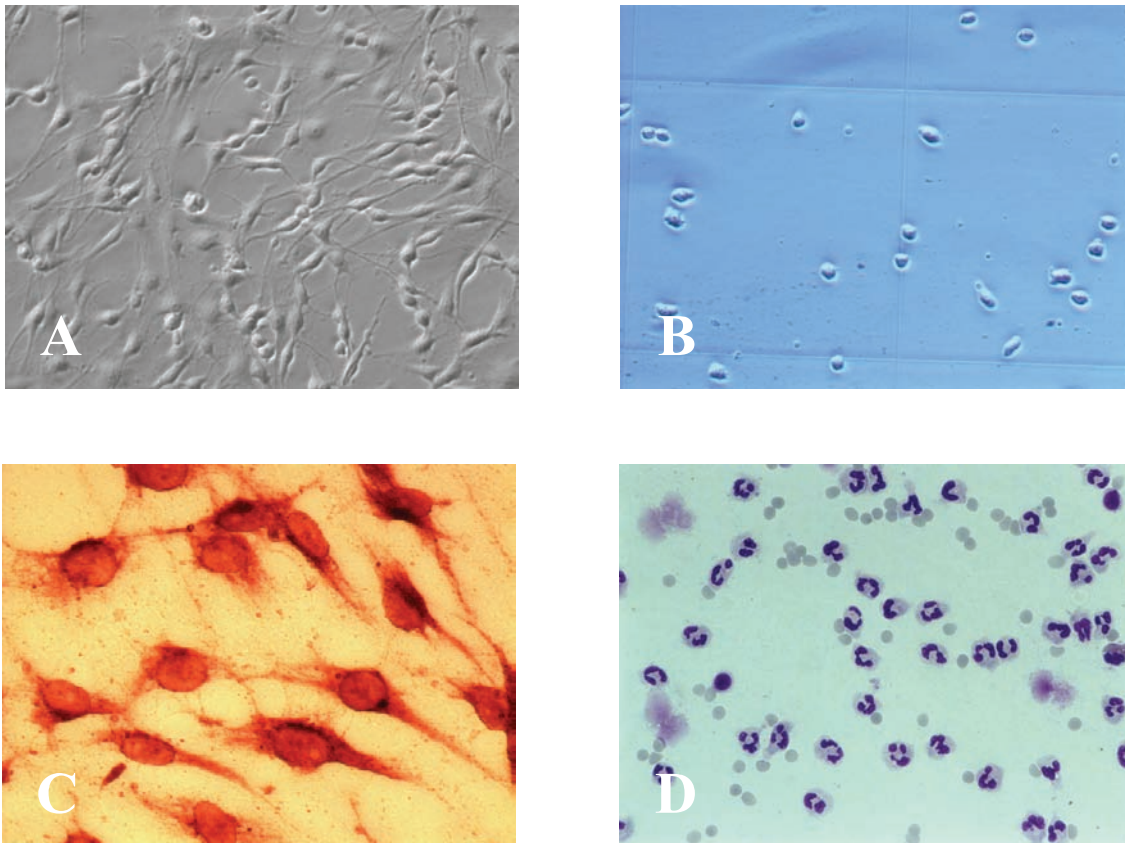
suspendiert und durch einem 100 µm Nylonsieb filtriert. Die Zelldichte der primär kultivierten Astrozyten betrug pro Versuch  $2-3,0 \times 10^6$  Zellen/ml.

### **2.1.3 Gewinnung von humanen Granulozyten**

Um zu prüfen, ob die Ergebnisse aus den Experimenten mit C6 Gliomzellen und primär kultivierten Astrozyten auch für nicht-neuronale Zellen zutreffen, wählten wir für weitere Untersuchungen humane Granulozyten.

Die Granulozyten wurden aus 10 ml heparinisiertem Vollblut von gesunden männlichen Spendern nach dem Verfahren der Dextran-Dichte-Separation gewonnen (Boyum A, 1968).

Je 5 ml Heparinblut wurden mit 2,5 ml einer 5%igen Dextranlösung vermischt (50,0 g Dextran, 9,0 g Natriumchlorid, Aqua dest. zu 1000 ml). Dies führte zu einer Koagulation und raschen Sedimentation der Erythrozyten. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden 5 ml des Dichtegradienten Ficoll (Ficoll-Metrizat-Lsg., Dichte 1,77, steril, Zusammensetzung: Ficoll 400 – 5,47 g, Metrizoat-Lsg. Nyegaard q.s., Aqua dest) mit dem Überstand des Heparinblutes überschichtet und 20 min bei 1300g zentrifugiert. Danach wurde der Zellüberstand verworfen, die granulozytäre Sedimentationsschicht abpipetiert und in PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen weitere 5 min bei 300g zentrifugiert. Das daraus entstandene Zellsediment aus Granulozyten wurde in 1 ml PBS suspendiert und die Zellzahl und –vitalität in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen in Versuchsmedium auf eine Zelldichte von  $4,0-6,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.



**Abb.3: Mikroskopische Abbildungen der verwendeten Versuchszellen**

A: *Differentielles Interferenzkontrastbild (DIC) von adhärennten C6 Gliomzellen (Objektiv 10x).*

B: *DIC-Bild von suspendierten C6 Gliomzellen in Trypanblau-Lösung auf einem Neubauer Hämocytometer. Im Gegensatz zu adhärennten Zellen ist die in Suspension runde Zellmorphologie auffällig. Alle Zellen im Gesichtsfeld können Trypanblau ausschließen und sind damit vital (Objektiv 10x).*

C: *GFAP-gefärbte C6 Gliom Zellen. GFAP sind als rotbraun gefärbte Filamente zu erkennen (Objektiv 40x).*

D: *Humane, neutrophile Granulozyten (Färbung nach May-Grünwald, Objektiv 40x).*

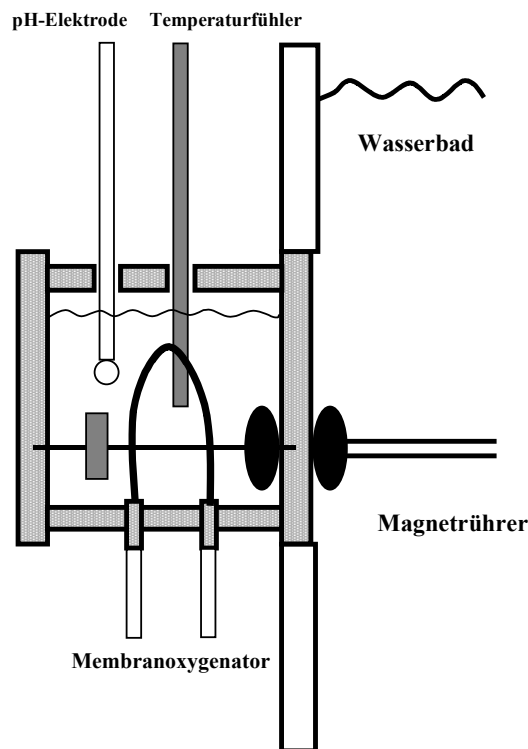
## 2.2 Suspensionskammer

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand als zentrale Meßgröße das Zellvolumen und dessen Veränderung durch die Umgebungstemperatur. Die für unsere Experimente verwendete Suspensionskammer weist alle erforderlichen Attribute auf: suspendierte Zellen können in ausreichender Anzahl über einen Zeitraum von mehreren Stunden unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden (Abb.4, Kempfski et al. 1982; Kempfski et al., 1983). Gleichzeitig können die Temperatur in der Suspensionskammer problemlos innerhalb weniger

Minuten variiert und auch andere Parameter zur Simulation pathologischer Bedingungen verändert werden.

Die aus Plexiglas gefertigte Inkubationskammer hat ein maximales Fassungsvermögen von 17 ml. Ein teflon-beschichteter Magnetrührer verhinderte die Sedimentation der Zellen. Über einen spiralförmigen, semipermeablen Silikonschlauch innerhalb der Kammer wurden die Zellen mit Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid versorgt. Durch das hierbei angewandte Prinzip der Membranoxygenierung wurde das Auftreten von Gasbläschen in der Zellsuspension verhindert. Die Temperatur- und pH-Kontrolle der Suspension erfolgte mit einem Thermometer und einer pH-Elektrode, die über Öffnungen am oberen Rand der Kammer eingebracht wurden. Eine weitere Öffnung diente der Entnahme von Meßproben und der Zugabe von Pharmaka. Der partielle Sauerstoff- und Kohlendioxiddruck ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ) wurde alle 15 min bestimmt und bei Bedarf korrigiert. Für den  $pO_2$  wurde ein Zielwert von  $>100$  mm Hg, für den pH ein Maximalwert von 7,4 angestrebt.

Die Temperaturregulation der Zellsuspension wurde durch die Koppelung der Inkubationskammer an ein Wasserbad erreicht, das über ein thermostat-gesteuertes Heizelement temperiert wurde. Die Wärmeübertragung erfolgte über eine Wärmeaustauschplatte, die die Rückwand der Kammer bildete. Die Temperatur des Wasserbads konnte durch den Thermostat auf ein Zehntel Grad genau eingestellt werden. Eine Abkühlung des Wasserbads auf die gewünschte Temperatur (z.B.  $32^\circ\text{C}$ ) wurde durch die Zugabe der jeweils erforderlichen Menge Eis ins Wasserbad und die Umstellung des Thermostaten auf die niedrige Temperatur erreicht. Auf diese Weise konnte die Zieltemperatur in weniger als fünf Minuten erreicht werden.



*Abb. 4: Schematischer Aufbau der Suspensionskammer (Staub et al. 1994).*

### 2.3 Kontrolle der Suspensionsparameter: Temperatur- und pH-Messung

Temperatur und pH der Suspensionslösung (= extrazellulärer pH ( $\text{pH}_e$ )) wurden mit einer pH-Elektrode (Inlab 420, Mettler Toledo, Gießen) und einem Temperaturmeßfühler, die beide an ein pH-Meter mit Temperaturanzeige (Delta 350, Mettler Toledo, Gießen) angeschlossen waren, kontinuierlich gemessen. Die pH-Elektrode wurde vor jedem Experiment kalibriert und zusammen mit dem Temperaturmeßfühler direkt in die Kammer eingebracht (s. Abb. 4).

### 2.4 Messung des partiellen $\text{O}_2$ , $\text{CO}_2$ und der $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Suspensionsmedium

Die Bestimmung von Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), Kohlendioxid- und Sauerstoff-Partialdruck ( $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$ ) im Suspensionsmedium erfolgte alle 15 Minuten mit einem Blutgas-Analysator (ABL 300, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Zur Messung wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension benötigt.

## **2.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität**

Für die Auszählung und Vitalitätsbestimmung der Zellen wurde ein Neubauer Hämozytometer verwendet. Die Zellzählung wurde an zwei verschiedenen Proben vorgenommen. Dazu wurden jeweils 2 x 16 Felder mit einem inversen Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) ausgezählt und daraus die Zellzahl errechnet. Ähnlich wurde bei der Vitalitätsbestimmung nach der Trypanblauausschluß-Methode verfahren (Paul J, 1975). Der Farbstoff Trypanblau kann bei geschädigter Zellmembran in das Zytoplasma gelangen. Diese Zellen erscheinen blau angefärbt unter dem Mikroskop. Bei gesunden Zellen ist die Zellwand intakt, der Farbstoff hat keinen Kontakt zum Zytoplasma, es erfolgt keine Blaufärbung der Zelle. 100 µl Zellsuspension und die selbe Menge an Trypanblau (0,4%ige Lösung, Sigma, Deisenhofen) wurden nach drei minütiger Inkubationszeit im Neubauer Hämozytometer ausgezählt. Dabei wurden gefärbte und ungefärbte Zellen ausgezählt, der prozentuale Anteil der ungefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl entspricht der Vitalität in Prozent. Präparationen, die eine Zellvitalität unter 95% bei C6 Gliomzellen und Granulozyten oder unter 85% bei primär kultivierten Astrozyten aufwiesen, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

## **2.6 Messung der Osmolarität des Suspensionsmediums**

Die physiologische Osmolarität von Blut liegt bei 300 mosmol. Um diese Osmolarität auch während der Versuche zu gewährleisten, wurden alle verwendeten Medien auf diesen Wert eingestellt. Dabei wurde bei dem verwendeten Gerät (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) nach der Methode der Gefrierpunktserniedrigung verfahren. Vor jeder Messung wurde eine Eichung mit destilliertem Wasser und einer Standardlösung von 300 mosmol vorgenommen.

## **2.7 Durchflußzytometrische Volumenmessung**

Das Zellvolumen wurde in kurzen Abständen durchflußzytometrisch nach dem 1953 von W.H. Coulter entwickelten Prinzip bestimmt. Dieses Meßverfahren findet breite Anwendung bei der Zählung von Leukozyten und Erythrozyten im klinischen Routinelabor. Die Meßvorrichtung besteht aus zwei Flüssigkeits-kompartimenten, die durch ein Meßloch miteinander verbunden sind. Der Durchmesser des Meßlochs kann der Größe der untersuchten Zellpopulation angepasst werden. Er betrug bei den Experimenten mit C6 Gliomzellen und den primär kultivierten Astrozyten 100 µm, bei den neutrophilen

Granulozyten 80  $\mu\text{m}$ . Der eigentliche Meßvorgang beginnt mit dem Einbringen eines Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in ein Kompartiment. Über ein Vakuum werden die Zellen durch die Coulterapertur gesaugt. Eine Stromquelle erzeugt einen Gleichstrom  $I$  zwischen den beiden Kompartimenten, der durch die Meßöffnung fließt und konstant bei 45  $\mu\text{A}$  gehalten wird. Tritt eine Zelle durch die Meßöffnung, so erhöht sich dort der elektrische Widerstand um  $\Delta R$ , da Zellen keinerlei elektrische Leitfähigkeit besitzen. Es kommt somit zu einer Spannungsänderung, die nach der Maxwell'schen Gleichung dem Zellvolumen direkt proportional ist. Das Zellvolumen kann durch eine Modifikation (Grover, Naaman, et al. 1969) dieser Gleichung aus den so gewonnenen Meßdaten auch quantitativ erfaßt werden. Dazu werden verschiedene Größen wie die Aperturkonstante, der spezifische Widerstand des Mediums und geometrische Formfaktoren der Zelle in die Berechnung einbezogen (s. Formel 1).

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

- $V$  : Zellvolumen  
 $q$  : Querschnitt der Meßapertur  
 $f_k$  : Korrekturfaktor für die Meßlochgeometrie (Verhältnis Länge/Querschnitt)  
 $I$  : elektrischer Strom durch das Meßloch  
 $F$  : Form- und Widerstandsfaktor der Zellen (Verhältnis Länge/Durchmesser)  
 $\rho$  : Spezifischer Widerstand des Hüllmediums  
 $\Delta U$ : Amplitude des gemessenen Spannungsimpulses

**Formel 1: Formel zur Berechnung des Zellvolumens**

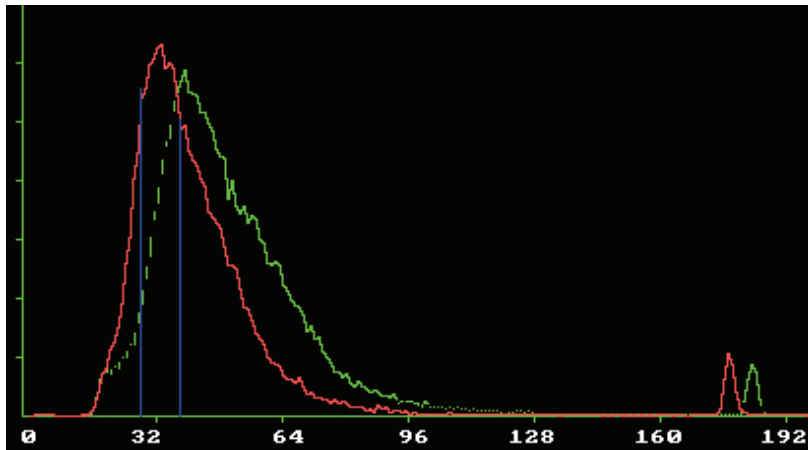
*Nach Modifikation der Maxwell'schen Gleichung durch Grover (1969) kann aus den gemessenen Coulter-Meßsignalen das Zellvolumen errechnet werden.*



Im Vergleich zu konventionellen Coultergeräten verfügt das von uns genutzte Metrizell über eine von Priv. Doz. Dr. V. Kachel (Kachel 1976) entwickelte Verbesserung, die "hydrodynamische Fokussierung" des Partikelstroms durch die Mitte der Meßapertur. Diese Technik ermöglicht es, die Zellen in die Zentralachse der Coulterapertur durch Umhüllung mit partikelfreiem Medium zu fokussieren und die Flußgeschwindigkeit auf einen konstanten Wert einzustellen. Außeraxiale Partikelströme werden somit vermieden. Dadurch wird die Erfassung von Zellvolumenänderung mit hoher Genauigkeit ermöglicht. Die Eichung des Meßgeräts erfolgt elektronisch durch einen internen Spannungsimpuls oder mit Hilfe von Latexpartikeln definierter Größe, mit Durchmessern von 5, 10 und 15  $\mu\text{m}$  (Dynospheres, monosized polymerparticles, Paesel GmbH & Co, Frankfurt).

Die Spannungsimpulse einer Messung werden digitalisiert und mit einem IBM-kompatiblen Computer aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der Daten und Speicherung als List-Files erfolgt mit einem speziell dafür von Priv. Doz. Dr. V. Kachel entwickelten Computerprogramm. Im Anschluß an eine Messung können diese Daten in einem Parameter-Histogramm dargestellt und analysiert werden. Pro Einzelmessung werden auf diese Weise 20-40 x 10<sup>4</sup> Zellen in einem Volumenhistogramm dargestellt.

Histogramme stellen eine Häufigkeitsverteilung dar. Dabei wird das Zellvolumen der Größe entsprechend in 256 Meßkanälen auf der Abszisse, die Zellzahl nach Häufigkeit auf der Ordinate aufgetragen (Abb. 5). Für die Auswertung des Volumens wurde der Mittelwert der zehn Kanäle um das Maximum der Häufigkeitsverteilung gewählt. Die Methode der Auswertung ergibt sich aus der Tatsache, dass der arithmetische Mittelwert des gesamten Histogramms auch die Meßwerte von Zellaggregaten aus zwei oder mehr Zellen umfasst und somit nicht die Volumenänderung der einzelnen Zelle wiedergeben würde (Abb. 5). Das Volumen primär kultivierter Astrozyten weist eine breitere Verteilung als das der C6 Gliomzellen auf, weshalb für die Volumenberechnung 15 Kanäle herangezogen wurden. Die Flußgeschwindigkeit betrug in allen Versuchen 1000 – 1500 Zellen/Sekunde.



**Abb. 5: Volumendistogramm von C6 Gliomzellen**

Das Zellvolumen wird der Größe entsprechend in 256 Meßkanälen auf der Abszisse, die Zellzahl nach Häufigkeit auf der Ordinate aufgetragen. Für die Auswertung des Volumens wurde der Mittelwert um das Maximum der Häufigkeitsverteilung gewählt.

## 2.8 Versuchsgruppen

### 2.8.1 Kontrollversuche

Um die Stabilität des Zellvolumens in dem oben beschriebenen Versuchsmodell zu untersuchen, wurden die Zellen in der Suspensionskammer unter physiologischen Bedingungen bei konstant 37°C gehalten und das Zellvolumen alle 10 min bestimmt. Dieses Protokoll diente auch der Bestimmung des Kontrollvolumens aller anderen Untersuchungsgruppen.

### 2.8.2 Einfluß von Temperaturveränderungen auf das Zellvolumen

Der erste Teil der vorliegenden Untersuchung gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst wurde der Einfluß der Umgebungstemperatur auf das Volumen von C6 Gliomzellen untersucht. Dabei wurden die Temperatur der Zellsuspension auf 27°C, 29,5°C, 32°C, 34,5°C und 40°C eingestellt. Der Beobachtungszeitraum in Hypo- bzw. Hyperthermie betrug jeweils eine Stunde, anschließend wurde die Temperatur für 30 min auf den Ausgangswert von 37°C zurückgeregelt.

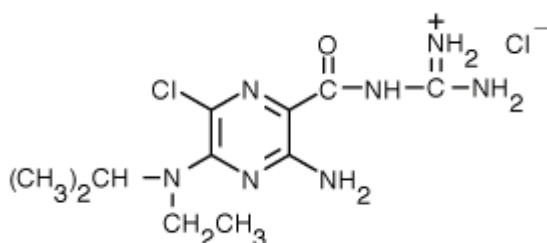
Derselbe Versuchsaufbau wurde für die Untersuchungen an primär kultivierten Astrozyten und an humanen Granulozyten verwendet. Bei diesen Experimenten wurde nur eine Hypothermie von 32°C untersucht.

### 2.8.3 Versuche zur Bedeutung von Ionen transportern während der Hypothermie-induzierten Gliaschwellung

Um die Bedeutung von Natrium- und Chlorid-Ionen bei der Hypothermie-induzierten Zellschwellung zu untersuchen, wurden Natrium- bzw. Chlorid-freie Suspensionsmedien verwendet. Bei der Herstellung dieser Medien wurden an Stelle von Natrium-Salzen entsprechend Cholin-Salze, und statt Chlorid-Salzen entsprechend Glukonat-Salze verwendet (s.Tab. 1 u.2).

Neben der Frage, welche Ionen an der Schwellung durch Hypothermie beteiligt sind, waren die daran beteiligten Transportprozesse von Interesse.

Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter ist ein Membranprotein, das im Wesentlichen die Regulation von Zellvolumen und intrazellulärem pH bei Veränderung des Umgebungsmilieus gewährleistet (Clark, Limbird 1991, Abrahamse et al 1994). Ob dieser Transporter an der Hypothermie-induzierten Zellschwellung beteiligt ist, wurde durch die Zugabe des selektiven  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter Inhibitors EIPA (**E**thyl-**I**so-**P**ropyl-**A**milorid, Abb.6) untersucht. Es wurde eine Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Diese Dosis führt zu einer vollständigen Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters (Abrahamse et al 1994).



**Abb. 6: Strukturformel EIPA**

Kultur- Medium		Versuchs- Medium		Na <sup>+</sup> -freies Medium		Cl <sup>-</sup> -freies Medium	
Salze	MW	Salze	MW	Salze	MW	Salze	MW
NaCl	58,44	NaCl	58,44	Cholin-Chlorid	140	Na <sup>+</sup> -Gluconat	218
KCl	74,55	KCl	74,55	KCl	74,55	K <sup>+</sup> -Glukonat	234
CaCl	147	CaCl	147	CaCl	147	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> Ca <sup>2+</sup> -Gluconat	215
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	NaHCO <sub>3</sub>	84,01	Cholin HCO <sub>3</sub>	165,2	NaHCO <sub>3</sub>	84,01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141	MgHPO <sub>4</sub>	141	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	110	Na <sup>+</sup> -Pyruvat	110	-	-	Na <sup>+</sup> -Pyruvat	110

*Tab.2: Zusammensetzung der verwendeten Medien (MW=Molekulargewicht)*

## 2.8.4 Versuche zum therapeutischen Effekt von Hypothermie

In den letzten Jahren wurden mehrere Mediatoren des zytotoxischen Hirnödems identifiziert und hinsichtlich ihrer Wirkungsweise untersucht. Diese Erkenntnisse lagen der Wahl und der Dosierung der in dieser Studie verwendeten Substanzen zu Grunde. Dabei wurden jeweils Konzentrationen eingesetzt, die zur Zellschwellung führen, ohne die Zellvitalität zu beeinträchtigen. Die Substanzen (s.u.) wurden jeweils zeitgleich mit Senkung der Temperatur auf 32°C zur Zellsuspension gegeben.

### 2.8.4.1 Inkubation in Milchsäureazidose

Milchsäure führt zum zytotoxischen Ödem bei Gliazellen, Astrozyten und Neuronen (Staub et al. 1996, Plesnila et al, 1999, Schneider et al, 1992). Bezüglich der zugrunde liegenden Mechanismen herrscht derzeit folgendes Konzept: extrazelluläre Protonen reagieren mit Bikarbonat zu Kohlendioxid, das als ungeladenes Gas im Gegensatz zu Protonen die Membran frei permeieren kann. Intrazellulär entsteht über das Enzym Karboanhydrase aus Kohlendioxid Kohlensäure, die spontan in Bikarbonat und Protonen dissoziiert. Die zunehmende intrazelluläre Konzentration von Protonen führt zum Absinken des intrazellulären pH. Dies wiederum aktiviert den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, der getrieben durch das Natrium-Konzentrationsgefälle Protonen aus der Zelle heraus transportiert. Dieser Natrium-Einstrom zieht den osmotischen Kräften folgend Wasser nach sich, das in die Zelle einströmt

und so zur Zellschwellung führt. Für die Versuche in Milchsäureazidose wurde die Zellsuspension mit isotoner Milchsäure (350 mM) auf pH 6,2 angesäuert.

#### 2.8.4.2 Inkubation mit Arachidonsäure

Arachidonsäure führt bei Astrozyten zur zytotoxischen Zellschwellung (Winkler et al. 2000, Staub et al. 1994). Arachidonsäure gelangt durch Diffusion in den Intrazellularraum, wo sie zur Hemmung der Atmungskette führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der anaeroben Glykolyse und konsekutiv zur intrazellulären Azidose.

Dies wiederum aktiviert Membrantransporter, z. B. den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (Staub et al., 1995; Plesnila et al., 1999), die der intrazellulären Azidose entgegenwirken. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Natrium-Ionen und nachfolgendes Wasser führt zur Zellschwellung.

Die Endkonzentration der Arachidonsäure in der Zellsuspension betrug 0,3 mM.

#### 2.8.4.3 Inkubation mit Glutamat

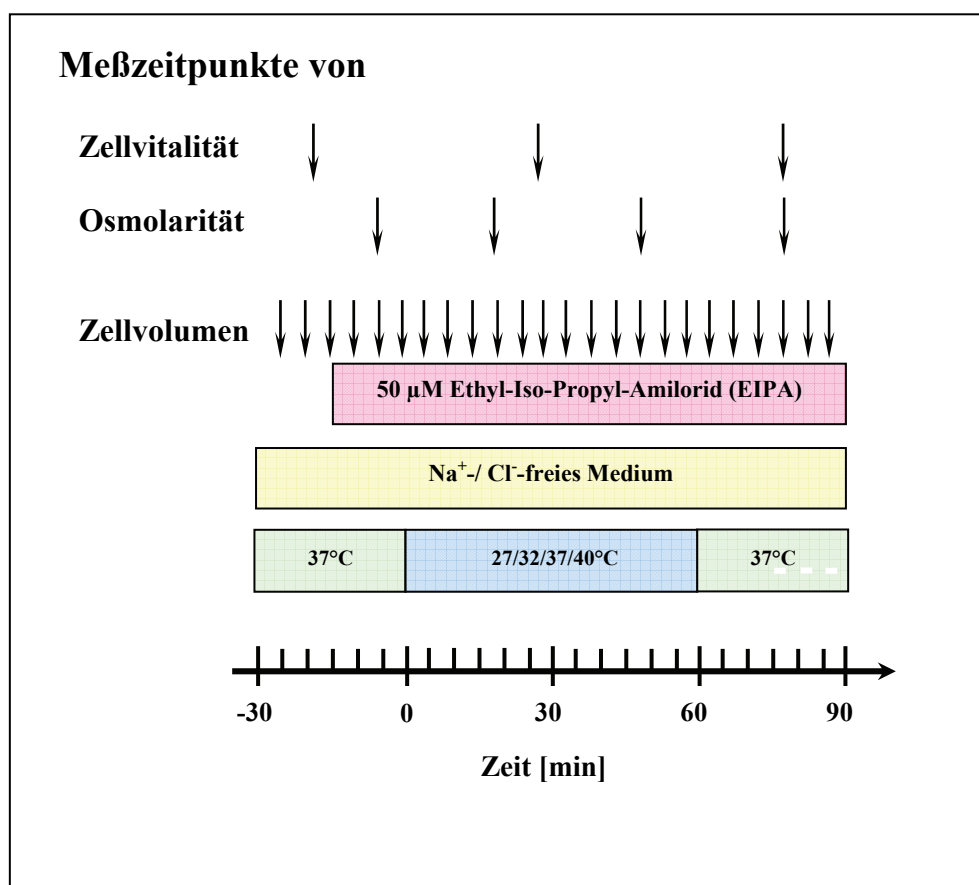
Der Vorgang der zellulären Schwellung durch Glutamat beruht auf der intrazellulären Aufnahme von Glutamat zusammen mit Natrium-Ionen aus dem Medium (Schneider et al, 1992). Dieser Mechanismus ist per se nicht als pathologisch zu werten, da die Clearance des Extrazellulärraums von Glutamat eine physiologisch-regulatorische Funktion der Astrozyten darstellt. Erst wenn die Zellen so viel Glutamat aufgenommen haben, daß sie das damit aufgenommene Natrium nicht mehr aus der Zelle eliminieren können, kommt es zur Zellschwellung. Die Glutamatkonzentration in der Inkubationskammer betrug 1mM.

## 2.9 Versuchsablauf

### 2.9.1 Versuche in Hypo- und Hyperthermie in physiologischem Medium

Eine schematische Darstellung der Versuchsprotokolle findet sich in den Abbildungen 7 und 8. Nach Zellernte bzw. Aufbereitung und Suspension in serumfreiem Versuchsmedium wurden die Zellen in der Suspensionskammer inkubiert. In einer 30-minütigen Kontrollphase wurde die Sauerstoffzufuhr auf einen resultierenden Sauerstoff-Partialdruck von über 100 mmHg reguliert, der pH-Wert mittels der  $\text{CO}_2$ -Zufuhr auf 7,4 eingestellt und die Temperatur

der Zellsuspension auf 37°C gehalten. Nach der Kontrollphase und dem Erfüllen aller Ausgangskriterien wurde für die Hypothermieversuche die Temperatur im Wasserbad durch die Zugabe von Eis und die Absenkung der Zieltemperatur am Thermostaten gesenkt. Die Menge an zugegebenen Eis hing von der Tiefe der Zieltemperatur ab. Auf diese Weise konnte die Temperatur der Zellsuspension in der Inkubationskammer innerhalb von 5 Minuten auf den gewünschten Wert gebracht werden. Für die Versuche in Hyperthermie (40°C) wurde die Wassertemperatur über den Thermostaten hochreguliert. Die von uns untersuchten Temperaturbereiche der Zellsuspension waren 27°C, 29,5°C; 32°C, 34,5°C und 40°C. Die jeweilige Temperatur wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten konstant gehalten und anschließend für 30 Minuten wieder auf 37°C normalisiert. Die Temperatur bei den Kontrollversuchen betrug über die gesamte Beobachtungszeit von 120 Minuten konstant 37°C.



*Abb. 7: Versuchsprotokoll zur Untersuchung von Hypo- und Hyperthermieeffekten bei Gliazellen sowie der Rolle von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen und des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters bei der Hypothermie-induzierten Gliaschwellung.*

### **2.9.2 Versuche zur Bedeutung osmotisch aktiver Ionen: Natrium, Chlorid**

Um zu klären, welche Rolle extrazelluläre Natrium und Chlorid-Ionen bei der Hypothermie-induzierten Zellschwellung der Gliazellen spielen, wurde der oben beschriebene Versuchsablauf in Natrium- und Chlorid-freiem Medium durchgeführt. Nach Zellernte wurden die Zellen in dem jeweiligen Versuchsmedium suspendiert und dreimal gewaschen, um restliche Natrium- bzw. Chlorid-Ionen zu entfernen. Im Weiteren folgt das Versuchsprotokoll dem in Abbildung 7 beschriebenen Ablauf.

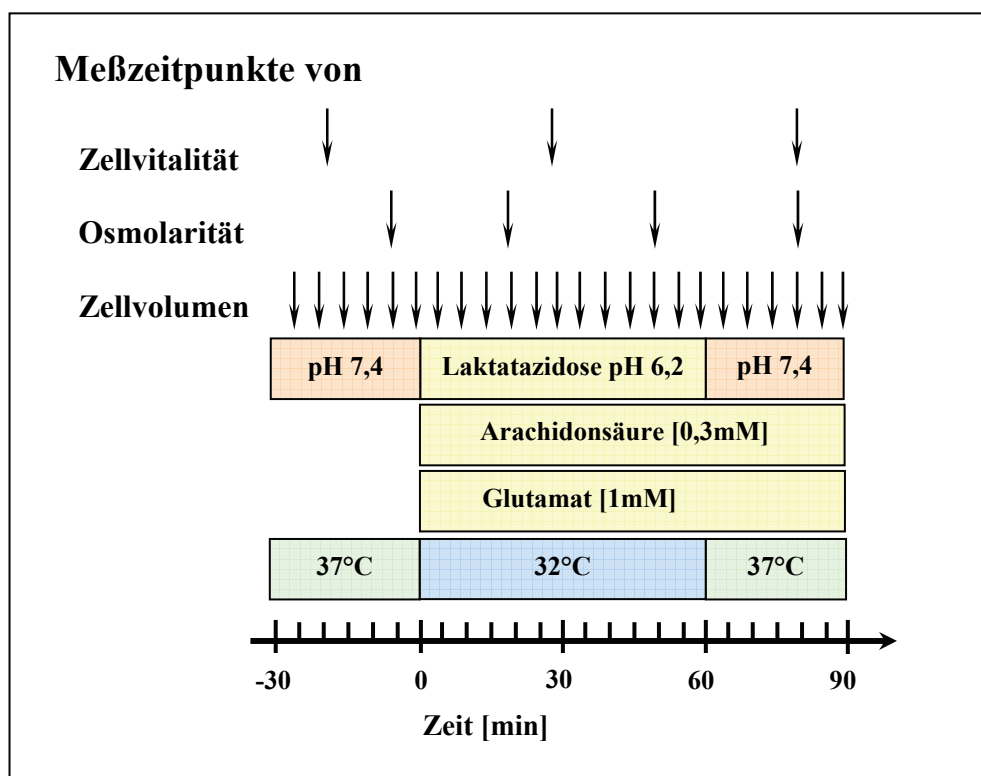
### **2.9.3 Versuche zur Bedeutung des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters**

Die Zellsuspension wurde 15 Minuten vor der Temperatursenkung mit EIPA inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit EIPA wurde die Zellsuspension in der oben beschriebenen Weise auf 32°C gekühlt, über 60 Minuten beobachtet und anschließend für weitere 30 Minuten auf 37° normalisiert (Abb.7).

### **2.9.4 Versuche nach Inkubation in Milchsäureazidose, Arachidonsäure und Glutamat**

Für die Untersuchung des Effekts von Hypothermie auf die zytotoxische Schwellung von Gliazellen wurde die Zellsuspension vor der Abkühlung mit Glutamat, Arachidon- und Milchsäure inkubiert.

Nach der bereits beschriebenen Kontrollphase wurden jeweils Milchsäure, Arachidonsäure oder Glutamat zur Zellsuspension gegeben und gleichzeitig die Temperatursenkung auf 32°C eingeleitet (Abb.8). Die Zieltemperatur wurde in 5 Minuten erreicht. Für die Versuche in Milchsäureazidose wurde der pH-Wert des Suspensionsmediums durch die Zugabe von Milchsäure auf 6,2 eingestellt, und für 60 Minuten konstant gehalten. Anschließend erfolgte eine Realkalisierung auf pH 7,4 für weitere 30 Minuten. Für die Experimente mit Arachidonsäure wurde eine Konzentration von 0,3 mM, für Glutamat 1mM gewählt (Winkler et al. 2000, Staub et al. 1994, Kempfski et al, 1992). Im Anschluß an die 60 minütige Hypothermiephase wurde das Zellvolumen in allen Versuchsgruppen für weitere 30 Minuten bei 37°C gemessen.



*Abb. 8: Versuchsprotokoll zum therapeutischen Effekt von Hypothermie auf die zytotoxische Zellschwellung*

## 2.10 Datenauswertung und Statistik

Nach Abschluß eines Versuchs wurden aus den Volumenrohdaten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft-Excel (Microsoft, Unterschleißheim) die Zellvolumina errechnet und mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Plot, Version 4.0 (Jandel Scientific, Erkrath), graphisch dargestellt. Die Anzahl der Experimente pro Versuchsgruppe ist im oberen Bereich der jeweiligen Abbildung aufgeführt. Die Werte in den Diagrammen sind als Mittelwert der Meßwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Statistische Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm SigmaStat Version 5.0 (Jandel Scientific, Erkrath) durchgeführt. Innerhalb einer Versuchsgruppe wurde die Signifikanz mit dem Friedman-Test (Repeated Measures ANOVA on Ranks) geprüft. Im Falle eines signifikanten Unterschieds wurde der Dunnett's post hoc Test durchgeführt. Für den Intergruppenvergleich wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet. Das geforderte Signifikanzniveau der untersuchten Daten lag bei  $p < 0,05$ . Korrelationsanalysen der Daten wurden mit dem Spearman Korrelationstest, Statistica 5.1 (Stat Soft, Tulsa, USA) durchgeführt.



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Kontrollversuche

Die ersten Versuche sollten einen möglichen Einfluß der Suspension auf das Zellvolumen und -vitalität im Versuchsmedium und während der Inkubation in der Zellkammer klären. Dazu wurden C6 Gliomzellen, primär kultivierte Astrozyten und isolierte humane Granulozyten in physiologischem Versuchsmedium suspendiert und das Zellvolumen über einen Zeitraum von 90 min - einem geplanten Hypothermieversuch entsprechend - beobachtet. Dabei wurden alle Suspensionsparameter wie Temperatur (37°C),  $pH_e$  (7,4) und  $pO_2$  (>100mmHg) auf physiologische Werte eingestellt und konstant gehalten.

Die Ergebnisse wurden in den folgenden Diagrammen einheitlich dargestellt. Das Zellvolumen wurde in Prozent des Ausgangswertes auf der Ordinate, der Beobachtungszeitraum auf der Abszisse aufgetragen. Ein einzelnes Symbol stellt jeweils den Mittelwert aus fünf Einzelerperimenten dar. Die Fehlerbalken drücken den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus. Offene Dreiecke repräsentieren die unter physiologischen Bedingungen durchgeführten Kontrollversuche.

##### 3.1.1 Einfluß der Umgebungstemperatur auf das Zellvolumen

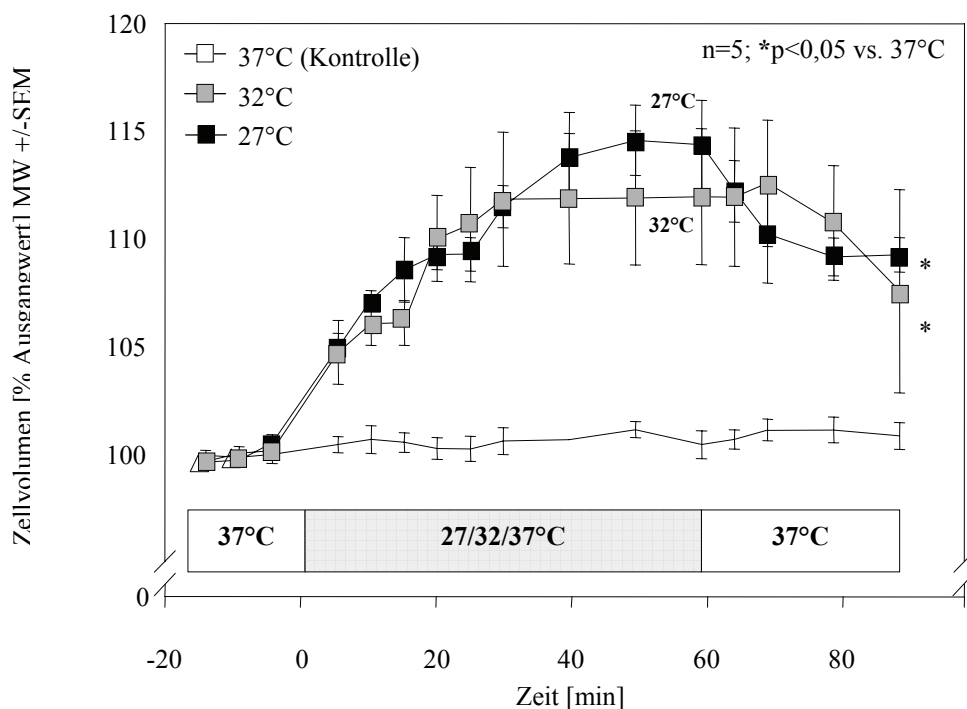
###### 3.1.1.1 C6 Gliomzellen in Hypo- und Hyperthermie

In dieser Versuchsgruppe wurde der Einfluß verschiedener Temperaturbereiche auf das Volumen von C6 Gliomzellen untersucht. Unter Kontrollbedingungen betrug das absolute Zellvolumen der C6 Glioma  $809 \pm 29 \mu m^3$ . Nach der vorausgehenden Kontrollphase wurde die Temperatur durch Zugabe von Eis in das Wasserbad gesenkt. Die Zieltemperatur für die ersten Experimente betrug 32°C. Bereits zum ersten Meßzeitpunkt, 5 Minuten nach Senkung der Temperatur, zeigt sich eine signifikante Zunahme des Zellvolumens auf  $104,4 \pm 0,5\%$  des Ausgangswertes (Abb. 9). Über einen Zeitraum von 20 Minuten kam es zu einer kontinuierlichen Volumenzunahme auf  $107,9 \pm 0,7\%$ . Im weiteren Verlauf kommt es zum Stop der Zellschwellung, das Volumen zeigt keine weitere signifikante Zunahme und erreicht insgesamt ein Maximum von  $108,7 \pm 0,4\%$  (Meßzeitpunkt 50 min). Im Anschluß erfolgte die Erholungsphase mit einer Temperaturnormalisierung auf 37°C. 20 Minuten nach Erwärmung zeigte sich ein geringfügiger Rückgang des Volumens, am Ende der Beobachtungsphase betrug das Zellvolumen  $107,2 \pm 0,4\%$  des Ausgangswertes.

Dasselbe Experiment bei 27°C durchgeführt zeigte ähnliche Resultate (Abb. 9). In dieser Versuchsreihe kam es ebenfalls zu einer schnellen Volumenzunahme auf  $104,8 \pm 0,5\%$  des Ausgangswertes innerhalb der ersten 5 Minuten nach Senkung der Temperatur. Dieser Trend setzte sich kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 Minuten bis zum Zellvolumen von  $111,0 \pm 0,7\%$  des Ausgangswertes fort. Danach kam es nur noch zu einer geringfügigen Volumenzunahme auf einen Maximalwert von  $113,1 \pm 1,3\%$ . In der Erholungsphase war auch hier eine Normalisierungstendenz zu verzeichnen. Nach 30 Minuten war das Zellvolumen auf  $108,3 \pm 0,8\%$  zurückgegangen. Weitere Experimente bei 34,5 und 29,5 °C (in der Graphik nicht dargestellt) zeigten dieselbe Kinetik mit unterschiedlicher quantitativer Ausprägung der Zellschwellung. Um zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen Volumenzunahme und Temperaturtiefe besteht, wurden die beiden Parameter einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse der Analyse ergaben einen Korrelationskoeffizienten  $r_s = -0.90$ , was bedeutet, daß ein signifikanter Zusammenhang zwischen Abnahme der Temperatur und der Zunahme des Zellvolumens besteht. In Abbildung 10 sind die Mittelwerte (gefüllte Kreise) der Volumenzunahme aus den jeweiligen Einzelversuchen (offene Kreise) gegen die Temperatur aufgetragen. Zellschwellung und Temperaturtiefe zeigen im Bereich von 37°C bis 32°C eine lineare Abhängigkeit. Unter 29,5°C zeichnet sich eine Sättigungstendenz ab.

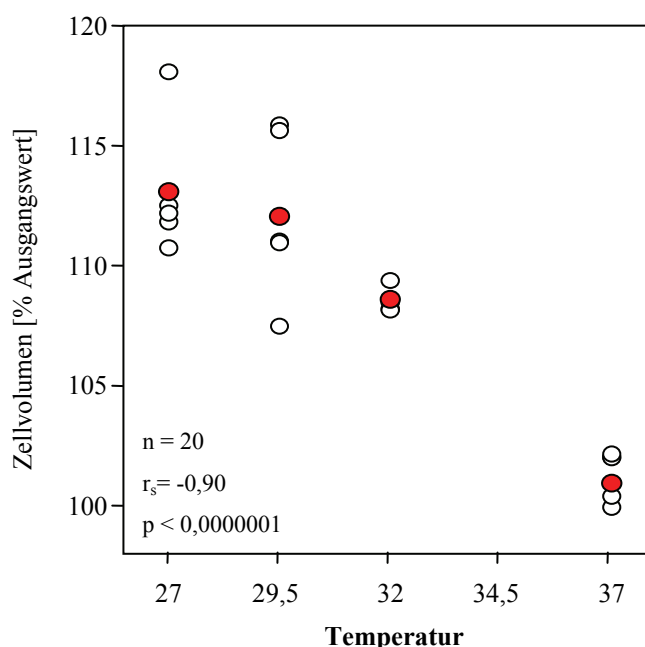
### 3.1.1.2 Einfluß von Hyperthermie auf das Zellvolumen von C6 Gliomzellen

Die C6 Gliomzellen zeigten in Hyperthermie 5 min nach Erreichen der Zieltemperatur eine Volumenzunahme auf  $102,9 \pm 1,2\%$  des Ausgangswertes (Abb. 11). Im weiteren Verlauf kam es zu einer kontinuierlichen Schwellung der Zellen, am Ende der Hyperthermiephase betrug das Zellvolumen  $109,1 \pm 1,6\%$ . In der anschließenden Erholungsphase kam es im Gegensatz zu den Versuchen in Hypothermie zu keinem Rückgang des Zellvolumens. Vielmehr setzte sich die Schwellung kontinuierlich fort und hatte am Ende des Beobachtungszeitraums ein Maximum von  $111,5 \pm 1,5\%$  des Ausgangswertes erreicht. Die Zellvitalität betrug zu Versuchsende 70%.



**Abb. 9: Zellvolumen von C6 Gliomzellen bei 27, 32 und 37°C**

Das Zellvolumen wurde im Durchflußzytometer gemessen und in die Volumenänderung in Prozent des Ausgangswertes angegeben. Keine Änderung des Zellvolumens bei 37°C (Kontrolle, dreieckige Symbole). Schnelle Volumenzunahme bei 27°C (gefüllte Symbole) und 32°C (graue Symbole). Partielle Volumenerholung nach Temperaturnormalisierung.



**Abb. 10: Korrelation Temperatur und Zellschwellung**

Die Mittelwerte (gefüllte Kreise) der Volumenzunahme aus den Einzelversuchen (offene Kreise) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Zwischen 29,5 und 37°C zeichnet sich eine lineare Volumenzunahme, im Temperaturbereich unter 29,5°C eine Sättigungstendenz ab.

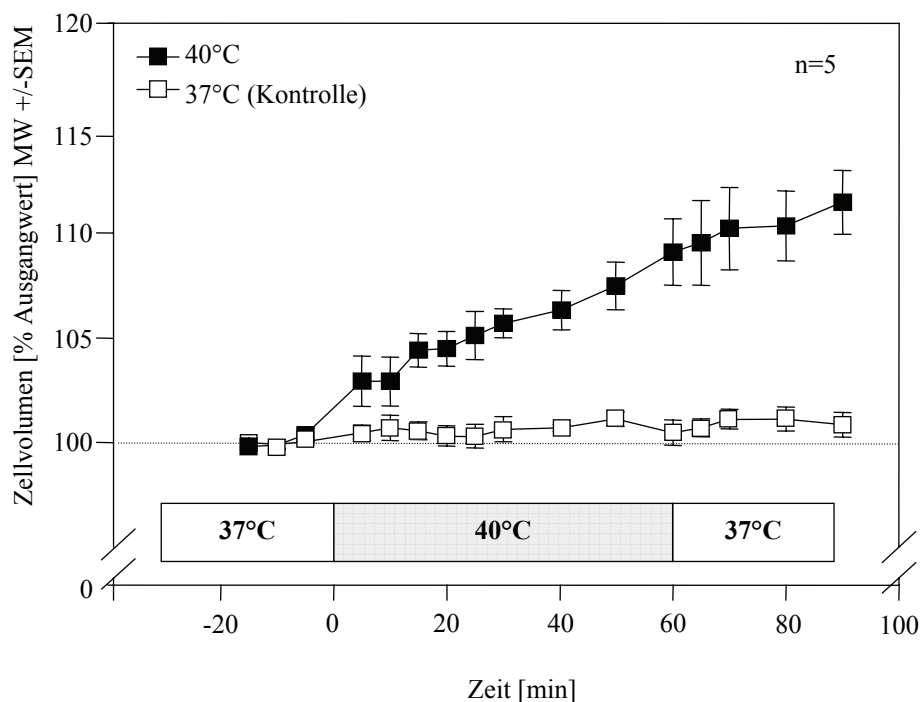


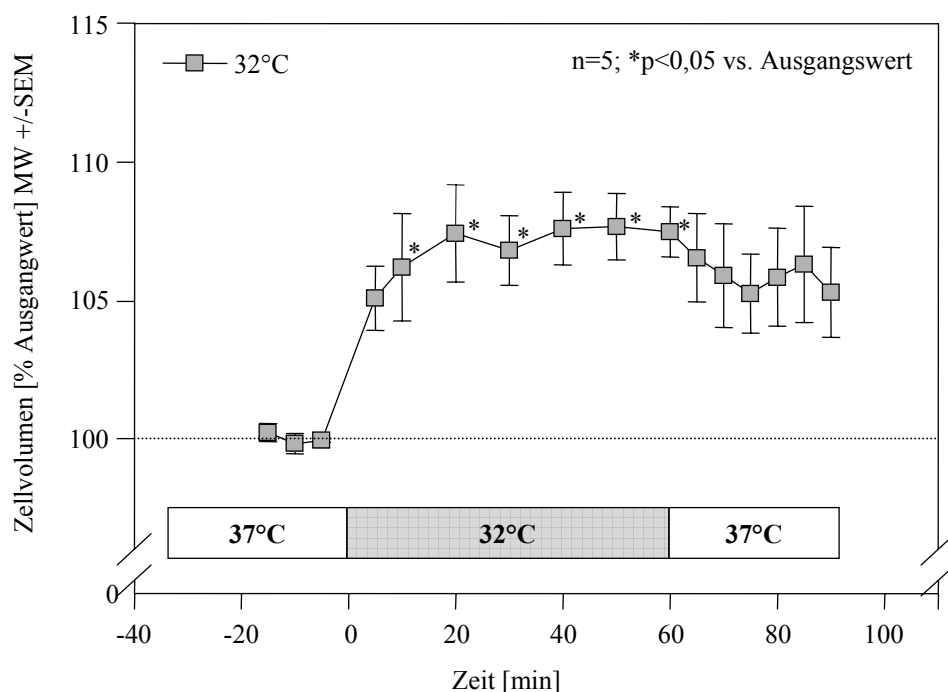
Abb. 11: Volumenreaktion von C6 Gliomzellen bei 40°C.

Bei 40° (gefüllte Symbole) kam es zur kontinuierlichen Volumenzunahme der Zellen. Die Normalisierung der Temperatur zeigte keinerlei hemmenden Effekt auf diesen Prozeß.

### 3.1.1.3 Primär kultivierte Astrozyten

Die Suspension primär kultivierter Astrozyten bei 32°C erfolgte nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll (Abb. 12). Es kam zu einer deutlichen Volumenreaktion innerhalb der ersten 10 min, die nach 20 min ihr Maximum bei  $107,4 \pm 1,8\%$  des Ausgangswertes erreichte. Nach Erwärmung auf 37°C war eine leichte Erholungstendenz auf  $105,3 \pm 1,6\%$  des Ausgangswertes festzustellen. Die Schwellungskinetik der Astrozyten ist charakterisiert durch eine initialen Volumenzunahme, dem Erreichen eines Plateaus und einer partiellen Erholung am Ende des Beobachtungszeitraums. Somit zeigten die primär kultivierten Astrozyten sowohl quantitativ als auch kinetisch eine mit den C6 Gliomzellen (Abb. 9) vergleichbare Volumenreaktion.

Die Zellvitalität der Astrozyten belief sich zu Versuchsende auf durchschnittlich 75%.

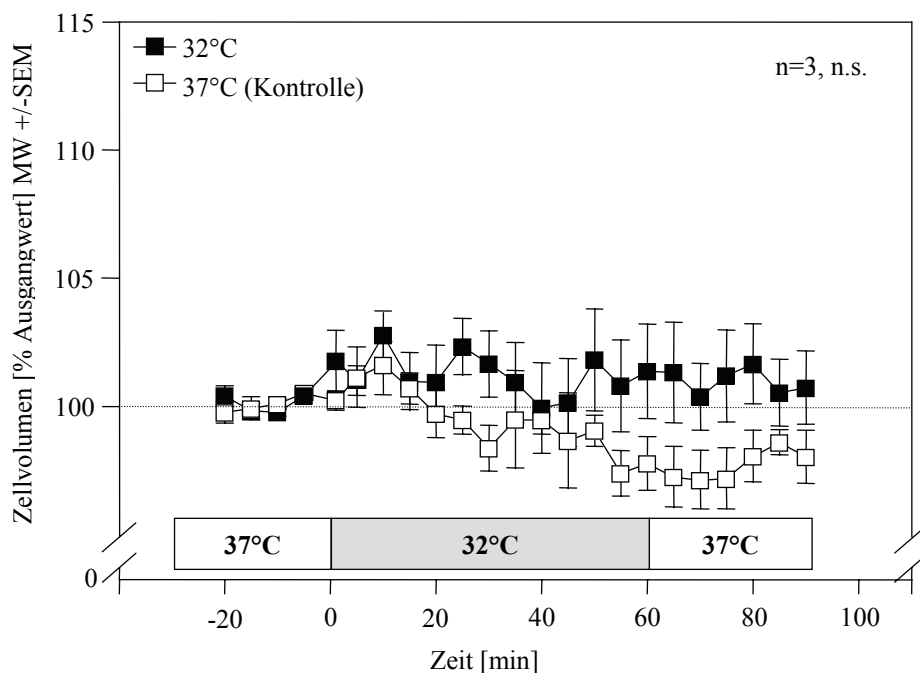


**Abb. 12: Volumenreaktion primär kultivierter Astrozyten bei 32°C**

Primär kultivierte Astrozyten zeigten eine signifikante Zellvolumenzunahme nach Induktion einer milden Hypothermie. Nach 10 min war ein Maximum von  $107,4 \pm 1,8\%$  des Ausgangswertes erreicht. Nach Temperaturnormalisierung war lediglich eine partielle Erholungstendenz zu verzeichnen.

#### 3.1.1.4 Humane Granulozyten

In der Versuchsreihe mit humanen Granulozyten wurde ebenfalls nach dem bereits beschriebenen Protokoll verfahren. Nach Separation und Suspension in physiologischem Medium, zeigten die Granulozyten keine Hypothermie-induzierte Volumenreaktion (Abb. 13). Das Zellvolumen wies während des gesamten Beobachtungszeitraums in Inkubation bei 32° C keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle bei 37°C auf. Ebenso blieb die Zellvitalität in beiden Versuchsgruppen ohne Unterschied (beide 85%).



**Abb. 13: Volumenreaktion humaner Granulozyten**

Die Suspension von Granulozyten bei 32°C (gefüllte Symbole) und die Kontrolle bei 37°C (offene Symbole) zeigt in beiden Gruppen keine signifikante Volumenänderung.

## 3.2 Versuche zur Bedeutung von Natrium- und Chlorid-Ionen bei der Hypothermie-induzierten Schwellung von Gliazellen

### 3.2.1 Natrium-freies Medium

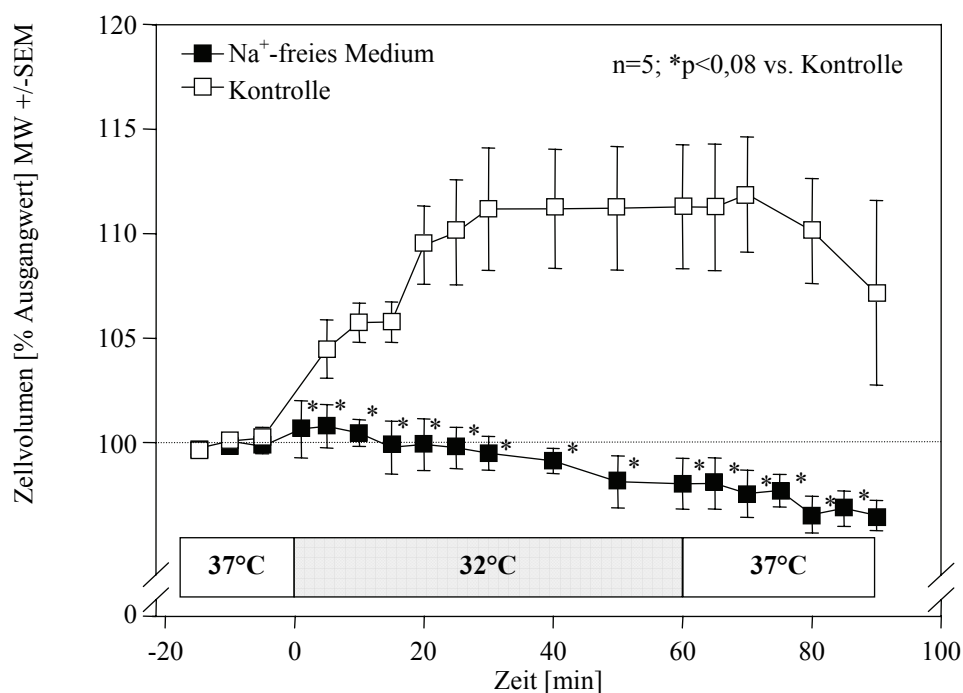
Die Suspension der C6 Gliomzellen in Natrium-freiem Medium führte zu einer Hemmung der Hypothermie-induzierten Zellschwellung (Abb.14). Nach Abkühlung der Suspensionstemperatur auf 32°C blieb die initiale Volumenzunahme, wie sie in der Kontrollgruppe mit bikarbonat-gepuffertem Medium, Na<sup>+</sup>-haltigem Medium zu beobachten war, aus. Bereits nach 10 min blieb die Volumenreaktion signifikant ( $p < 0,008$  vs. Kontrolle,  $n=5$ ) unterhalb der Zellschwellung in der Kontrollgruppe. Während des gesamten Versuchs kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des Volumens der Natrium-freien Zellsuspension, auch die Restitution der Temperatur auf 37°C zeigte keinerlei Effekt auf die Zellschrumpfung. Am Ende des Beobachtungszeitraums betrug das Zellvolumen der C6 Glioma  $96,5 \pm 0,7\%$  des Ausgangswertes.

Die Zellvitalität in Natrium-freiem Medium lag am Ende der Untersuchung bei 70%, das der Kontrolle bei 90%.

Die Kontrollgruppe in Natrium-haltigem Medium zeigte die bereits bekannte Schwellungskinetik mit rascher Volumenzunahme, dem Erreichen eines Plateaus und einer partiellen Volumenerholung nach Normalisierung der Temperatur.

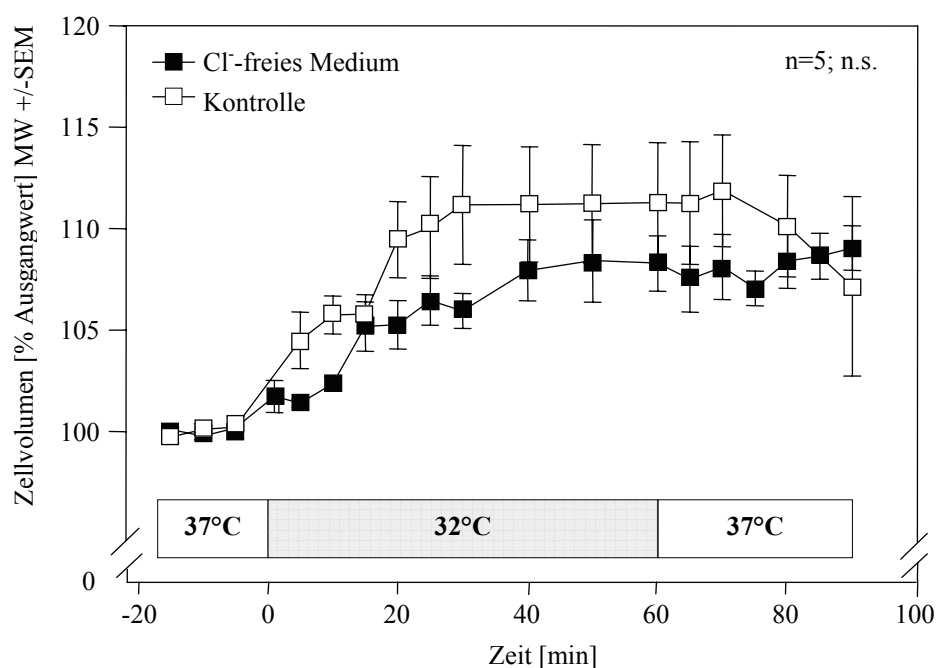
### **3.2.2 Chlorid-freies Medium**

In Chlorid-freiem Medium kam es bei 32°C zu einer deutlichen Volumenzunahme der C6 Gliomzellen (Abb. 15). Wie in der Bikarbonat-gepufferten Kontrollsuspension war zunächst eine Volumenzunahme zu verzeichnen, die nach 20 min ein Plateau erreichte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Schwellung in Chlorid-freiem Medium weniger ausgeprägt, jedoch erwies sich der Unterschied als statistisch nicht signifikant. Auch ließ sich keine Erholungstendenz nach Temperaturnormalisierung nachweisen. Im Gegensatz zur Kontrolle kam es zu keinem Rückgang der Zellschwellung. Am Ende des Beobachtungszeitraums betrug das Zellvolumen  $109,0 \pm 1,1\%$  in Chlorid-freiem und  $107,2 \pm 0,4\%$  in Bikarbonat-gepuffertem Kontroll-Medium. Die Zellvitalität in Chlorid-freiem Medium lag ohne Unterschied zur Kontrollgruppe bei 90%.



**Abb. 14: Hypotherme Suspension von C6 Glioma in Natrium-freiem Medium**

Die Abwesenheit von Natrium-Ionen führte zur vollständigen Verhinderung der Hypothermie-induzierten Schwellung von Gliazellen.



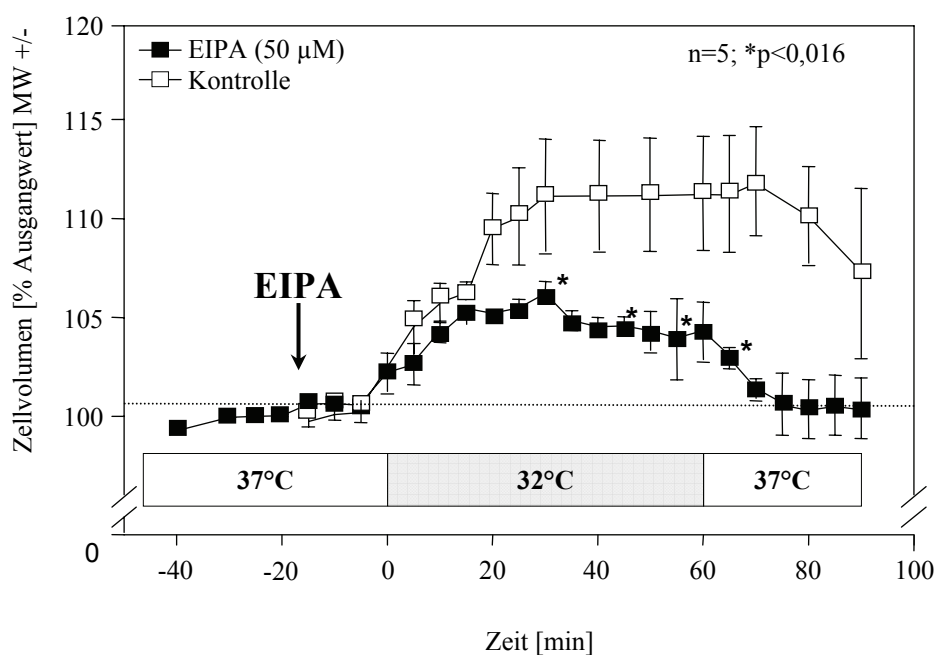
**Abb. 15: Hypotherme Suspension von C6 Glioma in Chlorid-freiem Medium**

Das Fehlen von Chlorid-Ionen im Medium führt zu einer geringfügig schwächeren, jedoch nicht signifikant reduzierten Volumenzunahme bei 32°C.



### 3.2.3 Inhibition des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters

In dieser Versuchsgruppe wurde 15 min vor Hypothermie-Induktion EIPA, ein spezifischer Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  zur Zellsuspension gegeben (Abb. 16). Die Zugabe des Pharmakons führte zu keiner Änderung des Zellvolumens während der Kontrollphase. Mit Einleitung der Hypothermie kam es nach fünf Minuten zu einer deutlichen Volumenzunahme auf  $105,5 \pm 0,6\%$  des Ausgangswertes, die nach 15 min ein Plateau erreichte. Im weiteren Verlauf zeigten sich nur geringfügige Volumenveränderungen. In der zweiten Hälfte der Hypothermiephase stabilisierte sich das Zellvolumen und betrug nach 60 min  $104,3 \pm 1,5\%$ . In der anschließenden Erholungsphase war ein vollständiger Rückgang der Zellschwellung auf  $100,4 \pm 1,5\%$  des Ausgangswertes zu verzeichnen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Hypothermie-induzierte Zellschwellung nach Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters demnach signifikant abgeschwächt (\* $p < 0,016$  vs Kontrolle;  $n=5$ ). Die Zellvitalität zum Ende des Versuchs betrug 85%. Der  $\text{pO}_2$  und  $\text{pCO}_2$  lagen im physiologischen Bereich, der pH betrug 7.4.



**Abb. 16: Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters mit EIPA**

Die Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters bei Gliazellen mit EIPA (50  $\mu\text{M}$ ) führte zur signifikanten Reduktion der Hypothermie-induzierten Zellschwellung. Nach Normalisierung der Temperatur kam es im Gegensatz zur Kontrolle zur vollständigen Volumenerholung.

### 3.3 Einfluß von Hypothermie auf die Mediator-induzierte Zellschwellung

#### 3.3.1 Milchsäureazidose

Milchsäureazidose führt, wie bereits in zahlreichen Untersuchungen gezeigt (Staub 1990, Staub 1995), zur Volumenzunahme von Gliazellen. In unserer Versuchsgruppe wurde der pH des Versuchsmediums nach einer Kontrollphase mittels Titration mit isotoner Milchsäure von 7,4 auf 6,2 gesenkt. Wie aus den Voruntersuchungen bekannt, zeigte sich in der Kontrolle bereits zum ersten Meßzeitpunkt (1 Minute) eine rapide Volumenzunahme auf  $107,4 \pm 0,7\%$  des Ausgangswertes. Über den 60 minütigen Beobachtungszeitraum setzte sich der Prozeß der Volumenzunahme fort und hatte nach 30 Minuten  $120,9 \pm 1,5 \%$  und nach 60 Minuten  $125,1 \pm 2,5\%$  des Ausgangswertes erreicht. Im Anschluß folgte die Realkalisierung mit 1N NaOH auf pH 7,4. Nach Wiederherstellung des physiologischen pH kam es zur kontinuierlichen Erholung des Zellvolumens, wobei die Ausgangswerte jedoch nicht erreicht wurden ( $105,4 \pm 1,8 \%$  des Ausgangswertes, Abb. 17).

Die simultane Induktion von Hypothermie ( $32^{\circ}\text{C}$ ) und Azidose (pH 6,2) zeigte die selbe Volumenreaktion. Zum ersten Meßzeitpunkt betrug das Zellvolumen  $106,2 \pm 2,0\%$  des Ausgangswertes. Nach 30 minütiger Inkubation war das Volumen auf  $117,8 \pm 2,1\%$  und nach 60 Minuten auf ein Maximum von  $119,2 \pm 3,8\%$  angestiegen. Nach Neutralisierung war eine deutliche Erholung des Zellvolumens zu verzeichnen, die am Ende des Beobachtungszeitraums  $100,5 \pm 3,1\%$  des Ausgangswertes und somit das Ausgangsniveau erreichte.

Allenfalls in der Erholungsphase nach Realkalisierung und Wiedererwärmung auf  $37^{\circ}\text{C}$  zeigte sich in der Hypothermiegruppe eine positive Tendenz mit einem deutlicheren Rückgang des Zellvolumens auf den Ausgangswert zu Beginn des Experiments, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

#### 3.3.2 Arachidonsäure

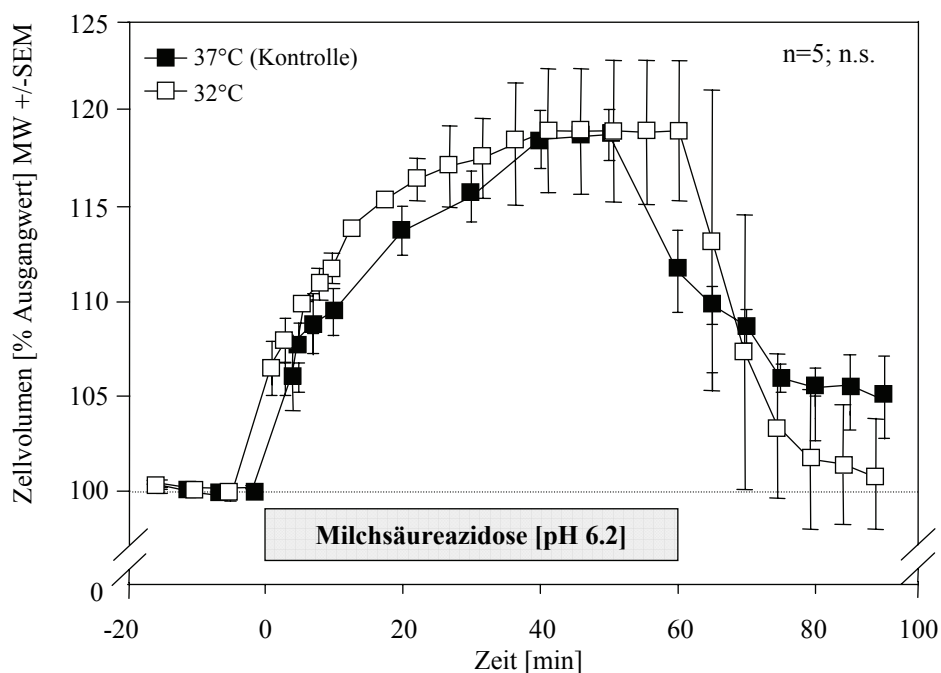
Die Zugabe von Arachidonsäure zu Gliomzellen führte bei  $37^{\circ}\text{C}$  innerhalb von 7 Minuten zur maximalen Volumenzunahme von  $110,0 \pm 0,6\%$  des Ausgangswertes. Innerhalb der nachfolgenden 60 Minuten kam es zum Rückgang des Volumens auf  $104,6 \pm 0,7\%$  (Abb. 18).

Zeitgleich mit der Kontrolle erreichte die Volumenzunahme der Hypothermie-Gruppe ein Maximum von  $111,3 \pm 1,0\%$  und betrug am Ende des Beobachtungszeitraums  $104,9 \pm 0,6\%$

des Ausgangswertes. Die Volumenreaktion auf die Zugabe von Arachidonsäure erschien bei 32°C etwas deutlicher ausgeprägt, statistisch ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

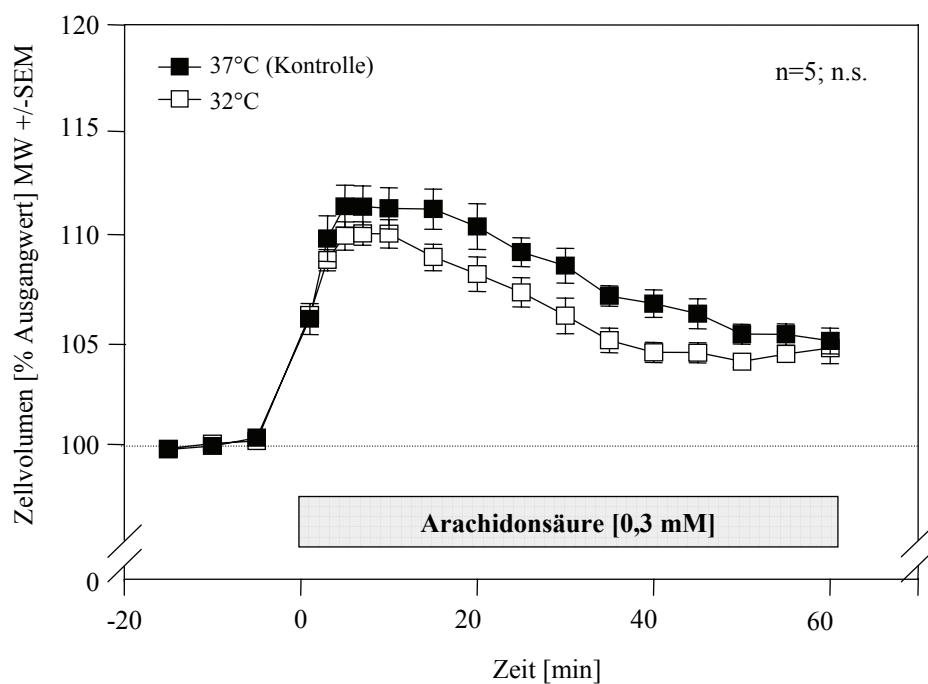
### 3.3.3 Glutamat

Die Inkubation der Zellsuspension mit 1 mM Glutamat führte unter Kontrollbedingungen nach 60-minütiger Beobachtungszeit zu einer kontinuierlichen Volumenzunahme von  $116,8 \pm 1,5\%$  des Ausgangswertes. Das selbe Experiment bei 32°C durchgeführt, zeigte keine Änderung der Volumenantwort, nach 60 Minuten betrug das Zellvolumen der hypothermen Suspension  $115,6 \pm 1,3\%$  des Ausgangswertes. Mit Absinken der Temperatur schien die Volumenzunahme nach Glutamat-Inkubation weniger deutlich ausgeprägt, jedoch ließ sich statistisch keine Signifikanz nachweisen (Abb. 19).



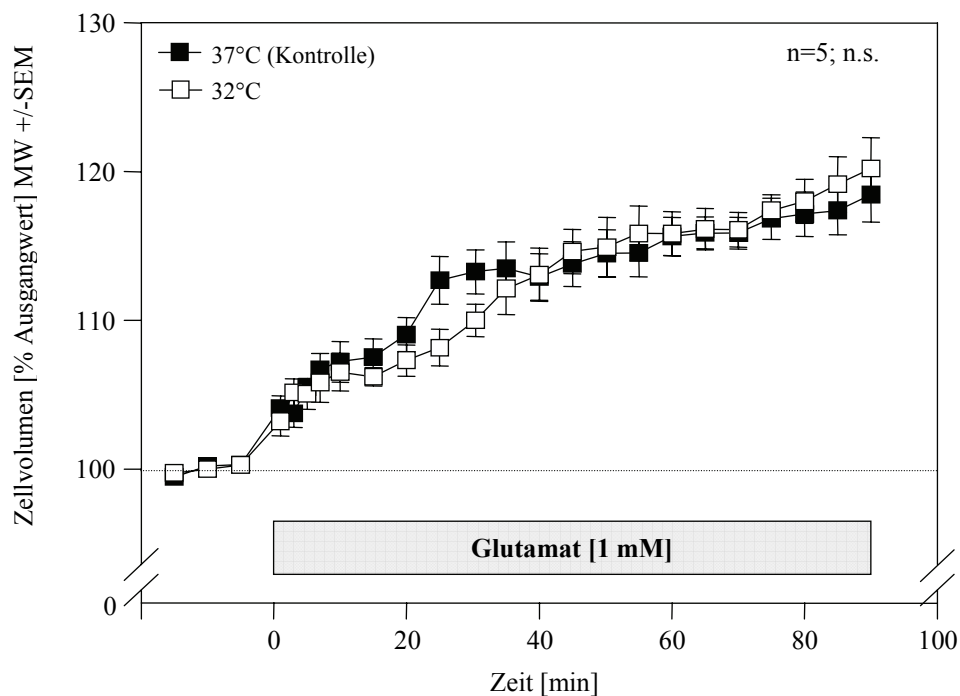
#### Abb. 17: Azidose-induzierte Zellschwellung

Hypothermie (offene Symbole) hatte keinen Einfluß auf die Milchsäure-induzierte Zellschwellung der C6 Glioma. Die Hypothermie-Gruppe zeigt nach Temperaturnormalisierung eine deutlichere, aber nicht signifikante Volumenerholung im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 18: Arachidonsäure-induzierte Zellschwellung**

Die hypotherme Suspension mit 0,3 mM Arachidonsäure (offene Symbole) führt zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Volumenantwort. Sowohl das Ausmaß der Volumenzunahme als auch der zeitliche Verlauf entsprechen dem der Kontrolle bei 37°C.



**Abb. 19: Glutamat-induzierte Zellschwellung**

Die Zugabe von 1mM Glutamat führte unter Kontrollbedingungen (gefüllte Symbole), zur kontinuierlichen Volumenzunahme. Bei 32°C zeigte sich keine veränderte Volumenreaktion als nach Inkubation mit Glutamat bei 37°C.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den aufgezeigten Experimenten wurde die Wirkung milder und moderater Hypothermie auf das Volumen von Gliazellen und neutrophilen Granulozyten untersucht. Des Weiteren wurden Experimente in Natrium- und Chlorid-freiem Medium sowie unter Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters zur Klärung der Mechanismen der Hypothermie-induzierten Gliaschwellung durchgeführt. Der Einfluß milder Hypothermie auf die zytotoxische Zellschwellung wurde an der Milchsäureazidose-, Arachidonsäure- und Glutamat-induzierten Gliaschwellung untersucht.

Für die Untersuchungen wurde ein etabliertes *in vitro* Modell gewählt, das die Suspension verschiedener Zellpopulationen und eine genaue und rasche Temperaturregulation gewährleistet. Das Zellvolumen wurde durchflußzytometrisch nach dem Coulter-Prinzip gemessen. Die Zellvitalität wurde nach der Trypanblau-Ausschlußmethode ermittelt.

I. Die Abkühlung des Suspensionsmediums auf  $32^\circ\text{C}$  führte bei Gliazellen und primär kultivierten Astrozyten zu einer raschen und signifikanten Volumenzunahme, die nach Erwärmung zum Teil eine Erholungstendenz zeigte. Weitere Experimente mit Gliazellen zeigten eine enge Korrelation zwischen Temperaturtiefe und Ausmaß der Zellschwellung. Im Gegensatz dazu war bei den neutrophilen Granulozyten keine Hypothermie-induzierte Volumenzunahme zu verzeichnen.

II. In Abwesenheit von Natrium-Ionen blieb die Volumenreaktion in Hypothermie aus, das Fehlen von Chlorid-Ionen bewirkte nur eine geringe, nicht signifikante Abschwächung der Zellschwellung. Die Beteiligung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters an der Hypothermie-induzierten Volumenzunahme wurde durch eine signifikant abgeschwächte Zellschwellung nach Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor EIPA nachgewiesen.

III. Ein möglicher therapeutischer Effekt milder Hypothermie auf das zytotoxische Ödem wurde am Beispiel der Milchsäure-, Arachidonsäure- und Glutamat-induzierten Zellschwellung untersucht. Die Zellschwellung der Kontrollgruppen entsprach der erwarteten Volumenzunahme in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration der Mediatoren. Milde Hypothermie zeigte bei keiner der drei Substanzen einen Effekt auf die Volumenreaktion.

## 4. Diskussion

### 4.1 C6 Glioma als Modellzelllinie für primär kultivierte Astrozyten

Viele Untersuchungen zu den Mechanismen des zytotoxischen Hirnödems haben gezeigt, daß insbesondere Astrozyten von diesem Ödem betroffen sind (Hossmann KA, 1968, Baethmann A, 1979, Bullock et al., 1991, Kimelberg HK, 1995). Zwar kann es bei Neuronen auch zur zytotoxischen Schwellung kommen, jedoch fällt der Volumenanteil der geschwollenen Neuronen im Verhältnis zum Volumen geschwollener Gliazellen beim zytotxischen Hirnödem nicht ins Gewicht (Staub et al., 1993). Aus diesem Grund konzentrierten sich unsere Untersuchungen zum zytotoxischen Hirnödem auf Astrozyten. Als Modellzelllinie für Astrozyten wurden in den vorliegenden Untersuchungen C6 Gliomzellen herangezogen, die einem N-Nitrosomethylharnstoff-induzierten Rattentumor entstammen. C6 Gliomzellen weisen quantitativ und qualitativ in hohem Maße gliaspezifische Eigenschaften auf, z.B. die Expression gleicher Membrantransporter und gliaspezifischer Proteine (Tab. 3). Von besonderer Bedeutung ist, dass C6 Glioma eine hohe Expression des S-100 Proteins aufweisen. Das S-100 Protein stellt eine Gruppe von verschiedenen Proteinen dar, die regulierend auf grundlegende Zellfunktionen wie Zellwachstum, interzelluläre Kommunikation, Metabolismus und intrazelluläre Signaltransduktion wirken (Zimmer DB, 1995; Benda et al., 1971). Ausschlaggebend für Etablierung der C6 Gliomzellen als permanente Zelllinie war letztendlich die Korrelation einer hochgradigen Zelldifferenzierung mit einer hohen Expression des S-100 Protein (Zimmer DB, Van Eldik LJ, 1989).

Im jungen Passagealter (ca. Passage 30-50) zeigen die C6 Gliomzellen Oligodendrozyten-ähnlichen Eigenschaften. In diesem Stadium weisen die C6 Glioma eine hohe Aktivität der zyklischen Nukleotidphosphorylase (CNP), einem oligodendrozytärem Markerenzym, auf (Parker et al., 1980). Mit zunehmendem Passagealter kommt es zur Transdifferenzierung der Zellen zu einem astrozytären Zelltyp mit Expression Astrozyten-spezifischer Enzyme, Astrozyten-typischer Uptake-Mechanismen für Neurotransmitter wie Glutamat, Aspartat und  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) und des gliaspezifischen Markerproteins, das saure Gliafaserprotein GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Tab. 3).

In diesem Stadium zeigen C6 Gliomzellen in wichtigen zellulären Merkmalen nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ weitgehende Übereinstimmung mit primär kultivierten Astrozyten (Parker et al., 1980).

Um diese wesentliche Übereinstimmung gliaspezifischer Merkmale für unsere Untersuchung zu gewährleisten, wurden für die Experimente nur die Passagen 70-90 verwendet.

Ebenso konnten Volumenregulationsmechanismen, die zu einer regulatorischen Volumenabnahme (RVD= regulatory volume decrease) nach hypotoner Suspension führen, in C6 Gliomzellen und Astrozyten gleichermaßen nachgewiesen werden (Tab. 3). In vorangegangenen Arbeiten ist gezeigt worden, daß der für diese Arbeit bedeutende  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter bei beiden Zelltypen ebenfalls in vergleichbarem Maße exprimiert ist (Jakubovicz et al., 1987; Boyarsky et al., 1993). Auch bezüglich intrazellulärer Elektrolytkonzentrationen und Membrantransportmechanismen für Ionen findet sich weitestgehende Analogie von C6 Gliomzellen und Astrozyten. Nach Glutamat-, Arachidon- und Milchsäureexposition zeigen beide Zelltypen eine vergleichbare Volumenzunahme (Schneider et al., 1992, Winkler et al. 2000, Staub et al., 1995).

Zur Validierung der Ergebnisse aus den Hypothermie-Versuchen mit C6 Glioma wurden auch Untersuchungen an primär kultivierten Astrozyten durchgeführt. Diese zeigten in Bezug auf Quantität und Kinetik erwartungsgemäß analoge Resultate (Abb. 12).

Prinzipiell hätten für die Untersuchungen auch ausschließlich Astrozyten aus Primärkultur verwendet werden können. Allerdings bieten die C6 Gliomzellen durch die kurze Generationszeit und das schnelle Zellwachstum den Vorteil einer einfachen und raschen Zellkultivierung, wodurch immer ausreichendes Zellmaterial bereitgestellt werden kann. Darüber hinaus bieten C6 Gliomzellen den Vorteil einer gegenüber primär kultivierten Astrozyten sehr homogenen Volumenverteilung, was die Erfassung geringer Zellvolumenänderungen mit hoher Genauigkeit erlaubt.

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

Tab. 3: Vergleichende Gegenüberstellung biochemischer und funktioneller Parameter von Gliomzellen (C6) und primär kultivierten Astrozyten (PK)



## 4.2 Das *in vitro* Modell

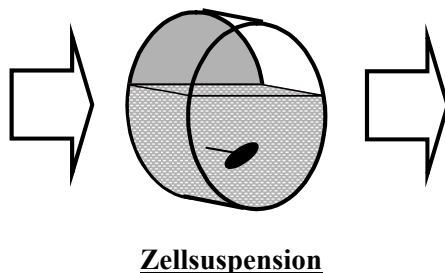
Die multiplen Vorgänge, die bei einem Schädel-Hirn-Trauma oder einem ischämischen Insult kaskadenartig ablaufen, stehen seit langem im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Zwar sind mittlerweile Grundzüge der Pathophysiologie ischämischer und traumatischer Ereignisse bekannt, doch mit zunehmendem Verständnis steigt auch die Komplexität der zu erforschenden Mechanismen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass beispielsweise mechanische Manipulationen am Gehirn bereits eine Verfälschung von *in vivo* erhobenen Daten zur Folge haben können (Gennarelli TA, 1994). Dazu zählen beispielsweise die Öffnung der Schädelkalotte oder die Einführung von Meßgeräten in das Hirnparenchym. Noch schwieriger gestaltet sich die Untersuchung einzelner pathophysiologischer Vorgänge, bei denen relevante Prozesse häufig nicht von Epiphänomenen unterschieden werden können. Im Gegensatz zu tierexperimentellen Untersuchungen können *in vitro* Pathomechanismen gezielt untersucht werden. Das hier verwendete experimentelle Modell suspendierter Zellen macht es möglich, alle relevanten Parameter gezielt zu kontrollieren. So sind bedeutende Zielgrößen wie Temperatur, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, Osmolarität, Zellvitalität und die Konzentration pharmakologischer Substanzen engmaschigen Kontrollen zugänglich und können im Versuchsablauf verändert werden. Insbesondere die Koppelung der Inkubationskammer an ein thermostatreguliertes Wasserbad ermöglicht eine rasche und exakte Temperaturregulation der Zellsuspension, was für die vorliegenden Untersuchungen eine Grundvoraussetzung darstellte.

*In vivo* ist der Extrazellulärraum eine endliche Größe, verschiedene Substanzen und Stoffwechselmetabolite, die bei einem Insult freigesetzt werden, können hier akkumulieren und so zu einem unkalkulierbaren Störfaktor werden. Anders die Situation in dem hier verwendeten Modell. Hier ist das Verhältnis von Extra- zu Intrazellulärraum praktisch unendlich und sekundäre Einflüsse, wie beispielsweise die Freisetzung von Kalium-Ionen, können so minimiert werden (Kempski et al., 1988, Abb. 20).

Insgesamt bietet das *in vitro* Modell eine Vielzahl von Möglichkeiten, Prozesse auf zellulärer oder molekularer Ebene zu untersuchen und zu entschlüsseln.

**Steuergrößen**

Sauerstoffpartialdruck  
 CO<sub>2</sub>-Partialdruck  
 Medium-pH  
 Temperatur  
 Medium-Elektrolyte  
 Osmolarität  
 Substrate, Pharmaka

**Zellsuspension****Meßgrößen**

Zellvolumen  
 intrazellulärer pH  
 Zellvitalität  
 intrazelluläre Elektrolyte  
 Sauerstoffverbrauch  
 Laktatproduktion  
 Membranpotential

**Abb. 20: Steuer- und Meßgrößen des in vitro Modells (modifiziert nach Zimmer 1989)**

Das Suspensionsmodell bietet die Möglichkeit die links dargestellten Steuergrößen konstant zu halten bzw. gezielt zu verändern. Auswirkungen auf die rechts dargestellten Meßgrößen können mit geeigneten Analyseverfahren quantitativ erfaßt werden.

### **4.3 Substitution von Natrium und Chlorid-Ionen im Versuchsmedium**

#### **4.3.1 Natrium- freies Medium**

Die Rolle von Natriumionen wurde durch den Ersatz von Natrium durch Cholin untersucht. Cholin ist im Vergleich zu Natriumionen ein verhältnismäßig großes Molekül (Cholin: 104,14 g/Mol, Na<sup>+</sup>: 22,99 g/Mol). Aufgrund seiner Größe wird es von den Membrantransportern nicht transportiert und kann somit nicht in die Zelle gelangen (Rosenberg et al., 1972; Nasmith PE & Grinstein S, 1986). Zur Substitution des Puffers Natrium-Bikarbonat, der im Standard-Versuchsmedium als Natriumsalz vorlag, wurde dem Na<sup>+</sup>-freien Medium Cholin-Bikarbonat zugegeben und die Osmolarität auf 300 mosmol eingestellt (Tab.2). Cholin, das für unsere Untersuchungen als Cholin-Chlorid vorlag, hat keinerlei toxische Effekte auf Zellen (Nasmith PE, Grinstein S 1986).

Natrium-Ionen spielen bei essentiellen Stoffwechselfvorgängen der Zelle eine grundlegende Rolle. So können das Membranpotential über die energieabhängige Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die Volumen- und pH<sub>i</sub>-Kontrolle ohne Natrium-Ionen nicht aufrecht erhalten werden. Auch sind, sogenannte sekundär aktive Transportprozesse für Glucose, Aminosäuren und Ionen abhängig vom transmembranären Natrium-Gradienten (Greger R, 1994). Die signifikant geringere Zellvitalität (70% vs 85-90%) am Ende der Natrium-freien Versuchreihe deutet auf eine Erschöpfung von essentiellen, offenbar Natrium-abhängigen Stoffwechselfvorgängen hin. Dafür bieten der Zusammenbruch des Membranpotentials und der eingeschränkte oder fehlende Transport von Energielieferanten wie Glucose oder Aminosäuren einen Erklärungsansatz.

Bereits 1972 konnten Dipolo und Latorre zeigen, dass Hypothermie einen Einfluss auf das transmembranäre Membranpotential hat. Auch konnte belegt werden, dass die notwendige ATP-Produktion für die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Hypothermie deutlich reduziert ist (Singer D & Bretschneider HJ, 1990).

Die Beobachtung, daß in Natrium-freiem Medium die Hypothermie-induzierte Zellschwellung ausbleibt und es sogar im Verlauf zur kontinuierlichen Zellschrumpfung kommt, legt nahe, daß Natrium-Ionen im Wesentlichen zur der Hypothermie-induzierten Zellschwellung beitragen.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellvolumens und der  $\text{pH}_i$ -Kontrolle nehmen der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter (Rotin D & Grinstein S, 1989), der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (Hallows KR & Knauf PA, 1994), der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (Tas et al. 1987) und der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter (Kimmelberg et al. 1979) ein. Die völlig fehlende Zellschwellung in Abwesenheit von Natrium-Ionen lenkte unser primäres Interesse darauf, welche Rolle dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter bei der Hypothermie-induzierten Zellschwellung zukommt.

Diese Frage wurde in einer weiteren Versuchsreihe unter Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters genauer untersucht.

#### 4.3.2 Chlorid- freies Medium

Für die Herstellung des Chlorid-freien Mediums wurden die entsprechenden Chloridsalze durch isomolare Konzentrationen der analogen Glukonatsalze ersetzt (Tab. 2). Diese Glukonatsalze (Glukonat MW: 196,2 g/mol) können aufgrund des deutlich höheren Molekulargewichtes im Vergleich zu Chlorid (MW: 35,5 g/mol) von den Chlorid-Transportern der Zellmembran nicht transportiert werden. Um die Kalzium-chelierende Eigenschaften von Glukonat zu berücksichtigen, wurde die Kalziumkonzentration des Mediums durch die Zugabe von Kalziumsulfat auf physiologische Werte gebracht (Abercrombie et al., 1983). Die physiologische Osmolarität des Mediums wurde mit Natrium-Glukonat auf 300 mosmol eingestellt. Die Substituion von Chlorid durch Glukonatsalze zeigte in unseren Versuchen keinen Einfluß auf die Zellvitalität ( 90%, kein Unterschied zur Kontrolle).

Chlorid-Kanäle bzw. Chlorid-Transporter sind bei eukaryoten Zellen ubiquitär vorhanden und an grundlegenden Zellfunktionen wie der Volumen- und  $\text{pH}_i$ -Regulation sowie der Kontrolle des Membranpotentials beteiligt (Nilius et al., 1996). Auch für C6 Gliomzellen wurde in verschiedenen Arbeiten die Rolle von Chlorid-Ionen bei der  $\text{pH}_i$ - und Volumen-Regulation untersucht (Ringel et al., 2000; Chassande et al., 1988).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Hypothermie-induzierte Zellschwellung in Abwesenheit extrazellulärer Chlorid-Ionen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe allenfalls einen tendenziellen Unterschied der Schwellungskinetik und –ausprägung aufweist. Dies legt nahe, daß nicht Chlorid-Ionen sondern hauptsächlich Natrium-Ionen als osmotisch aktive Ionen zur Hypothermie-induzierten Schwellung beitragen, was wiederum die Ergebnisse aus den Natrium-freien Versuchsreihen bestätigt.

Zelluläre Volumen- und  $\text{pH}_i$ -Kontrolle sind zum Teil ineinander greifende, co-regulative Prozesse (Kempski et al. 1988, Plesnila et al. 1999, Ringel et al., 2000). So wird zum Beispiel im physiologischen Temperaturbereich der  $\text{pH}_i$  primär über die  $\text{H}^+$ -ATPase und den Natrium-abhängigen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter (Shrode LD & Putnam RW, 1994) reguliert, wobei der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter in diesem Fall nur von geringerer Bedeutung ist (Plesnila et al., 1999). Die tendenzielle Reduktion der Hypothermie-induzierten Schwellung in Chlorid-freiem Medium deutet möglicherweise darauf hin, daß Chlorid-Ionen eine geringe, wahrscheinlich im Vergleich zu Natrium-Ionen untergeordnete Rolle bei der Hypothermie-induzierten Schwellung spielen.

Aus diesem Grund wurde auf weiterführende Untersuchungen mit spezifischen  $\text{Cl}^-$ -Kanal- bzw. Transportinhibitoren verzichtet.

#### **4.4 Inhibition des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters mit EIPA**

Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter ist ein Membranprotein, das eine grundlegende Rolle bei der Regulation des Zellvolumens und des intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ) spielt. Intrazelluläre Azidose oder die Abnahme des Zellvolumens führen zur Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters (Kimmelberg et al., 1979, Mellergard et al., 1992, Demaurex et al., 1994). Amilorid und sein Abkömmling EIPA (5-N-Ethyl-N-Isopropyl-Amiloride) sind Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters, die den Transport von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle und  $\text{H}^+$ -Ionen aus der Zelle verhindern (Vigne et al., 1983). EIPA ist ein kompetitiver Inhibitor, das heißt es konkurriert mit extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Ionen um die Bindung am  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (Grinstein et al., 1984; Mahnensmith RL & Aronson PS, 1985).

Für die vollständige Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters wurde in vorangegangenen Studien eine Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  EIPA ermittelt (Ringel et al., 2000, Jean et al., 1986).

Das Derivat EIPA zeichnet sich gegenüber Amilorid durch eine größere Spezifität und eine ca. 100-fach höhere Potenz bei der Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters aus (Vigne et al., 1983). Diese ausgesprochen hohe Spezifität stellt sicher, daß EIPA im Gegensatz zu Amilorid auch in höheren Konzentrationen nicht zur Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Soltoff et al., 1983, Renner et al., 1988) führt. Dies wiederum bedeutet, dass die signifikante Reduktion der Hypothermie-inuzierten Schwellung in der Tat auf eine Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters zurückzuführen ist, und nicht das Resultat einer Inhibition weiterer Membrantransporter darstellt.

Somit stellt sich die Frage, ob möglicherweise der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, dessen grundlegende Aufgabe es ist, das Zellvolumen und den  $\text{pH}_i$  in einem physiologischen Bereich zu halten, durch Hypothermie aktiviert wird (Plesnila et al., 1999). Prinzipiell wären die physiologischen Aktivierungsmechanismen, zum einen das Absinken des  $\text{pH}_i$  als auch eine Änderung des Zellvolumens denkbar. Entsprechend den postulierten Ausschlusskriterien hätte ein instabiles, zunehmendes Zellvolumen jedoch zum Ausschluß des Experimentes geführt. Intrazelluläre Azidose kommt als Aktivierungsmechanismus ebenfalls weniger in Betracht, da Hypothermie zur Alkalisierung des  $\text{pH}_i$  führt und nicht zur Azidose (Aickin CC & Thomas RC, 1977).

Relevant hingegen erscheint der Aspekt, daß Hypothermie einen Einfluss auf die Proteinstruktur des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters hat, und auf diese Weise zur Veränderung der Aktivitätskurve des Transporters führt. Marjanovic und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in Hypothermie der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter bereits bei physiologischem  $\text{pH}_i$  aktiv ist (Marjanovic et al., 1998). Dies würde die teilweise Hemmung der Hypothermie-induzierten Schwellung durch EIPA erklären.

Nicht zu vernachlässigen ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass trotz der Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters in Hypothermie eine anfängliche Schwellung zu verzeichnen ist, bevor sich das Zellvolumen stabilisiert. Dies weist auf weitere Mechanismen hin, die bei der Hypothermie-induzierten Schwellung von Gliazellen beteiligt sein könnten.

## 4.5 Hypothermieeffekt auf die zytotoxische Schwellung von Gliazellen

### 4.5.1 Milchsäureazidose

Milchsäure führt zum zytotoxischen Ödem bei Astrozyten und Neuronen (Jakubovicz et al., 1987; Staub et al., 1990; Staub et al., 1993). Der Mechanismus dieser Schwellung stand im Mittelpunkt zahlreicher *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen (Staub et al., 1990, Staub et al. 1993, Plesnila et al., 1999, Ringel et al., 2000). Basierend darauf wurde das folgende Konzept entwickelt: durch die extrazelluläre Azidose reagieren Protonen mit Bikarbonat zu Kohlendioxid, das als ungeladenes Gas im Gegensatz zu Protonen die Membran frei permeieren kann und so in den Intrazellularraum gelangt. Hier reagiert das Kohlendioxid mit Wasser zu Kohlensäure. Kohlensäure wiederum dissoziiert spontan zu Protonen und Hydrogencarbonat. Der intrazelluläre Anstieg der Protonenkonzentration bewirkt das Absinken des intrazellulären  $\text{pH}$ . Dies führt zur Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters, der getrieben durch das Natrium-Konzentrationsgefälle Protonen gegen den Einstrom von Natrium aus der Zelle heraus transportiert. Dieser Natrium-Einstrom zieht, den osmotischen Kräften folgend, Wasser nach sich, das in die Zelle einströmt und so zur Zellschwellung führt.

Wie in unseren Untersuchungen gezeigt werden konnte, hatte Hypothermie keinerlei Einfluß auf die Milchsäure-induzierte Zellschwellung von C6 Gliomzellen. Sowohl die Schwellungskinetik als auch das Ausmaß der Volumenantwort wiesen keinerlei signifikante Unterschiede auf. In vorhergehenden Arbeiten ist zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von C6 Gliomzellen und primär kultivierten Astrozyten gezeigt worden (Staub et al., 1995).

Wie oben bereits ausgeführt, stellt die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters zur Regulation der intrazellulären Azidose eine zentrale Rolle bei der Milchsäure-induzierten Zellschwellung dar. Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter spielt, wie bereits erwähnt, bei der Hypothermie-induzierten Schwellung ebenfalls eine zentrale Rolle. Beide Schwellungs-Mechanismen – Hypothermie und Milchsäureazidose - münden trotz unterschiedlicher Initiatoren letztendlich in einer Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters, einer intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Akkumulation mit konsekutivem Wassereinstrom. Während in Milchsäureazidose die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters erwiesenermaßen durch eine intrazelluläre Azidose erfolgt (Ringel et al., 2000), bietet sich als naheliegendste Erklärung für die Aktivierung in Hypothermie eine Verschiebung der Aktivitätskurve des Transporters in den alkalischen Bereich an. Dieser Mechanismus ist am Froschmuskel belegt worden (Marjanovic et al. 1998). Die Konstellation zweier unterschiedlicher Aktivierungs-Mechanismen führt letztendlich zu der Frage, weshalb Hypothermie die Milchsäure-induzierte Schwellung nicht beeinflusst. Eine Ursache besteht wohl in der Tatsache, dass in beiden Fällen der selbe Transportmechanismus, der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, die ursächliche  $\text{Na}^+$ -Akkumulation verursacht.

#### 4.5.2 Arachidonsäure

Arachidonsäure führt zur zytotoxischen Schwellung von Gliazellen. Dies ist an Hirnschnitten und isolierten Astrozyten gezeigt worden (Chan et al., 1978, Staub et al., 1994). Bezüglich der Mechanismen, über die Arachidonsäure zum Zellödem führt, herrscht, vereinfacht dargestellt, derzeit folgendes Konzept: Arachidonsäure gelangt durch Diffusion in den Intrazellularraum. Als Folge der Hemmung der Atmungskette durch Arachidonsäure kommt es zur Aktivierung der Glykolyse und einer intrazellulären Azidose.

Der eigentlich zur Zellschwellung führende Vorgang ist jedoch die Akkumulation von Natrium- und Chlorid-Ionen durch Erhöhung der Membranpermeabilität für Natrium-Ionen sowie die Aktivierung von Natrium-abhängigen Prozessen zur Kompensation der intrazellulären Azidose (Staub et al., 1994). Auch hier ist die Vergleichbarkeit von Ausmaß und Kinetik der Volumenzunahme bei Astrozyten unter Arachidonsäureexposition bereits in einer Arbeit aus unserem Labor gezeigt worden (Staub et al., 1994). Basierend auf den nahezu identischen

Ergebnissen in Normo- und Hypothermie, ist davon auszugehen, daß milde Hypothermie keinen Effekt auf die Arachidonsäure-induzierte Schwellung von Gliazellen hat. Die Ergebnisse einer neueren *in vivo* Arbeit weisen darauf hin, daß Hypothermie auch keinen Einfluß auf die Konzentration der anfallenden Arachidonsäure nach Reperfusion hat (Kubota et al., 1998). Es konnte in dieser Publikation jedoch gezeigt werden, daß in Hypothermie der Arachidonsäure-Metabolismus supprimiert wird, was eine geringere Produktion der ebenfalls zellschädigenden Arachidonsäure-Metabolite wie freie Radikale und Eikosanoide zur Folge hat.

#### 4.5.3 Glutamat

Der Vorgang der zellulären Schwellung von Astrozyten durch Glutamat ist gut untersucht und beruht auf der Aufnahme von Glutamat zusammen mit Natrium-Ionen aus dem Medium (Kempinski et al., 1992). Dieser Mechanismus wird nicht als pathologisch gewertet, da die Clearance des Extrazellularraums von Glutamat eine physiologische Funktion von Astrozyten darstellt (Schneider et al., 1992). Erst wenn die Zellen so viel Glutamat aufgenommen haben, daß sie das damit aufgenommene Natrium nicht mehr aus der Zelle eliminieren können, kommt es zur Zellschwellung. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, bleibt die Reaktion auf eine pathologisch erhöhte Glutamatkonzentration im Extrazellularraum völlig unbeeinflusst von einer Temperaturniedrigung auf 32°C. Somit hat in Bezug auf den Glutamat-induzierten Schwellungsmechanismus milde Hypothermie keinen therapeutischen Effekt aufweisen können.

Interessant hierzu sind jedoch die Daten aus einer klinischen Studie. Hier wiesen Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, die mit Hypothermie behandelt wurden und eine gute Erholung zeigten, eine zur Vergleichsgruppe signifikant niedrigere Glutamat-Konzentration im Liquor auf (Marion et al., 1997). Untersuchungen zur zerebralen Ischämie *in vivo* bestätigen, daß bei 32°C eine geringere Freisetzung von Glutamat und eine Verringerung des zytotoxischen Ödems festzustellen sind (Fujisawa et al., 1999). Demzufolge könnte ein Teil der neuroprotektiven Wirkung der Hypothermie weniger auf den Einfluß der Temperatur auf die Glutamat-induzierten Schwellung als auf eine reduzierte Freisetzung und Aufnahme von Glutamat zurückzuführen sein (Anderson CM, Swanson RA 2000).

## 4.6 Schwellung der Gliazellen in Hyperthermie

Eine gefürchtete Komplikation beim ischämisch/traumatischen Hirnschaden stellt die spontane oder im Rahmen einer bakteriellen Infektion ablaufende, reaktive Hyperthermie (39-40°C) dar. Neben den negativen Effekten auf Überlebensrate und Langzeitergebnisse konnten in

verschiedenen experimentellen Modellen zahlreiche morphologische Veränderungen im Hirnparenchym beschrieben werden. Dazu gehören die Vergrößerung des Infarkt- bzw. Kontusionsvolumens, der beschleunigte Untergang der Penumbra, eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und eine abnormale Schwellung der Axone (Corbett D & Thornhill J 2000, Dietrich et al., 1996, Wijsman JA & Shivers RR 1993, Reglodi et al., 2000).

Unsere Untersuchungen sollten zeigen, ob der negative Effekt von Hyperthermie im Zusammenhang mit Volumenänderungen der Gliazellen steht. Interessanterweise zeigten die Gliazellen nach Temperaturerhöhung auf 40°C eine signifikante Zellschwellung. Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch auf zwei wesentliche Unterschiede der Volumenzunahme in Hypo- und Hyperthermie hin. In Hypothermie kommt es nach rascher Volumenzunahme zum Erreichen eines temperaturabhängigen Plateaus und zur teilweisen Erholung nach Temperaturnormalisierung. Anders in Hyperthermie, wo der Prozeß der Zellschwellung langsam und kontinuierlich zunimmt und nach Temperaturnormalisierung völlig unbeeinflusst fortschreitet. Dies deutet darauf hin, dass diesen Prozessen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Einen Erklärungsansatz bietet die in Hyperthermie beschleunigte Degeneration von zytoskeletalen Proteinen wie Spektrin und MAP-2 (Morimoto et al., 1997). Der fortschreitende Abbau von Elementen des Zytoskeletts führt zum Integritätsverlust der Zellarchitektur und zunehmender Instabilität was letztendlich den Zelltod zur Folge hat. Sowohl die beobachtete Schwellungskinetik als auch die fehlende Volumenerholung und die deutlich schlechtere Vitalität (70% im Vergleich zu 90% bei 32°C) am Ende der Hyperthermieexperimente lassen sich mit diesem Mechanismus in Übereinstimmung bringen.

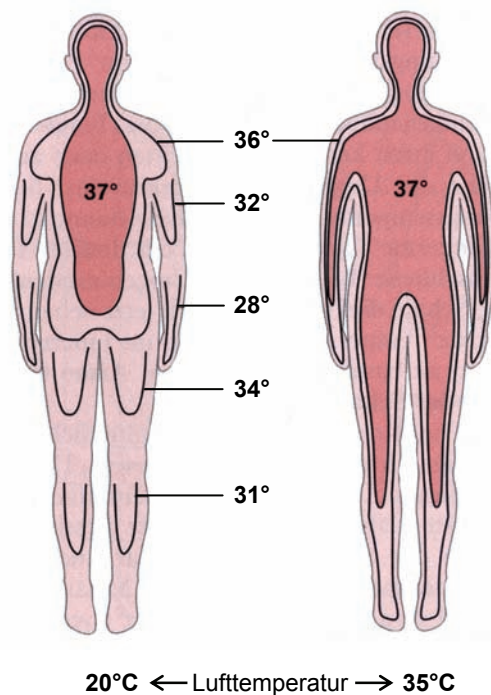
Die dargelegten, signifikanten Unterschiede von Schwellungskinetik, Volumenerholung und Vitalität in Hyperthermie legen unterschiedliche Schwellungsmechanismen nahe. Weitere Experimente könnten zur eindeutigen Klärung beitragen, insbesondere da aktuell keine weiterführenden Arbeiten zu den Schwellungsmechanismen in Hyperthermie vorliegen.

#### **4.7 Hypothermie-Effekte auf humane, neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und treten nach erfolgter Differenzierung in den Blutkreislauf über. Sie sind 10-15µm groß und machen 45-80% der Gesamtleukozyten aus. Im Blutkreislauf sind neutrophile Granulozyten für die unspezifische Phagozytose von Bakterien, Pilzen und Viren zuständig. Das Umgebungsmilieu von Granulozyten, die im Blut zirkulieren, weist im Vergleich zu dem von Gliazellen im Gehirn mehrere prägnante Unterschiede auf. So steht Granulozyten im Vergleich zu Gliazellen ein nahezu



unbegrenzter Expansionsraum zur Verfügung. Auch hinsichtlich der Umgebungstemperatur lassen sich zwischen Granulozyten und Astrozyten große Unterschiede registrieren. Die Umgebung der Granulozyten, das Blut, ist gleichzeitig das Medium, über den zum Teil die Wärmeregulation des Organismus erfolgt. Die Wärmeproduktion erfolgt vornehmlich im Körperkern, wo sich stoffwechselintensive Organe wie Leber und Darm befinden, die unter Ruhebedingungen ca. 70% der gesamten Körperwärme erzeugen (Aschoff et al., 1971). Dementsprechend sind im Organismus zirkulierende Blutzellen bei der Passage von Körperkern und -peripherie einer ständigen Änderung der Umgebungstemperatur ausgesetzt. Zum Körperkern werden Gehirn und das Innere des Rumpfes gezählt. Nur der Kern ist im eigentlichen Sinne homoiotherm, das heißt innerhalb enger Grenzen auf einen nahezu konstanten Temperaturwert reguliert. Dabei können schon bei einer relativ geringen Kältebelastung von 20°C die Temperaturfelder zwischen Kern (37°C) und Schale (28-31°C) beträchtliche Unterschiede aufweisen (Abb. 21) (Aschoff et al., 1971). Demnach sind Blutzellen, im Gegensatz zu Zellen des Gehirns, generell Temperaturveränderungen ausgesetzt. Es ist somit naheliegend, daß Zellen, die unter physiologischen Bedingungen kontinuierlichen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, über andere Regulationsmechanismen, z.B. auch bezüglich des Zellvolumens verfügen. Unsere Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß humane, neutrophile Granulozyten in milder Hypothermie keinerlei Volumenänderung aufweisen. Zahlreiche Arbeiten, die sich mit hypo- oder hyperosmotischem Stress beschäftigt haben, konnten belegen, daß Granulozyten aber durchaus - wie alle anderen Säugetierzellen - über Mechanismen der Volumenregulation verfügen (Krause et al., 1990; Simchowicz et al., 1993). Durch den Vergleich zwischen Granulozyten und Astrozyten konnten wir zeigen, daß die Hypothermie-induzierte Zellschwellung kein allgemeingültiger zellphysiologischer Vorgang ist, sondern offensichtlich nur bei bestimmten Zellpopulationen, z.B. Astrozyten, vorhanden ist.



**Abb. 21: Temperaturverteilung im Körper des Menschen**

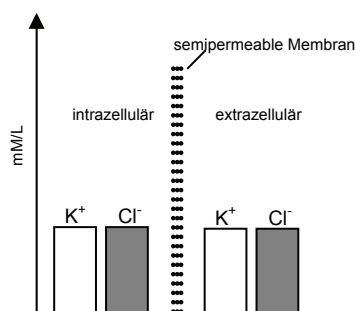
Nur der Körperkern, zu dem auch das Gehirn gehört, bleibt bei Änderungen der Umgebungstemperatur in einem konstanten Temperaturbereich von 37°C. Unter Kältebelastung bilden sich in den peripheren Schichten radiale und axiale, zum Teil erhebliche Temperaturgradienten aus (nach Aschoff et al., 1971).

#### 4.8 Grundzüge der Volumenregulation der eukaryoten Zelle

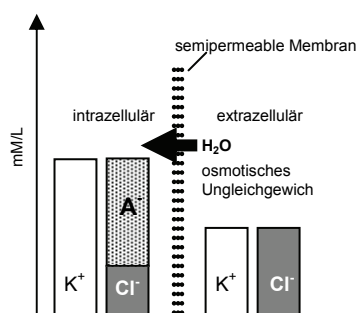
Die Aufrechterhaltung des physiologischen Zellvolumens zählt zu den wesentlichen Voraussetzungen für Funktion und Vitalität der Zelle (Macknight et al., 1987). Unter physiologischen Bedingungen wird daher das Zellvolumen innerhalb enger Grenzen konstant gehalten.

Das Volumen der Säugetierzelle wird von der intrazellulären Konzentration osmotisch aktiver Solute und der Wasserverteilung über die semipermeable Zellmembran bestimmt. Schon 1924 versuchte F.G. Donnan eine schrittweise Erklärung für die Verteilung der Ionen im intra- und extrazellulären Raum. Seine Theorie der Membrangleichgewichte beruhte auf Experimenten mit künstlichen semipermeablen Membranen. Diese Membranen besaßen wie die Zellmembran eine gewisse Permeabilität für  $K^+$  und  $Cl^-$ -Ionen. Durch Diffusion stellte sich deshalb nach einiger Zeit immer eine elektroneutrale Gleichverteilung der Ionen auf beiden Seiten der Membran ein. Im Inneren der Zelle befinden sich neben frei permeablen Kationen und Anionen große, negativ geladene Proteine, die nicht die Zellmembran überwinden können. Um weiterhin elektrische

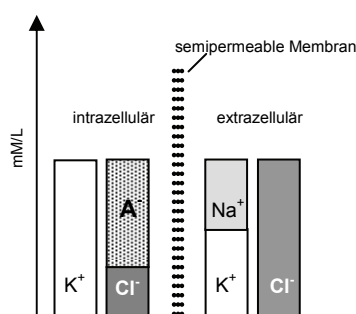
Neutralität zu gewährleisten kommt es zu einer Umverteilung der Kationen zugunsten des Kompartimentes mit der höheren Konzentration an negativ geladenen Proteinen, die intrazelluläre  $K^+$ -Konzentration steigt an. Umgekehrt steigt extrazellulär die Konzentration von Anionen (Abb. 21). Dies sind im Wesentlichen die Grundzüge der passiven Ionenverteilung.



*Verteilung eines Ionenpaars ( $K^+$  und  $Cl^-$ ), für das die Membran permeable ist.*



*Nach der Addition eines großen Anions [A] in ein Kompartiment, das die Membran nicht durchdringen kann, muss dort die Elektroneutralität durch eine Erhöhung der  $[K^+]$  hergestellt werden.*



*Der so entstehende  $[K^+]$ -Gradient wird durch einen gegenläufigen  $[Cl^-]$  Gradienten gleichen Betrags ausgeglichen.*

### **Abb. 21: Grundzüge der extra- und intrazellulären Ionenverteilung, modifiziert nach Donnan**

Die passive Verteilung intra- und extrazellulärer Ionen wird jedoch durch eine Reihe verschiedenster zellulärer Prozesse, wie Änderungen des Membranpotentials oder Nutzung des extrazellulären  $Na^+$ -Gradienten für Transportprozesse gegen den Konzentrationsgradienten, verändert (Hallows KR & Knauf PA, 1994). Um dies oder Veränderungen des Umgebungsmilieus zu kompensieren, verfügt die Zelle über vielerlei aktive Transport-Mechanismen wie beispielsweise die  $Na^+/K^+$ -ATPase, den  $Na^+/H^+$ -Antiporter und den  $Na^+/K^+/Cl^-$ -Kotransporter (Hoffmann EK & Simonsen LO, 1989, Sarkadi B & Parker JC, 1991).

## 4.9 Konzept der Hypothermie-induzierten Schwellung von Gliazellen

Um bei grundlegenden Funktionen wie der zellulären Volumenkontrolle nicht allein von den Konzentrationsverhältnissen der Ionen abhängig zu sein, verfügt die Zelle über eine Reihe von Membrantransportern und Kanälen, die unabhängig von der Energie des Natrium-Gradienten sind. Auf diesen Gegebenheiten basierend bieten sich für die Hypothermie-induzierte Zellschwellung zwei Erklärungen an. Zum einen kann die Schwellung das Resultat einer direkt gehemmten Ausscheidung oder zum anderen einer indirekt aktivierten Aufnahme von Ionen sein. Ein naheliegendes Beispiel für die gehemmte Ausscheidung stellt die bereits erwähnte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dar, eine indirekt aktivierte Aufnahme von Ionen könnte beispielsweise über den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter erfolgen.

Die Versuche in Natrium-freiem Medium haben gezeigt, daß Natrium-Ionen primär an der Hypothermie-induzierten Schwellung beteiligt sind (Abb. 14). Diese Beobachtung wird gestützt von früheren Arbeiten von Senft, Dipolo und Latorre, die den Einfluß von Hypothermie auf das Membranpotential von Hummeraxonen (Senft JP, 1967) und Muskelfasern von Muschel (Dipolo R & Latorre R, 1972) untersucht haben. Da die Produktion von ATP als Energielieferant für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Hypothermie supprimiert ist (Singer D & Bretschneider HJ, 1990), vermutete man eine Beteiligung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase an der Hypothermie-induzierten Schwellung. Dabei herrschte die Vorstellung, daß Natrium-Ionen, die entlang des Konzentrations-Gradienten in die Zelle strömen, von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nicht effektiv aus dem Zellinneren eliminiert werden würden. Das wiederum hätte die Akkumulation von Natrium-Ionen und den Verlust des Membranpotentials zur Folge. Dieser Erklärungsansatz konnte durch Experimente mit dem Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Strophantidin widerlegt werden. Strophantidin, das den inhibierenden Effekt von Hypothermie auf die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase imitiert, hatte keinerlei Einfluß auf das Membranpotential, weder unter Ruhebedingungen bei 37°C, noch in Hypothermie. Dasselbe gilt für Astrozyten. Die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Ouabain führte zu keiner Änderung des Zellvolumens, was darauf hinwies, daß es intrazellulär nicht zu einer Nettoakkumulation osmotisch aktiver Ionen kam. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß Ouabain bei Gliazellen zwar zu einer intrazellulären Akkumulation von Natrium-Ionen führte, was aber von einem Ausstrom von Kalium-Ionen im Verhältnis 1 : 1 ausgeglichen wurde (Kempski et al., 1983).

Dieser Einstrom von Natrium-Ionen ist auf den unterschiedlichen Effekt, den Hypothermie auf die Natrium- und Kaliumpermeabilität der Zelle hat, zurückzuführen. Interessanterweise nimmt dieser Effekt mit abnehmender Temperatur zu. Bei 13°C übersteigt beispielsweise der Natrium-Einstrom

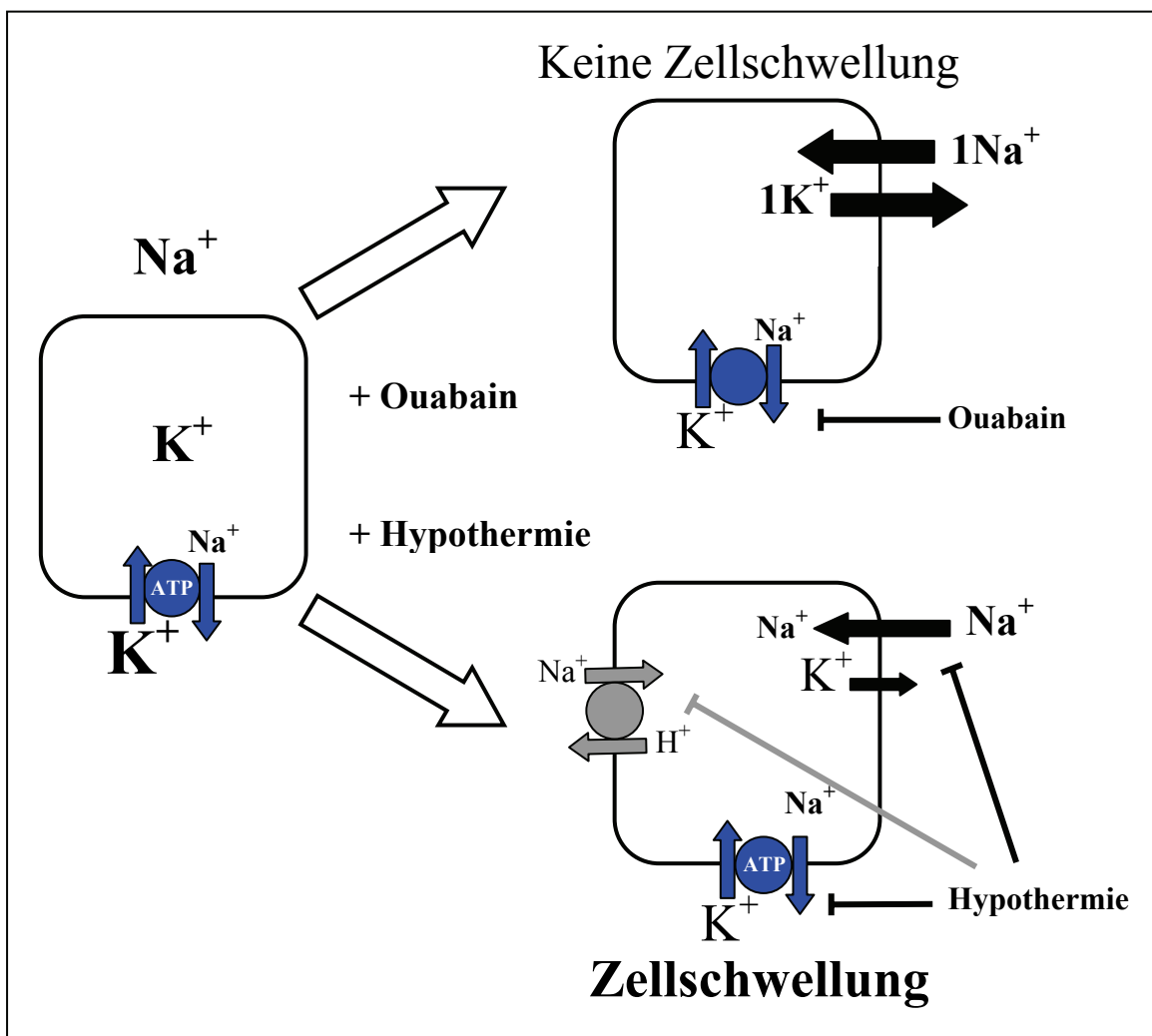
den Kalium-Ausstrom um den Faktor 2.6 (Dipolo R & Latorre R, 1972). Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte die Hypothermie-induzierte Gliaschwellung auf den differentiellen Einfluß passiver Natrium- und Kaliumströme über die Zellmembran zurückgeführt werden. Dieser Unterschied der Membranpermeabilität in Hypothermie erklärt auch, weshalb die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Hypothermie oder Ouabain keinen Effekt auf das Zellvolumen oder das Membranpotential hat. Die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt bei  $37^\circ\text{C}$  zu einem Einstrom von Natrium-Ionen und einem Ausstrom von Kalium-Ionen im Verhältnis 1:1. In Hypothermie, die die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ebenfalls hemmt, werden Natrium und Kalium-Ionen nicht mehr im Verhältnis 1:1 ausgetauscht, sondern das Verhältnis ist zu Gunsten des Einstroms von Natrium-Ionen verschoben. Das Ergebnis ist ein Netto-Einstrom von Natrium-Ionen, was die Membrandepolarisation und Zellschwellung zur Folge hat.

Hypothermie könnte ebenso einen Effekt auf die volumenregulatorischen Membrantransporter haben. Dazu gehören der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (Rotin D & Grinstein S, 1989), der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (Hallows KR & Knauf PA, 1994), der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (Tas et al. 1987) und der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter (Kimelberg et al. 1979). Die signifikante Reduktion der Hypothermie-induzierten Schwellung nach Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporters deuten auf eine Beteiligung dieses Transporters hin. Die naheliegendste Erklärung für die von uns gezeigte Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter besteht darin, daß die Aktivitätskurve des Transporters in Hypothermie in den alkalischen Bereich verschoben ist, wie bereits am Froschmuskel belegt (Marjanovic et al. 1998). Das Resultat besteht darin, daß der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter bereits bei physiologischem pH aktiv wird und so zur Alkalisierung des Zytoplasmas und Akkumulation von Natrium-Ionen führt. Auf diese Weise ließen sich sowohl die intrazelluläre Alkalisierung als auch die Zellschwellung in Hypothermie erklären. Zudem wäre die Hypothermie-induzierte Verschiebung des Aktivierungsniveaus ein sich selbst limitierender Prozess, da eine zunehmende Alkalisierung wiederum zur Hemmung des Transporters führt.

Interessanterweise scheint die Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter erst in einer recht späten Phase der Hypothermie-induzierten Schwellung einzusetzen (Abb. 16). Die Mechanismen, die dieser Beobachtung zu Grunde liegen, sind bisher nicht eindeutig identifiziert. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, daß die beiden beschriebenen Mechanismen bei der Hypothermie-induzierten Volumenreaktion zwar parallel ablaufen, jedoch zeitlich und quantitativ unterschiedliche Anteile am Schwellungsprozess haben. Dies würde erklären, weshalb die Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter nur einen Teil der Hypothermie-induzierten Schwellung verhindert hat. Möglicherweise wird der Transporter in Hypothermie durch die Veränderung der Protein-Konfiguration (Marjanovic et al., 1998) nur verzögert aktiviert. Auf diese Weise würde

---

bei diesen Experimenten nur der erste, sofort aktivierte Teil der Volumenreaktion sichtbar (Abb. 16).



**Abb. 22: Konzept der Hypothermie-induzierten Schwellung von Gliazellen**

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wird sowohl von Ouabain als auch von Hypothermie gehemmt. Ouabain hat keinen Einfluß auf Zellvolumen oder Membranpotential, da der nachfolgende  $\text{Na}^+$ -Einstrom und  $\text{K}^+$ -Ausstrom im Verhältnis 1:1 stehen. Hypothermie verändert dieses Verhältnis zu Gunsten des  $\text{Na}^+$ -Einstroms. Die sich daraus ergebende intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Akkumulation führt zur Zellschwellung. Zusätzlich wird der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aktiviert, was den  $\text{Na}^+$ -Einstrom zusätzlich erhöht.

#### 4.10 Zusammenfassung und Ausblick

Im Hinblick auf das zytotoxische Hirnödem hat milde Hypothermie keinen Einfluß auf die Schwellung von Gliazellen während Milchsäure-, Arachidonsäure- oder Glutamataexposition.

Milde Hypothermie verursacht allerdings unter physiologischen Bedingungen eine „dosisabhängige“ Schwellung von Säugetierzellen, was nach unserem Kenntnisstand zum ersten Mal in dieser Arbeit exemplarisch an Gliazellen der Ratte gezeigt worden ist. Wie unsere Versuche mit Granulozyten gezeigt haben, scheint dieser Effekt nicht bei allen Säugetierzellen aufzutreten.

Auf den vorliegenden Ergebnissen basierend, favorisieren wir zwei Mechanismen, die der Hypothermie-induzierten Schwellung zugrunde liegen: (1) Zum einen die unterschiedlichen Effekte, die Hypothermie auf die Natrium- und Kalium-Permeabilität der Zellmembran hat, zum anderen (2) die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters über eine Verschiebung der Aktivierungskurve in den alkalischen Bereich.

Diese Erkenntnisse wurden an suspendierten Zellen *in vitro* gewonnen. Ziel weiterer Untersuchungen wird es sein, die Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* zu klären. Es muß geklärt werden, ob die Beobachtung im Zellverband reproduzierbar und Hypothermie mit einer relevanten Abnahme des Intrazellularraumes *in vivo* verbunden ist. Einen ganz besonderen Stellenwert haben die Untersuchungen im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von Hypothermie bei Patienten mit zerebraler Ischämie oder Schädel-Hirn-Trauma. Die nicht betroffenen, gesunden Zellen könnten die oben gezeigten Volumeneffekte zeigen und so den erhofften positiven Effekt auf den intrakraniellen Druckanstieg zunichte machen.



---

Abercrombie RF, Putnam RW und Roos A :

The intracellular pH of frog skeletal muscle: its regulation in isotonic solutions.

J Physiol 1983, 12175-187

Abrahamse SL, Vis A, Bindels RJ, van Os CH:

Regulation of intracellular pH in crypt cells from rabbit distal colon.

Am J Physiol. 1994; 267:409-415.

Aickin CC, Thomas RC:

Micro-electrode measurement of the intracellular pH and buffering power of mouse soleus muscle fibres.

J Physiol 1977, 267:791-810

Amorino GP, Fox MH:

Effects of hyperthermia on intracellular chloride.

J Membrane Biol. 1996, 152:217-222

Anderson CM, Swanson RA :

Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions.

Glia 2000, 32:1-14.

Anderson S, Brismar T, Hansson E:

Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids.

J Neurosci. 1993, 13:2638-2650

Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW:

Autoradiographic study of proliferating brain cells in culture.

Dev Biol. 1980, 75:268-277

Arai H, Uto A, Ogawa Y und Sato K :

Effect of low temperature on glutamate-induced intracellular calcium accumulation and cell death in cultured hippocampal neurons.

Neurosci Lett 1993, 163:132-134

Aschoff J, Günther B und Kramer K :

Energiehaushalt und Temperaturregulation.  
Urban & Schwarzenberg, München 1971

Astrup J, Siesjö BK und Symon L:

Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra.  
Stroke 1981, 12:723-7255

Astrup J, Symon L, Branston NM und Lassen NA:

Cortical evoked potential and extracellular  $K^+$  and  $H^+$  at critical levels of brain ischemia.  
Stroke 1977, 8:51-57

Baena RC, Busto R, Dietrich WD, Globus MY und Ginsberg MD:

Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia.  
Neurology 1997, 48:768-73

Baethmann A:

Brain edema due to mechanical, circulatory, osmotic, metabolic and toxic causes.  
Klin Anasthesiol Intensivther 1979, 19:56-75

Baethmann A, Kempfski OS:

Pathophysiologie des Hirnödems  
Zentralbl Neurochir 1997, 58:20-39

Baethmann A, Jantzen JP, Piek J, Prange H und Unterberg A:

[Physiology and pathophysiology of intracranial pressure]  
Zentralbl Neurochir 1997, 58:29-31

Baethmann A, Maier Hauff K, Schürer L, Lange M, Guggenbichler C, Vogt W, Jakob K und Kempfski O:

Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema.  
J Neurosurg 1989, 70:578-591

Baethmann A, Van Harreveld A:

Water and electrolyte distribution in gray matter rendered edematous with a metabolic inhibitor.

---

J Neuropathol Exp Neurol 1973, 32:408-423

Bailey CP, Cookson BA, Downing DF:

Cardiac surgery under hypothermia

J Thorac Surg 1954, 27:73-95

Baker GF, Baker P:

Temperature dependence of the exchange of monovalent anions in human red blood cells.

Biochim Biophys Acta 1996, 1285:192-202

Barnes D, Sato G:

Serum-free cell culture: a unifying approach.

Cell 1980, 22:649-655

Baum HM, Robins M:

Survival and Prevalence.

Stroke 12: Suppl.1, 59-68, 1981.

Bell TE, Kongable GL, Steinberg GK:

Mild hypothermia: an alternative to deep hypothermia for achieving neuroprotection.

J Cardiovasc Nurs 1998, 13:34-44

Benda P, Lighbody J, Sato G, Levine L und Sweet W:

Differentiated rat glial cell strain in tissue culture

Science (Wash. DC) 1968, 161:370-371

Bigelow WG, Lindsay WK und Greenwood WF :

Hypothermia. Its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures.

Ann Surg 1950, 132:849-866

Bignami A, Dahl D:

"Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture.

Science. 1980, 208:179-181

---

Bissell MG, Rubinstein LJ, Bignami A, Herman MM:

Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis.

Brain Res. 1974, 82:77-89

Bissell MG, Rubinstein LJ, Bignami A, Herman MM:

Glial fibrillary acidic protein-solubility characteristics, relation to cell growth phases and cellular localization in rat C-6 glioma cells: an immunoradiometric and immunohistologic study.

J Neurochem. 1978, 30:1181-1186

Blair E:

Clinical Hypothermia.

Mc-Graw-Hill: New York

Boerema I, Wildschut A, Schmidt WJH und Broekhuysen L:

Experimental researches into hypothermia as aid in surgery of heart; preliminary communication.

Arch Chir Neerl 1951, 3:25-34

Bonita R, Beaglehole R, Asplund K:

The worldwide problem of stroke.

Curr Opin Neurol 1994; 7:5-10

Boyarsky G, Ransom B, Schlue WR, Davis MB und Boron WF:

Intracellular pH regulation in single cultured astrocytes from rat forebrain.

Glia 1993, 8:241-248

Boyum A:

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.

Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968, 97:77-89

Brendel W, Reulen HJ, Aigner P und Meßmer K:

Elektrolytveränderungen in tiefer Hypothermie. IV. Die Kälteschwellung des Gehirns beim Winterschläfer.

Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere 1966, 292:83-99

Brune T, Fetzer S, Backus KH, Deitmer JW:

Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes.

J Cell Physiol. 1986; 128:209-215

Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM und Adams JH:

Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 1991, 54:427-434

Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P und Ginsberg MD:

Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury.

J Cereb Blood Flow Metab 1987, 7:729-738

Busto R, Dietrich WD, Globus MY und Ginsberg MD:

Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury.

Neurosci Lett 1989, 101:299-304

Carroll M, Beek O:

Protection against hippocampal CA1 cell loss by post-ischemic hypothermia is dependent on delay of initiation and duration.

Metab Brain Dis 1992, 7:45-50

Chan PH:

Role of oxidants in ischemic brain damage.

Stroke 1996, 27:1124-1129

Chassande O, Frelin C, Farahifar D, Jean T, Lazdunski M:

The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport in C6 glioma cells. Properties and role in volume regulation.

Eur J Biochem. 1988, 171:425-433

Chassande O, Frelin C, Farahifar D, Jean T, Lazdunski M:

Mechanisms of hypoosmotic volume regulation in glioma cells.

Brain Res. 1994, 667:263-268

Clark RS, Kochanek PM, Marion DW, Schiding JK, White M, Palmer AM und DeKosky ST: Mild

posttraumatic hypothermia reduces mortality after severe controlled cortical impact in rats.

J Cereb Blood Flow Metab 1996, 16:253-261

Clark JD, Limbird LE:

Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger subtypes: a predictive review.

Am J Physiol. 1991; 26:945-953

---

Clifton GL:

Systemic hypothermia in treatment of severe brain injury: a review and update.

J Neurotrauma 1995, 12:923-927

Clifton GL, Allen S, Barrodale P, Plenger P, Berry J. Koch SM, Fletcher J. Hayes RL und Choi SC:

A phase II study of moderate hypothermia in severe brain injury.

J Neurotrauma 1993, 10:263-271

Clifton GL, Allen S, Berry J. and Koch SM:

Systemic hypothermia in treatment of brain injury.

J Neurotrauma 9 (Suppl 2), 1992:487-495

Clifton GL, Jiang JY, Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ und Hayes RL:

Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury.

J Cereb Blood Flow Metab 1991, 11:114-121

Coimbra C, Wieloch T:

Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia.

Acta Neuropathol (Berl) 1994, 87:325-331

Corbett D, Hamilton M und Colbourne F:

Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion.

Exp Neurol 2000, 163:200-206

Corbett D, Thornhill J:

Temperature modulation (hypothermic and hyperthermic conditions) and its influence on histological and behavioral outcomes following cerebral ischemia.

---

Brain Pathol 2000, 10:145-152

Davies DL, Vernadakis A:

Glutamate uptake and metabolism in C-6 glioma cells: alterations by potassium ion and dibutyryl cAMP.

J Neurochem. 1983, 41:179-187

Demaurex N, Grinstein S:

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation.

J exp Biol 1994, 196: 389-404

Dietrich WD, Alonso O, Halley M und Busto R:

Delayed posttraumatic brain hyperthermia worsens outcome after fluid percussion brain injury: a light and electron microscopic study in rats.

Neurosurgery 1996, 38:533-541

Dipolo R, Latorre R:

Effect of temperature on membrane potential and ionic fluxes in intact and dialysed barnacle muscle fibres.

J Physiol 1972, 225:255-273

Dietrich DW, Alonso O, Halley M und Busto R:

Delayed posttraumatic brain hyperthermia worsens outcome after fluid percussion brain injury: A light and electron microscopic study in rats.

Neurosurgery 1996, 38:533-541

Drake CG, Jory TA:



---

Hypothermia in the treatment of critical head injury.

Can Med Assoc., 1962, 87:887-891

Drejer J, Larsson OM, Schousboe A:

Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake into astrocytes by pentobarbital.

Can J Physiol Pharmacol. 1978, 6:1083-1087

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A und Gerstl B:

An acidic protein isolated from fibrous astrocytes.

Brain Res 1971, 28:351-354

Erecinska M, Deas J, Silver IA:

Immunofluorescence staining of astrocytes in vitro using antiserum to glial fibrillary acidic protein.

Brain Res. 1975, 89: 363-367

Erecinska M, Troeger MB, Alston TA:

Amino acid neurotransmitters in the CNS: properties of diaminobutyric acid transport.

Neurochem. 1986; 46:1452-1457

Erecinska M, Silver IA:

The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport in C6 glioma cells. Properties and role in volume regulation.

Eur J Biochem. 1988, 171:425-433

Eriksson PS, Nilsson M, Wagberg M, Ronnback L und Hansson E:

Volume regulation of single astroglial cells in primary culture.

Neurosci Lett 1992, 143:195-199

Eriskat J, Stoffel M, Plesnila N, Rinecker M, Baethmann A:

---

Interstitial lactate in the peritraumatic penumbra of rat brain.

Acta Neurochir Suppl 2000, 76:353-365

Fay T:

Observations on generalized refrigeration in cases of severe head trauma.

Assoc Res Nerv Ment Dis Proc 1943, 24:611-619

Field JH :

Epidemiology of Head Injuries in England and Wales. Department of Health and Social Security, London, 1996

Frangakis MV, Kimmelberg HK:

Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures.

Neurochem Res 1984, 9:1689-1698

Fujisawa H, Koizumi H, Ito H, Yamashita K, Maekawa T:

Effects of mild hypothermia on the cortical release of excitatory amino acids and nitric oxide synthesis following hypoxia.

J Neurotrauma 1999, 16:1083-1093

Gennarelli TA:

Animal models of human head injury.

J Neurotrauma 1994, 11:357-368

Gerschenfeld HM, Wald F, Zadunalsky JA und De Robertis ED:

Functional of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system: An electronmicroscope study.

---

Neurology 1959, 9:412-424.

Gesundheitsbericht für Deutschland.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes/Statistisches Bundesamt.

Metzler-Poeschel, Stuttgart, 1998.

Ginsberg MD, Sternau L, Globus MYT, Dietrich WD und Busto R:

Therapeutic modulations of brain temperature: relevance to ischemic brain injury.

Cereb and Brain Metab Reviews 1992, 4:189-225

Ginsberg MD, Pulsinelli WA:

The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke.

Ann Neurol 1994, 36:553-554

Graham SH, Chen J:

Programmed cell death in cerebral ischemia.

J Cereb Blood Flow Metab 2001, 21:99-109

Greger R, Schlatter E, Bleich M, Hirsch J:

Regulation of tubular transport via ion channels.

Clin Investig. 1993, 71:849-851; Physiologisches Institut, Albert-Ludwigs-Universität,

Freiburg.

Grinstein S, Cohen S und Rothstein A:

Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport.

J Gen Physiol 1984, 83:341-369

Grossman RG, Hampton T:

Mechanisms of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> changes induced by glutamate, kainate, and D-aspartate in rat hippocampal astrocytes.

J Neurosci. 1996, 16: 5393-5404

Grover NB, Naaman J, Ben-Sasson S und Doljanski F:

Electrical sizing of particles in suspensions. I. Theory.

Biophys J 1969, 9:1398-1414

Hallows KR, Knauf PA:

Principles of cell volume regulation. *In Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation.*

ed. Strange K 1994, S. 3-29. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.

Hansson E, Ronnback L, Lowenthal A, Noppe M, Alling C, Karlsson B, Sellstrom A:

Primary astroglial cultures. A biochemical and functional evaluation.

Neurochem Res. 1986, 11:759-767

Hansson E:

Glutamine synthetase and glutamyltransferase activities in the mouse astrocyte in vitro.

Neurochem Res. 1982, 8:905-910

Hendrick EB:

The use of hypothermia in severe head injuries in childhood.

Arch Surg 1959, 79:362-364

Hertz L, Sastry BR:

The regulation of intracellular pH in cultured astrocytes and neuroblastoma cells, and its dependence on extracellular pH in a HCO<sub>3</sub>-free solution.

Can J Physiol Pharmacol. 1992; 70:293-300

Hirano A, Zimmerman HM und Levine S:

Electron microscopic observations of peripheral myelin in a central nervous system lesion.

Acta Neuropathol (Berl) 1969, 12:348-365

Huang R, Shuaib A und Hertz L:

Glutamate uptake and glutamate content in primary cultures of mouse astrocytes during anoxia, substrate deprivation and simulated ischemia under normothermic and hypothermic conditions. Brain Res 1993, 618:346-351

Hoffmann EK, Simonsen LO:

Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells.

Physiol Rev 1989, 69:315-382

Hoffmann EK:

Depolarization of cortical glial cells during electrocortical activity.

Brain Res. 1968, 11:316-324

Hossmann KA:

Neurophysiological and morphological studies in hydremic brain edema of the cat.

Acta Neuropathol (Berl) 1968, Suppl 4:125

---

Jakubovicz DE, Grinstein S und Klip A:

Cell swelling following recovery from acidification in C6 glioma cells: an in vitro model of postischemic brain edema.

Brain Res 1987, 435:138-146

Jean T, Frelin C, Vigne P und Lazdunski M:

The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in glial cell lines. Properties and activation by an hyperosmotic shock.

Eur J Biochem 1986, 160:211-219

Jennett B:

Epidemiology of head injury.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 1996, 60:362-369

Jiang J, Yu M, Zhu C:

Effect of long-term mild hypothermia therapy in patients with severe traumatic brain injury: 1-year follow-up review of 87 cases.

J Neurosurg 2000, 93:546-549

Juurlink BH:

Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres.

J Neurochem. 1977, 6:999-1005

Kachel V:

Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument „Metricell“.

---

J Histochem Cytochem 1976, 24:211-230

Kachel V, Glossner E und Schneider H:

Advanced instrumentation for electrical cell sizing in flow.

Prog Clin Biol Res 1982, 102:83-93

Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH und Weinstein PR:

Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats.

J Neurosurg 1994, 80:112-119

Karibe H, Zarow GJ, Graham SH und Weinstein PR:

Mild intransischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats.

J Cereb Blood Flow Metab 1994, 14:620-627

Kawai N, Nakamura T, Nagao S:

Effects of brain hypothermia on brain edema formation after intracerebral hemorrhage in rats.

Acta Neurochir Suppl 2002, 81:233-245

Kempfski O, Chaussy L, Gross U, Zimmer M und Baethmann A:

Volume regulation and metabolism of suspended C6 glioma cells: an in vitro model to study cytotoxic brain edema.

Brain Res 1983, 279:217-228

Kempfski O, Otsuka H, Seiwert T, Heimann A:

Spreading depression induces permanent cell swelling under penumbra conditions.

Acta Neurochir Suppl 2000, 76:251-255

---

Kempski O, Staub F, von Rosen F, Zimmer M, Neu A und Baethmann A:

Molecular mechanisms of glial cell swelling in vitro.

Neurochem Pathol 1988, 9:109-25

Kempski O, Staub F, Schneider GH, Weigt H und Baethmann A:

Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high  $K^+$  concentrations or acidosis. Prog Brain Res 1992, 94:69-75

Kempski O, von Rosen S, Weigt H, Staub F, Peters J und Baethmann A:

Glial ion transport and volume control.

Ann N Y Acad Sci 1991, 633:306-317

Kimelberg HK:

Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations.

J Neurosurg 1995, 83:1051-1059

Kimelberg HK, Bowman C, Biddlecome S und Bourke RS:

Cation transport and membrane potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains.

Brain Res 1979, 177:533-550

Kimelberg HK, Ricard C:

Control of intracellular pH in primary astrocyte cultures by external  $Na^+$ .

Transactions of the American Society for Neurochemistry 1982, 13: 112

Kimelberg HK:



---

Cell swelling and volume regulation.

Can J Physiol Pharmacol. 1992, 70: 310-313

Kimelberg HK, Frangakis MV:

Evidence for electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in cultured rat cerebellar astrocytes.

Pflugers Arch. 1994; 429: 64-71

Kimelberg HK, Biddlecome S und Bourke RS:

SITS-inhibitable  $\text{Cl}^-$  transport and  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{H}^+$  production in primary astroglial cultures.

Brain Res 1979, 173:111-124

Klatzo I:

Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema.

J Neuropathol Exp Neurol 1967, 26:1-14

Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X und Bullock R:

Effects of mild hypothermia on cerebral blood flow-independent changes in cortical extracellular levels of amino acids following contusion trauma in the rat.

Brain Res 1997, 747:304-312

Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG und von Stockert TR:

A prospective community-based study of stroke in Germany-the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months.

Stroke 1998, 29:2501-2506

Krause KH, Welsh MJ:

---

Voltage-dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ion channels in human neutrophils.

J Clin Invest 1990, 85:491-498

Krump E, Nikitas K, Grinstein S:

Induction of tyrosine phosphorylation and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activation during shrinkage of human neutrophils.

J Biol Chem 1997, 272:17303-17311

Kubota M, Nakane M, Narita K, Nakagomi T, Tamura A, Hisaki H, Shimasaki H, Ueta N:

Mild hypothermia reduces the rate of metabolism of arachidonic acid following postischemic reperfusion.

Brain Res 1998, 779:297-300

Kukes G, De Vellis J, Elul R:

The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes.

J Neurochem. 1995, 65: 2765-2772

Langhorn P, Stott DJ, Robertson L, MacDonald j, Jones L, McAlpine C, Dick F, Taylor GS und Murray G:

Medical complications after stroke. A multicenter study.

Stroke 2000, 31:1223-1229

Lazorthes G, Campan L:

Moderate hypothermia in the treatment of head injuries.

Clin Neurosurg 1964, 12:293-299

Lehninger AL:

Prinzipien der Biochemie

Walter de Gruyter 1987, Berlin, New York

Lewis JF, Varco RL, Taufic M:

Repair of atrial septal defects in man under direct vision with the aid of hypothermia.

Surgery 1954, 36:538-552

Liao CL, Eng LF, Herman MM, Bensch KG:

The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein.

Exp Eye Res. 1979, 28:63-69

Lohr JW, Yohi L:

Isovolumetric regulation of rat glial cells during development and correction of hypo-osmolality.

Neurosci Lett 2000, 286:5-8

Lohr JW, Yohe LA:

A linked active transport system for  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in a glial cell line.

Brain Res. 1976, 104: 93-105

Macknight ADC:

Volume maintenance in isoosmotic conditions. In Current Topics in Membrane Transport. Cell Volume Control: Fundamental and Comparative Aspects in Animal Cells.

ed. Kleinzeller A, Academic Press, New York, 1987, 3-29

Mahnensmith RL, Aronson PS:

Interrelationships among quinidine, amiloride, and lithium as inhibitors of the renal  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger.

J Biol Chem 1985, 260:12586-12592

---

Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, Wisniewski SR, DeKosky ST:

Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia.

N Engl J Med 1997, 336:540-546

Marjanovic M, Elliott AC und Dawson MJ:

The temperature dependence of intracellular pH in isolated frog skeletal muscle: lessons concerning the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger.

Journal of Membrane Biology 1998, 161:215-225

Martin J, Meltzer H. Elliot D:

OPCS survey of disability in Great Britain Report I: the prevalence of disability among adults. Office of Population Censuses and surveys: Her Majesty's Stationary Office, London, 1988.

Max W, MacKenzie EJ, Rice DP:

Head injuries: costs and consequences,

J Head Trauma Rehab 1991, 6:76-91

Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK:

Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation.

Stroke 1998, 29:2171-2180

Mellergard PE, Ouyang YB, Siesjo BK.

Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain.

Brain Res. 1985, 36:125-134

---

Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK:

Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat.  
Exp Brain Res 1992, 89:67-78

Mendler N:

Electrolyte and metabolite changes in the brain of rats after cooling to 4-2 degrees C with a heat-lung machine.

Z Gesamte Exp Med 1968, 146:206-225

Meßmer K, Brendel W, Reulen HJ und Nordmann KJ:

Elektrolytveränderungen in tiefer Hypothermie. III. Beziehung zur biologischen Überlebenszeit bei künstlichem Kreislauf.

Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere 1966, 288:240-261

Metz C, Holzschuh M, Bein T, Woertgen C, Frey A, Frey I, Taeger K und Brawanski A:

Moderate hypothermia in patients with severe head injury: cerebral and extracerebral effects.

J Neurosurg. 1997, 86:911-914

Michenfelder JD, Uihlein A, Daw EF, Theye RA:

Moderate hypothermia in man: haemodynamic and metabolic effects.

Br J Anaesth 1965, 37:738-745

Michenfelder JD, Theye RA:

The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation.

Anesthesiology 1970, 33:430-439

Michenfelder JD, Milde JH:

Failure of prolonged hypocapnia, hypothermia, or hypertension to favorably alter acute stroke in primates.

Stroke 1977, 8:87-91

Mies G, Iijima T, Hossmann KA:

Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat.

Neuroreport 1993, 4:709-711

Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML und Siesjö BK:

The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage.

J Cereb Blood Flow Metab; May 1990, 10:365-374

Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY und Busto R:

The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat.

J Cereb Blood Flow Metab 1992, 12:380-389

Morimoto T, Ginsberg MD, Dietrich WD und Zhao W:

Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia.

Brain Res 1997, 746:43-51

Moroney JT, Bagiella E, Paik MC, Sacco RL, Desmond DW:

Risk factors for early recurrence after ischemic stroke: the role of stroke syndrome and subtype. Stroke 1998, 29:2118-2124

Mouritzen CV, Andersen MN:

Mechanisms of ventricular fibrillation during hypothermia. Relative changes in myocardial refractory period and conduction velocity.

J Thorac Cardiovasc Surg 1966, 51:5795-84

Nakajima Y, Fujimiya M, Maeda T und Mori A:

Morphological investigation of the neuroprotective effects of graded hypothermia after diverse periods of global cerebral ischemia in gerbils.

Brain Res 1997, 765:113-121

Nasmith PE, Grinstein S:

Impairment of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange underlies inhibitory effects of  $\text{Na}^+$ -free media on leukocyte function.

FEBS Lett 1986, 202:79-85

Nicklas WJ, Browning ET:

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. 1986, 369:193-202

Nilius B, Eggermont J, Voets T, Droogmans G.:

Volume-activated  $\text{Cl}^-$  channels.

Gen Pharmacol. 1996,27:1131-1140.

Oberleithner H:

Salz und Wasserhaushalte: Die Zelle und ihre Umgebung: vom Einzeller zum Vielzeller.

Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie, 1. Auflage;, Thieme 1994: 331-356

Olson JE, Sankar R, Holtzman D, James A, Fleischhacker D:

---

Anisotonic media and glutamate-induced ion transport and volume responses in primary astrocyte cultures.

J Physiol (Paris). 1987, 82: 294-303

Pappius HM:

The chemistry and fine structure in various types of cerebral edema.

Riv Patol Nerv Ment 1970, 91:311-322

Parker KK, Norenberg MD und Vernadakis A:

„Transdifferentiation“ of C6 glial cells in culture.

Science 1980, 208:179-181

Parker KK, Norenberg MD, Vernadakis A:

Glucocorticoid stimulation of glutamine synthetase production in cultured rat glioma cells.

J Neurochem. 1980, 34:866-872

Paul J:

Was ist eine Krebszelle?

Quintessenz 1975, 26:127-131

Pettmann B, Delaunoy JP, Courageot J, Devilliers G und Sensenbrenner M:

Rat brain glial cells in culture: effects of brain extracts on the development of oligodendroglia-like cells.

Dev Biol 1980, 75:278-287

Phillis JW, Estevez AY, Guyot LL und O'Regan MH:

5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-amiloride, an Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor, protects gerbil hippocampal neurons from ischemic injury.

Brain Res 1999, 839:199-202



---

Phillis JW, O'Regan MH und Song D:

5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-amiloride inhibits amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: role of  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange.

Brain Res 1998, 812:297-300

Pishak MR, Phillips AT:

Responses in astrocytic C6 glioma cells to ethanol and dibutyryl cyclic AMP.

Brain Res. 1986, 389:253-260

Plesnila N, Haberstock J, Peters J, Kölbl I, Baethmann A und Staub F:

Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes.

J Neurotrauma 1999, 16:831-841

Plesnila N, Müller E, Guretzki S, Ringel F und Baethmann A:

Effect of hypothermia on the volume of rat glial cells.

J Physiol 2000, 523:155-162

Prioleau GR, Fishman RA und Chan PH:

Induction of brain edema by fatty acids in vivo.

Trans Am Neurol Assoc 1979, 104:147-50

Ransom BR, Philbin DM Jr:

Anoxia-induced extracellular ionic changes in CNS white matter: the role of glial cells.

Can J Physiol Pharmacol 1992, 70:181-189

---

Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S und Arimura A:

Postischemic spontaneous hyperthermia and its effects in middle cerebral artery occlusion in the rat.

Exp Neurol 2000, 163:399-407

Rengachary SS, Wilkins KH:

Principles of Neurosurgery

Rengachary SS, Wilkins KH (eds), Mosby 1994

Renner EL, Lake JR, Cragoe EJ Jr und Scharschmidt BF:

Amiloride and amiloride analogs inhibit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -transporting ATPase and  $\text{Na}^+$ -coupled alanine transport in rat hepatocytes.

Biochim Biophys Acta 1988, 938:386-394

Ringel F, Chang RC, Staub F, Baethmann A und Plesnila N:

Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells.

J Neurochem 2000, 75:125-32

Ropper AH, Shafran B:

Brain edema after stroke. Clinical syndrome and intracranial pressure.

Arch Neurol 1984, 41:26-29

Rose CR, Ransom BR:

Effect of external  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Ba}^{2+}$  on membrane potential and ionic conductance in rat astrocytes.

Cell Mol Neurobiol. 1995, 15 439-450

---

Rosenberg HM, Shank BB und Gregg EC:

Volume changes of mammalian cells subjected to hypotonic solutions in vitro: evidence for the requirement of a sodium pump for the shrinking phase.

J Cell Physiol 1972, 80:23-32

Rosomoff HL:

Hypothermia and cerebral vascular lesions. I. Experimental interruption of the middle cerebral artery during hypothermia.

J Neurosurg 1956, 13:332-343

Rotin D, Grinstein S:

Impaired cell volume regulation in Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange-deficient mutants.

Am J Physiol 1989, 257:1158-1165

Sands MP, Mohri H, Sato S, Mannik M, Hessel EA 2nd, Dillard DH:

Hematorheology during deep hypothermia.

Cryobiology. 1979, 3:229-239

Sarkadi B, Parker JC:

Activation of ion transport pathways by changes in cell volume:

Biochim Biophys Acta 1991, 1071:407-427

Sarti C, Rastenyte D, Cepaitis Z, Tuomilehto J:

International trends in mortality from stroke, 1968 to 1994.

Stroke 2000, 3:1588-1601

Sensenbrenner M, Jaros GG, Moonen G und Meyer BJ:

Effect of conditioned media on nerve cell differentiation.

Experientia 1980, 36:660-672

---

Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O:

Mechanisms of glial swelling induced by glutamate.

Can J Physiol Pharmacol 1992, 70:334-343

Schousboe A, Svenneby G, Hertz L:

Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells.

Neurochem Res. 1983, 2: 231-243

Schwab S, Aschoff A, Spranger M, Albert F und Hacke W:

The value of intracranial pressure monitoring in acute hemispheric stroke.

Neurology 1996, 47:393-8

Shrode LD, Putnam RW:

Intracellular pH regulation in primary rat astrocytes and C6 glioma cells.

Glia 1994, 12:196-210

Senft JP:

Effects of some inhibitors on the temperature-dependent component of resting potential in lobster axon.

J Gen Physiol 1967, 50:1835-1848

Sensenbrenner M, Wittendorp E, Barakat I, Rechenmann RV:

Brain primary culture -- a characterization (part II).

Brain Res. 1982, 231:173-183

Shuaib A, Sochocka E, Code W und Hertz L:

---

Hypothermia protects astrocytes during ischemia in cell culture.

Neurosci Lett 1992,146:69-71

Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML:

Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis.

J Neurotrauma 1995, 12:943-956

Siesjö BK:

Cell damage in the brain: a speculative synthesis

J Cereb Blood Flow Metab 1981, 1:155-185

Siesjö BK:

Mechanisms of ischemic brain damage.

Crit Care Med 1988, 16:954-963

Simchowicz L, Textor JA und Cragoe EJ Jr:

Cell volume regulation in human neutrophils: 2-(aminomethyl)phenols as Cl<sup>-</sup> channel inhibitors

Am J Physiol 1993, 265:143-155

Singer D, Bretschneider HJ:

Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples-  
Part 1.

Thorac cardiovasc. Surgeon 1990, 38:205-211

Singer D, Bretschneider HJ:

Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples-  
Part 2.

---

Thorac Cardiovasc Surg 1990, 38:212-219

Soltoff SP, Mandel LJ:

Amiloride directly inhibits the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of rabbit kidney proximal tubules.

Science 1983, 27:957-968

Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H und Kempfski:

Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability.

J Cereb Blood Flow Metab 1990, 10:866-876

Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J und Baethmann A:

Swelling and death of neuronal cells by lactic acid.

J Neurol Sci 1993, 119:79-84

Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V und Baethmann A:

Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro.

J Cereb Blood Flow Metab 1994,14:1030-1039

Staub F, Winkler A, Haberstock J, Plesnila N, Peters J, Chang R, Kempfski O und Baethmann A:

Swelling, intracellular acidosis, and damage of glial cells.

Acta Neurochir Suppl (Wien) 1996, 66:56-62

Staub F, Winkler A, Peters J, Goerke U, Kempfski O, Baethmann A:

Clearance and metabolism of arachidonic acid by C6 glioma cells and

---

astrocytes.

Neurochem Res 1995; 20:1449-1456

Steen PA, Soule EH und Michenfelder JD:

Deterimental effect of prolonged hypothermia in cats and monkeys with and without regional cerebral ischemia.

Stroke 1979, 10:522-529

Stoll G, Jander S, Schroeter M:

.Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions.

Prog Neurobiol. 1998; 56:149-171

Tas PW, Massa PT, Kress HG und Koschel K:

Characterization of an  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  co-transport in primary cultures of rat astrocytes.

Biochim Biophys Acta 1987, 903411-416

Tharion J, Johnson DC, Celermajer JM, Hawker RM, Cartmill TB und Overton JH:

Profound hypothermia with circulatory arrest: nine years' clinical experience.

J Thorac Cardiovasc Surg 1982, 84:66-72

Thauer R, Brendel W:

Hypothermie.

Progress in Surgery 2 1962, 73-271

Van Harreveld A, Fifkova E:

Effects of glutamate and other amino acids on the retina.

J Neurochem 1971, 18:2145-2154

Vigne P, Frelin C, Cragoe EJ Jr und Lazdunski M:

Ethylisopropyl-amiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange system in various cell types.

Biochem Biophys Res Commun 1983, 116:86-90

Vigue B, Ract C, Zlotine N, Leblanc PE, Samii K und Bissonnette B:

Relationship between intracranial pressure, mild hypothermia and temperature-corrected  $\text{PaCO}_2$  in patients with traumatic brain injury

Intensive Care Med 2000, 26:722-728

Volk C, Albert T und Kempinski OS:

A proton-translocating  $\text{H}^+$ -ATPase is involved in C6 glial pH regulation.

Biochim Biophys Acta 1998, 1372:28-36

Wakabayashi S, Shigekawa M und Pouyssegur J:

Molecular physiology of vertebrate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers.

Physiol Rev 1997, 77:51-74

Warlow CP, Dennis MS, van Gijn J:

Reducing the burden of stroke and improving the public health. In: Warlow, CP, Dennis MS, van Gijn J et al. (eds.) Stroke. A practical guide to management.

Blackwell Science Ltd., Oxford , 1996

Weinfeld FD:

The national survey of stroke.

Stroke 12: Supp. 1, Nr.2, 1981:13-15

Wiebers DO, Meissner I:



---

Epidemiology of stroke.

Current Opinion in Neurology and Neurosurgery 3: 39-45, 1990

Wietzorrek J, Plesnila N, Baethmann A, Kachel V:

A new multiparameter flow cytometer: optical and electrical cell analysis in combination with video microscopy in flow.

Cytometry 1999, 35:291-301

Wijsman JA, Shivers RR:

Heat stress affects blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in mice.

Acta Neuropathol (Berl) 1993, 86:49-54

Winkler AS, Baethmann A, Peters J, Kempfski O, Staub F:

Mechanisms of arachidonic acid induced glial swelling.

Brain Res Mol Brain Res 2000, 76:419-423

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W:

The S100 protein family: history, function, and expression.

Brain Res Bull 1995;3:417-429

Zimmer DB, Van Eldik LJ:

Analysis of the calcium-modulated proteins, S100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma cell differentiation.

J Cell Biol 1989;108:141-151

## 6. Danksagung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Baethmann am Institut für Chirurgische Forschung durchgeführt.

Herrn Prof. Dr.h.c. mult. Konrad Meßmer, dem Leiter des Instituts zu Beginn der experimentellen Arbeit, danke ich für die freundliche Aufnahme an das Institut für chirurgische Forschung, das durch seine kollegiale Atmosphäre produktives und kreatives Arbeiten ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann gilt mein besonderer Dank für seine Gesprächsbereitschaft, konstruktive Kritik und seine immer neuen Anregungen, insbesondere bei der Vorbereitung zahlreicher Präsentationen und Vorträge im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Nikolaus Plesnila danke ich besonders für die Überlassung des interessanten Themas und die freundschaftliche Anleitung und umfassende Betreuung. Er verstand es, mir die ersten Schritte in der medizinischen Forschung zu erleichtern und mir schließlich die Freude am wissenschaftlichen und selbständigen Arbeiten zu vermitteln. Seine Anregungen, Ratschläge und Geduld waren immer von ganz besonderem Wert für mich.

Ich danke Herrn Dr. biol. hum. Jochen Witzorrek, der mir bei der Durchführung der Experimente und im Bereich der Datenverarbeitung hilfreich zur Seite stand.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Jürgen Peters, der sich oft bei technischen Fragen oder der Datenverarbeitung als „rettender Engel“ erwiesen hat.

Mein großer Dank gilt auch den Assistentinnen Ingrid Kölbl, Susanne Guretzki, Uta Mamrak, Sylvia Münzing und Monika Fürst für ihre hervorragende Hilfe bei der Vorbereitung der Versuche.

Ebenso danke ich dem gesamten „Neuro-Team“, in dessen Mitte ich mich immer sehr wohl gefühlt habe, und dessen freundschaftlich-familiäre Atmosphäre die Zeit am Institut in besonderem Maße geprägt hat.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und meinem Ehemann, der mir insbesondere in der Endphase der Promotionsarbeit hilfreich zur Seite stand.

## 7. Lebenslauf

Geburtsdatum:	19.06.73
Geburtsort:	Tschirtschik/Usbekistan
Eltern:	Tamara Stohr Reinhold Stohr geb. Reiter
Ehemann:	Ralf Euringer
Kind:	Hugo Maximilian Franz Euringer (geb 24.05.2004)
Ausbildung:	
1979-1983:	Grundschule-an-der-Lessingstraße, Ingolstadt
1983-1992:	Christoph-Scheiner-Gymnasium, Ingolstadt
1983-1992:	Christoph-Scheiner-Gymnasium, Ingolstadt
11/1992-04/1993:	Freiwilliges Soziales Jahr beim Bayerischen Roten Kreuz, München (Klinik Dr. Schreiber für Innere Medizin).
05/1993:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität, München. Famulaturen in München, Neuburg, Southend-on-Sea (UK)
1999/2000:	Praktisches Jahr: <u>Chirurgie</u> : Dep. of General Surgery und Accident & Emergency- Department, Southend General Hospital, associated University Teaching Hospital of Medical Schools of The Royal London and St. Bartholomew's (UK) <u>Innere Medizin</u> : Dep. of Medicine, Southend General Hospital Innere Medizin (Endokrinologie): Klinikum Innenstadt der Ludwig- Maximilian-Universität, München (Prof. Landgraf) <u>Radiologie</u> : Institut für Radiologische Diagnostik, Klinikum der Ludwig-Maximilian-Universität, München (Prof. Hahn)
10/2000-04/2001:	Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum Großhadern (Prof. Hahn)
05/2001-04/2002:	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Allgemein Chirurgie, Rotkreuzkrankenhaus, München (Prof. Schoenberg)
05/2002-03/2003:	Assistenzärztin für Radiologie in der Gemeinschaftspraxis 'Radiologie München', Burgstr.7, München
04/2003:	Assistenzärztin für Radiologie im städtischen Krankenhaus München-Neuperlach, München (Prof. Dr. A. Rieber)