

**Steuerung eines gerichteten Volumenprozesses im
Neokortex**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heike Niermann

aus Arnsberg

Düsseldorf

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. O. W. Witte

Koreferent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2001

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungen	
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Präparation	10
2.2 Versuchsaufbau	11
2.3 Registrierung intrinsisch optischer Signale	14
2.3.1 Reizparadigmen	14
2.3.2 Meßsignale	15
2.3.3 Bildverarbeitung	15
2.4 Registrierung von Feldpotentialen	16
2.4.1 Herstellung der Feldpotentialelektroden	16
2.4.2 Positionierung der Feldpotentialelektrode im erregten Areal	16
2.5 Kalium- und Tetramethylammonium-Messungen mit ionensensitiven Mikroelektroden	17
2.5.1 Bau ionensensitiver Mikroelektroden	19
2.5.2 Eichung der ionensensitiven Mikroelektroden	21
2.6 Messung der reizinduzierten Änderung des Extrazellulärraumvolumens	24
2.7 Pharmakologische Substanzen	25
2.8 Auswertung der SD-Verläufe in Anlehnung an das Hodgkin-Huxley-Modell der Depolarisation	25
2.9 Statistik	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Modulation eines radialen, aktivitätsabhängigen Wasserflusses im Neokortex	28
3.1.1 Elektrische Stimulation in Lamina VI induziert eine Extrazellulärraumaufweitung in Lamina I	28
3.1.2 Vasopressin verstärkt die induzierte Extrazellulär- raumaufweitung	31
3.1.3 Die größere Ausdehnung des IOS durch Vasopressin ist nicht auf eine Veränderung in der Erregbarkeit des Gewebes zurückzuführen	32

3.1.4	Messung von Kaliumkonzentrationen	34
3.1.5	Die Vasopressin induzierte verstärkte Aufweitung erfolgt über den Vasopressin1a-Rezeptor	37
3.1.6	Der AVP-Effekt ist Kalziumabhängig	42
3.1.7	Phosphokinase C ist an der AVP-induzierten Vergrößerung der Ausdehnung der schwarzen Welle beteiligt	46
3.1.8	AQP4-Verteilung in AVP behandelten Hirnschnitten	48
3.2	Modulation von <i>spreading depressions</i> durch einen Vasopressin1a-Rezeptorantagonisten	51
3.2.1	Auslösung von <i>spreading depressions</i> durch Kaliumchlorid	51
3.2.2	Die SDs lassen sich in diesem Modell wiederholt vergleichbar auslösen	54
3.2.3	Die Ausbreitung der SD (helles Signal) verringert sich nach Applikation des V1a-Antagonisten	56
3.2.3	Der V1a-Antagonist verlangsamt die Aktivierung und die Inaktivierung des SD-Verlaufs im Bezug auf die Zellschwellung (helles Signal)	58
3.2.4	Der V1a-Antagonist verändert die relation der einzelnen SDs zueinander im Bezug auf die Extrazellulärraumaufweitung (dunkles Signal) tendenziell	63
3.2.6	Der V1a-Antagonist hat keinen Einfluß auf das Gleichspannungspotential der SD	66
4	Diskussion	69
	Beteiligung des V1a-Rezeptors	73
	Intrazelluläre Mechanismen	74
	Vasopressin hat keinen Einfluß auf das Expressionsmuster von AQP4	76
	Auswirkungen des V1a-Antagonisten unter pathophysiologischen Bedingungen auf die Zellschwellung	77
	Einfluß des V1a-Antagonisten auf die Kinetiken des SD-Verlaufs	79
	Der V1a-Antagonist verstärkt die Extrazellulärraumaufweitung im SD-Verlauf	81

	Der V1a-Antagonist hat keinen Einfluß auf das lokale Gleichspannungspotential der SD	81
	Schlußbemerkungen und Ausblick	82
5	Zusammenfassung	83
6	Literaturverzeichnis	85

Abkürzungen

aCSF	artifizielle Zerebrospinallösung
A_{exp}	experimentell bestimmte Maximalamplitude
AVP	(Arg ⁸)-Vasopressin
AQP(1-12)	Aquaporin (1-12)
BIS I	Bisindolylmaleimide I
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD-Kamera	charge coupled device-Kamera
DC	Gleichspannung
EEG	Elektroenzephalogramm
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'- Ethansulfonsäure
HMDS	Hexamethyldisilazan
IOS	intrinsisch optisches Signal
K^+	Kalium-Ion
NMDA	N-Methyl-D-Asparaginsäure
PKC	Phosphokinase C
SD	<i>spreading depression</i>
τ_{Akt}	τ -Aktivierung
τ_{Inakt}	τ -Inaktivierung
TMA ⁺	Tetramethylammonium-Ion
V1- Rezeptor	Vasopressin1-Rezeptor
V2- Rezeptor	Vasopressin2-Rezeptor
V1a-Antagonist	Vasopressin1a-Rezeptorantagonist

1 Einleitung

Einer der zentralen Lehrsätze der Zellbiologie war bis vor einigen Jahren, daß für Ionen spezielle Transportwege über biologische Membranen vorhanden sind, während Wasser den Ionen passiv direkt durch die Membran oder mit den Ionen als Hydrathülle durch spezielle Ionenkanäle nachfolgt. Wasser diffundiert allerdings nur langsam durch die Doppellipidmembranen (die osmotische Wasserpermeabilität in *Xenopus* Oocyten beträgt z.B. ca. $0,7 \text{ cm/s} * 10^{-3}$, Yang und Verkman, 1997). Die Geschwindigkeit dieses Prozesses erklärt nicht den schnellen Wassertransport, der bei der aktiven Regulation der Wasserhomöostase auftritt (z.B. bei osmotischem Streß, oder in der Niere durch das antidiuretische Hormon).

Anfang der neunziger Jahre wurde gezeigt, daß das Zellprotein CHIP28 nach Expression in *Xenopus* Oozyten einen Wasserkanal bildete (Preston et al., 1992). Dieses Protein und alle weiteren verwandten Proteine wurden Aquaporine genannt (AQP). Diese erleichtern die osmotisch angetriebene Passage von Wasser (und z.T. anderen ungeladenen Stoffen) durch die Membran. In *Xenopus* Oocyten steigerte sich die osmotische Wasserpermeabilität nach Expression von verschiedenen AQP im Schnitt um den Faktor 20 (Yang und Verkman, 1997). Alle Aquaporine besitzen eine gemeinsame Struktur, die aus sechs Transmembransegmenten, die durch 5 verbundene *loops* getrennt sind, besteht. Bei Säugetieren sind derzeit 12 verschiedene Aquaporine (AQP1 - AQP12) bekannt, von denen im Hirn neben kleineren Mengen an AQP1 (CHIP28) hauptsächlich AQP4 vertreten ist (Nielsen et al., 1997). AQP4 ist nicht gleichmäßig über das Gehirn verteilt, sondern hauptsächlich in Gliazellen der Kortexschicht I und in Astrozytenendfüßen, die die Blutgefäße umgeben, lokalisiert (Nielsen et al., 1997). Diese Verteilung läßt vermuten, daß AQP4 im Gehirn am Erhalt der Wasserhomöostase beteiligt ist.

In der Niere kommt vor allem AQP2 vor. Dieses AQP ist in der apicalen Plasmamembran von Epithelzellen im renalen Tubulus lokalisiert. Hier findet die Wasser-Rückresorption statt. AQP2 wird durch Vasopressin (antidiuretisches Hormon) über den Vasopressin2-Rezeptor und daraus resultierendes intrazellulär ansteigendes cAMP reguliert (Nielsen et al., 1993).

Auch im Gehirn gibt es einen intrinsischen Vasopressinlevel (Landgraf, 1992). Vasopressin-enthaltende Neurone im Hypothalamus stellen den Ursprung für ein Fasersystem dar, welches sich durch das Gehirn und das Rückenmark erstreckt (Buijs, 1978; deVries und Miller, 1998). Die Funktion dieses intrinsischen Fasersystems ist noch unklar. Desweiteren sind Vasopressin1-Rezeptoren über den ganzen Kortex verteilt (Diaz Brinton, 1999; Chen et al., 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, daß Vasopressin die Rate an osmotisch induzierten Volumenänderungen in Astrozytenkulturen erhöht (Sarfaraz et al., 1999). Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung von Vasopressin bei der Wasserverteilung im Gehirn, ähnlich wie in der Niere, hin. Es stellte sich nun die Frage, ob und wenn ja über welchen Rezeptor und über welche Signalkaskaden AQP4 im Gehirn reguliert wird.

Die Wasserhomöostase im Gehirn ist von zentraler klinischer und physiologischer Bedeutung. Zerebrale Ödeme entstehen durch eine Vielzahl von pathologischen Prozessen. Der Hirndruck steigt sehr schnell, weil das Gehirn von einer Kalotte umgeben ist und somit sein Volumen nicht stark ausdehnen kann. Dadurch wird der steigende Hirndruck schnell lebensbedrohlich.

Desweiteren sind Wasser und Ionen-Homöostase strikt gekoppelt. Eine effiziente Kontrolle des extrazellulären Kaliumionen-Levels z.B. ist essentiell für eine normale Hirnfunktion. Bei der Netto-KCl-Aufnahme durch den Na-K-2Cl-Kotransporter der Gliazellen kommt es zu Änderungen des osmotischen Gleichgewichts, welche durch einen begleitenden Wasserfluß kompensiert werden müssen. Versagt diese

Kontrolle, wird die Akkumulation von Kalium-Ionen (K^+) Neuronen depolarisieren und die synaptische Transmission stören (Dietzel, 1980).

Astrozyten können die hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen auf verschiedene Weise von den Neuronen entfernen. Über den Na-K-2Cl-Kotransporter kann K^+ aufgenommen und den Neuronen verzögert wieder abgegeben werden. Einen weiteren wesentlichen Beitrag zur K^+ -Homöostase im Gehirn leistet die sogenannte räumliche K^+ -Pufferung (*spatial buffer*, Dietzel et al., 1980; Orkand, 1980; Holthoff und Witte, 2000) durch Gliazellen. Die durch *gap junctions* (Connexin 43) zu einem Synzytium verbundenen Gliazellen nehmen K^+ an Stellen mit hoher neuronaler Aktivität auf und verteilen dieses Ion durch das gliale Netzwerk. Der Hauptladungsträger im Synzytium ist Kalium, extrazellulär sind die Hauptladungsträger Natrium und Chlorid. Berechnet man die Ionenverschiebungen für die räumliche Kaliumpufferung (Dietzel et al., 1980), ergibt sich eine hypoosmolare extrazelluläre Lösung am Ort neuronaler Aktivität und eine hyperosmolare in darüber und darunter gelegenen Schichten. Osmotische Unterschiede werden nicht nur durch die lokale Verschiebung von Ionen erzeugt, sondern zusätzlich durch das Zusammenspiel mit den Ionenströmen, die extra- und intrazellulär vom Ort der Erregung zu nicht erregten Regionen hin- bzw. wegfließen.

Das Membranpotential des über *gap junctions* (Peters, 1962; Brightman et al., 1978) verbundenen glialen Synzytiums ist am Ort der Erregung etwas negativer als das Kalium-Gleichgewichtspotential und jenseits der Erregung positiver. Dies erzeugt eine treibende Kraft für Kalium-Ionen. Es erfolgt ein K^+ -Einstrom in die Gliazelle am Ort der Erregung und außerhalb der K^+ -Quelle ein Ausstrom aus der Glia. Der transgiale K^+ -Strom bewirkt somit passiv die Nivellierung des extrazellulären K^+ -Gradienten (Gardner-Medwin, 1977, Gardner-Medwin et al., 1979). Die Freisetzung erfolgt in den Subarachnoidalraum oder in den Extrazellulärraum zwischen glialen Endfüßen und den von den Endfüßen umgebenden Gefäßen.

Unter physiologischen Bedingungen sind wahrscheinlich beide Mechanismen (Aufnahme durch den Na-K-2Cl-Kotransporter und verzögerte Abgabe an die Neuronen und der *spatial buffer*-Mechanismus) zu unterschiedlichen Anteilen daran beteiligt, hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von den Neuronen zu entfernen. Die Beteiligung des *spatial buffers* kann durch die Verwendung einer artifiziellen Zerebrospinallösung (aCSF) mit erniedrigter Chloridkonzentration verstärkt werden. Die Beteiligung des chloridabhängigen Na-K-2Cl-Kotransporters wird stark vermindert, da die aCSF mit erniedrigter Chloridkonzentration den chloridabhängigen Transporter fast vollständig inaktiviert (Holthoff und Witte, 1998).

Die räumliche Pufferung von K^+ ruft osmotische Gradienten hervor, die von Wasserumverteilungen kompensiert werden müssen (Dietzel et al., 1980). Das bedeutet, daß jeder Kaliumfluß durch das gliale Synzytium von einem gerichteten Wasserfluß begleitet werden muß (Holthoff und Witte, 2000). An diesem gerichteten, schnellen Wassertransport ist mit großer Wahrscheinlichkeit AQP4 beteiligt. Der *spatial buffer*-Mechanismus diente in der vorliegenden Arbeit als Modell, um die Mechanismen in der Signalkaskade der AQP4-Regulation zu untersuchen. Der Vorteil dieses Modells gegenüber z. B. einer Applikation von hyper- oder hypoosmolaren Lösungen liegt darin, daß hier aufgrund einer physiologischen Stimulation eine Schwellung und eine Schrumpfung des Extrazellulärraums in zwei von einander getrennten Gebieten hervorgerufen werden kann.

Extrazellulärraumveränderungen wurden bislang hauptsächlich mit ionensensitiven Mikroelektroden über die Bestimmung von Konzentrationsveränderungen nichtpermeabler Testsubstanzen (z.B. TMA^+ , Ransom et al., 1985, Nicholson und Phillips, 1981) erfaßt. Diese haben eine limitierte Zeitauflösung (etwa 30 Sekunden) und können Veränderungen nur an einem Punkt zur gleichen Zeit erfassen. In den neunziger Jahren mehrten sich die Hinweise, daß intrinsisch optische Signale, wie sie bereits 1949 von Hill und Keynes beschrieben worden

waren, durch Volumenänderung von Zellen und damit durch Änderungen der Größe des Extrazellulärraums verursacht sein könnten (MacVicar und Hochman, 19991; McManus et al., 1993; Andrew und MacVicar, 1994). Die direkte Korrelation beider Meßgrößen erfolgte durch Holthoff und Witte (1996, 1998, 2000).

Mit Hilfe der Messung intrinsisch optischer Signale (IOS) können Extrazellulärraumveränderungen über größere Gewebeflächen in guter räumlicher und zeitlicher Auflösung wiedergegeben werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die IOS mit der Dunkelfeld-Infrarotmikroskopie (Dodt et al., 1993; Dodt und Ziegelgänsberger, 1994) registriert. In dieser Konfiguration wird nur der gestreute Anteil des transmittierten Lichtes erfaßt.

Die untersuchten lebenden Rattenhirnschnitte werden in einer Kammer mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit umspült und mit einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ begast. Die Schnitte stellen für nahinfrarotes Durchlicht (750 nm) ein optisches Gitter dar, wodurch das Licht gestreut wird. Diese Streuung kann mit einer CCD-Kamera registriert und aufgezeichnet werden. Ändert sich der Extrazellulärraum z.B. durch Gliazellschwellung nach neuronaler Aktivität, ändern sich auch die Gittereigenschaften, das Licht wird anders gestreut und kann dann z.B. als Aufhellung registriert werden. Extrazellulärraumaufweitungen führen zu einer Abdunklung, Schrumpfungen zu einer Aufhellung (Holthoff und Witte, 1996, 2000). Da die ganze Kortexbreite bei Ratten auf einmal sichtbar gemacht werden kann, können auch Umverteilungen von Wasser über mehrere Kortexschichten verfolgt werden.

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen der AQP4-abhängigen Wasserumverteilung unter Kontrollbedingungen ermöglicht die Untersuchung von Veränderungen pathophysiologischer Volumenprozesse. Solche Prozesse treten z.B. in der Ödementstehung nach einem Schlaganfall oder bei *spreading depressions* auf. Es stellt sich die Frage, ob sich diese pathologischen Veränderungen durch einen pharmakologischen Eingriff in die Regulation der AQP4 beeinflussen.

Das Phänomen der *spreading depression* (SD) wurde zuerst von Leão (1944) beobachtet, nachdem er beim Kaninchen auf die kortikale Oberfläche Kaliumchlorid (KCl)-Lösung applizierte. Er registrierte eine Erniedrigung der EEG-Amplitude und eine Negativierung der kortikalen Gleichspannung, die sich mit einer Geschwindigkeit von 2-5 mm/min über den Kortex ausbreitet. Dieses Phänomen hält etwa 15-30 min an. Diese Ausbreitung erfolgt unabhängig von vaskulären Territorien und stellt eine Interaktion von Neuronen dar, die durch Änderung der ionischen Konzentration im Extrazellulärraum der Zellen bedingt ist. Ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zur Zelldepolarisation. Ab einer Konzentration von 10-12 mM, dem sogenannten *ceiling level* (Heinemann und Lux, 1977), scheint das Gewebe die erhöhte Kaliumkonzentration nicht mehr regulieren zu können. Die Depolarisation hat eine Erhöhung der extrazellulären Glutamat- und Kaliumkonzentration zur Folge. Diese Erhöhung depolarisiert dann die Nachbarzellen und führt in einem sich selbst regenerierenden Prozeß zum Wellencharakter der SD (Somjen et al., 1976). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht sich dabei bis zu Konzentrationen um 80 mM. Die elektrophysiologische Komponente der SD wird von großen Volumenänderungen begleitet. Die durch die ionale Verschiebung bedingte Wasserumverteilung führt zu einer Schrumpfung des Extrazellulärraums um 50 % (Hansen und Olsen, 1980). Durch lokale K^+ -Aufnahme durch den Na-K-2Cl-Kotransporter

und die räumliche Umverteilung des Kaliums durch den sogenannten *spatial buffer*- Mechanismus (Dietzel et al., 1980) wird das Ionengleichgewicht wieder hergestellt. Dabei handelt es sich um einen energieabhängigen Prozeß. Dies erklärt, daß die SD von einer Steigerung des Glukosemetabolismus, einer Steigerung des zerebralen Blutflusses und einer vorübergehenden ATP- und pH- Erniedrigung begleitet wird (Csiba et al., 1985; Gault et al., 1994). SDs lassen sich im Kortex (und Hippocampus) durch verschiedene Stimuli auslösen: a) Applikation von Kaliumkonzentrationen über 10-12 mM, b) Applikation von Glutamat, c) massive elektrische Stimulation, d) mechanische Stimulation, e) Traumata und f) Ischämien (Leão, 1947).

Eine Verringerung von Ausbreitung und Abfolge der SDs nach Ischämien ist möglicherweise bedeutsam unter therapeutischen Gesichtspunkten. In der Umgebung fokaler Ischämien treten in den ersten Stunden nach Beginn der Durchblutungsstörung repetitiv SD-ähnliche Periinfarktdepolarisationen (Back et al., 1994, Hossmann, 1996) auf. Die vorgeschädigten Zellen in der Ischämieumgebung werden wiederholt depolarisiert. Da die Repolarisation ein energieabhängiger Prozeß ist und der zerebrale Blutfluß den Energiebedarf nicht mehr decken kann, wird das ursprüngliche Kernischämiegebiet durch die Periinfarktdepolarisationen immer größer (Hossmann, 1996; Iijima et al., 1992). Werden experimentell (z.B. mit epikortikaler KCl-Applikation) SDs während eines ischämischen Insultes ausgelöst, korreliert ihre Anzahl mit der Vergrößerung des resultierenden Infarktes, was als zusätzlicher Schadensmechanismus angesehen werden muß (Back et al., 1996). Eine Beeinflussung der Ausbreitung und Häufigkeit der SDs würde dazu beitragen, die Größe des infarzierten Gewebes zu verringern.

Bislang wurde die Inhibierung von SDs hauptsächlich von der elektrophysiologischen Seite angegangen. Marranes et al. (1988) verhinderten z.B. die Entstehung von SDs durch den NMDA-Antagonisten MK-801. Dieser Antagonist ist bei Patienten aber nicht

einsetzbar, da er toxisch ist. In dieser Arbeit wird ein völlig neuer Ansatz der Beeinflussung, bzw. einer Inhibierung von SDs versucht. Da Ionen- und Wasserhomöostase strikt gekoppelt sind und die SD neben der Negativierung der kortikalen Gleichspannung von einem großen Volumensignal begleitet wird, wird versucht die SD über einen pharmakologischen Eingriff in die Regulation der AQP4 zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *spreading depression* durch Applikation von Kalium hervorgerufen. Um das Modell den Bedingungen nach einem ischämischen Insult besser anzupassen, wurde nicht lokal in einem kleinen Punkt mit einer Applikationskanüle in den Hirnschnitt eingestochen, sondern ein Tropfen 1 mol/l KCl-Lösung herangespült. Im Gegensatz zu einer eher punktförmigen Applikation wird hier ein etwas größeres Areal mit unterschiedlich hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen konfrontiert, genau wie beim Gewebeuntergang nach einem ischämischen Insult.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob und wie sich die Wasserumverteilung im Gehirn über AQP4 regulieren läßt. Von der Wasserumverteilung durch AQP2 (in der Niere) ist bekannt, daß sie Vasopressin reguliert wird. Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich AQP4 ebenfalls durch Vasopressin beeinflussen läßt. Wenn sich AQP4 regulieren läßt, sollen weitere Schritte in der Signalkaskade der AQP4-Regulation aufgeklärt werden. Im zweiten Teil soll untersucht werden, ob sich pathologische Volumenprozesse, wie sie z.B. bei *spreading depression* auftreten, durch eine Beeinflussung der AQP4-Regulation verändern lassen. Die Beeinflussung der Ausbreitung und Häufigkeit der SDs würde dazu beitragen, den Gewebeuntergang nach einer Ischämie zu verringern.

Diese Fragen wurden durch die Kombination von intrinsischen optischen Signalen (in der Dunkelfeld-Infrarotmikroskopie) mit elektrophysiologischen Ableitmethoden wie der Registrierung von

Feldpotentialen, kortikaler Gleichspannung und extrazellulären Ionenkonzentrationen mit ionenselektiven Mikroelektroden bearbeitet. Parallel zur Aufzeichnung der intrinsisch optischen Signale wurden die Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration und Extrazellulärraumveränderungen indirekt über die Konzentration des membranimpermeablen Tetramethylammonium-Ions (TMA^+) registriert. In der Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. O. P. Ottersen (Anatomie-Abteilung am Institut für Medizinische Grundwissenschaften in der Universität von Oslo) entstanden die immunhistochemischen Daten der AQP4-Verteilung im Kortex.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation

Alle Versuche wurden an 400 µm dicken, koronalen Hirnschnitten von 14 Tage alten, männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Zuerst wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn freipräpariert. Anschließend wurde das Gehirn in eisgekühlte artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) überführt und dort für etwa eine Minute abgekühlt. Auf einem mit aCSF angefeuchteten Fließpapier wurde das Gehirn mit einer Rasierklinge für den Schneidevorgang getrimmt. Dazu wurde von dem mit der ventralen Seite nach unten liegenden Gehirn jeweils mit einem senkrechten Schnitt das Vorderhirn und das Kleinhirn abgetrennt. Das verbleibende Gewebestück wurde auf die kaudale Schnittfläche gekippt und die basalen Teile des Gehirns mit einer zu den vorherigen Schnitten senkrechten Schnittführung abgetrennt.

Mit der kaudalen Schnittfläche nach unten wurde das verbleibende Gewebestück mit Sekundenkleber auf einem Kunststoffblock festgeklebt. Dabei wurde das Gewebestück an einen quadratischen, aus aCSF und 5 % -igem Agar-Agar hergestellten Würfel angelehnt. Dadurch wurde gewährleistet, daß sich während des Schneidevorgangs das Gewebe nicht verschieben konnte. Mit einem Vibratom (VT 1000S, Leica) wurden 400 µm dicke koronale Hirnschnitte hergestellt. Sie wurden mit einer weiten Pipette ohne mechanische Beanspruchung in ein Vorratsgefäß übertragen. Das Vorratsgefäß bestand aus einem mit aCSF gefüllten 250 ml Becherglas, auf das ein Kunststoffsieb gelegt wurde. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ begast. Zur Erholung nach der Präparation wurden die Schnitte mindestens eine Stunde im Vorratsgefäß belassen.

2.2 Versuchsaufbau

In einer Versuchskammer wurden die untergetauchten Hirnschnitte mit 2 ml aCSF pro Minute perfundiert. Tabelle 1 zeigt die ionale Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen. In den Lösungen mit erniedrigter Chlorid-Konzentration wurde NaCl (bis auf 10 mM) durch equimolare Mengen Na- und CaGluconat (98 mM NaGluconat, 16 mM CaGluconat) ersetzt. CaGluconat wurde hinzugesetzt, um die Ca^{2+} -Puffereigenschaften der Gluconate (Kenyon und Gibbons, 1977; Vaughan-Jones, 1979) auszugleichen. Die Lösungen wurden in einem Wasserbad bei 32° C mit einem Gasgemisch aus 5 % CO_2 und 95 % O_2 begast. Die Perfusion erfolgte mittels hydrostatischen Druckes durch erhöht stehende Vorratsgefäße. Um eine Temperatur von 32° C in der Kammer zu gewährleisten, wurde im Teflon-Schlauchsystem kurz vor der Versuchskammer die Lösung in einer mit Heizdraht umwickelten Glaskapillare erhitzt. Die Heizung (LSE, Münster) wurde mit Hilfe zweier temperaturabhängiger Widerstände, die an der Außenseite der Glaskapillare und in der Versuchskammer angebracht waren, reguliert.

Als optisches System wurde ein aufrechtes Mikroskop Axioskop FS, Zeiss) verwendet, welches auf einem XY-Tisch verschiebbar gelagert war. Die Versuchskammer war fest auf dem Versuchstisch montiert. Bei diesem Mikroskop wird das mikroskopische Bild fokussiert, indem der gesamte Tubus in der optischen Achse verschoben wird. Die Experimente wurden im Dunkelfeldverfahren (das untersuchte Objekt erscheint hell auf dunklem Hintergrund, nur das durch das Objekt gestreute Licht wird registriert) durchgeführt. Die untersuchten lebenden Rattenhirnschnitte wurden in einer durchsichtigen Kammer mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit umspült. Die Schnitte stellen für nahinfrarotes Durchlicht (Filter bei jungen Tieren: $750 \pm 50 \text{ nm}$, Filter bei erwachsenen Tieren: $750\text{-}1050 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$) ein optisches Gitter dar, wodurch das Licht gestreut wird. Ändert sich der Extrazellulärraum z.B. durch Gliazellschwellung nach neuronaler Aktivität, ändern sich auch

die Gittereigenschaften, das Licht wird anders gestreut und kann dann z.B. als Aufhellung registriert werden. Extrazellulärraumaufweitungen führen zu einer Abdunklung, Schrumpfungen zu einer Aufhellung (Holthoff und Witte, 1996, 2000). Da die ganze Kortexbreite bei Ratten auf einmal sichtbar gemacht werden kann, können Signalveränderungen (Aufweitung oder Schrumpfung des Extrazellulärraums) über mehrere Kortexschichten verfolgt werden.

Das mikroskopische Bild wurde mit einer CCD (charge coupled device) –Kamera (C7500, Hamamatsu) registriert. Nachgeschaltet war eine Kamerasteuerungseinheit (C2400, Hamamatsu), die eine analoge Kontrastverstärkung und *offset*-Verschiebung des Kamerasignals ermöglichte. Gleichzeitig konnten Unterschiede in der Grundhelligkeit des analogen Videobildes durch eine sogenannte *shading-correction*-Einheit ausgeglichen werden.

Die nachfolgende Weiterverarbeitung des Videosignals wurde durch einen Videometrieprozessor (Argus 20, Hamamatsu) geleistet. Diese Einheit ermöglichte in Echtzeit den Abzug eines zuvor aufgenommenen Hintergrundbildes vom aktuellen Videosignal und eine folgende digitale Nachverstärkung des Differenzbildes. Die so erhaltenen Videosignale wurden mit einem S-VHS Videorekorder (AG-4700, Panasonic) aufgezeichnet.

Die aufgezeichneten Videosignale wurden *off-line* ausgewertet. Die Analyse der Daten erfolgte mit einem MacIntosh PC (G4), der mit einer *frame-grabber*-Karte (LG-3, Scion Corporation) und der Bildverarbeitungssoftware NIH Image ausgestattet war. Diese Software ermöglichte bestimmte Graustufen (erstens die Graustufen, die ein helles Signal im Vergleich zum Hintergrund bildeten und zweitens die Graustufen, die ein dunkles Signal im Vergleich zum Hintergrund bildeten) zusammenzufassen, so daß ein binäres Bild entstand. In diesem Bildmodus konnte dann die Fläche des Signalgebietes erfaßt und ausgerechnet werden. Die Änderung der Fläche über die Zeit

wurde ermittelt, wobei die Einstellung der zusammengefaßten Graustufen beibehalten wurde.

Die elektrophysiologischen Signale wurden mit einer DC-Tonbandmaschine (store 4 DS, Racal) aufgezeichnet. Die Daten wurden digitalisiert (CED 1401) und *off-line* mit der Software SIGNAL (CED Software) dargestellt und ausgewertet. Zur weiteren Analyse wurden die Daten im ASCII-Format exportiert und mittels Tabellenkalkulation (Excel, Microsoft) ausgewertet.

aCSF	normale	17 mM Cl⁻	+ 10 mM TMACl	17 mM Cl⁻ + 10 mM TMACl
NaCl	124	10	114	
NaGluconat		98		98
NaH₂PO₄	1.25	1.25	1.25	1.25
NaHCO₃	26	26	26	26
KCl	3	3	3	3
CaCl₂	2	2	2	2
Ca_{1/2}Gluconat		16		16
MgSO₄	2	2	2	2
Glucose	10	10	10	10

Tab. 1: Darstellung der ionalen Zusammensetzung der Perfusionslösungen (alle Konzentrationen in mM).

2.3 Registrierung intrinsisch optischer Signale

2.3.1 Reizparadigmen

a) Elektrische Stimulation

Die intrinsisch optischen Signale wurden durch elektrische Reizung der Hirnschnitte ausgelöst. Dazu wurde eine konzentrische Reizelektrode (Spitzendurchmesser: 100 μm , SNEX 100, Science Products Inc.) verwendet. Dies wurde im rechten Winkel abgebogen und senkrecht im Hirnschnitt in Schicht VI in der Nähe zur weißen Substanz in den Kortex eingestochen. Die intrinsisch optischen Signale wurden durch eine Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz ausgelöst. Die Reizstärken lagen zwischen 2 V und 9 V. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μs .

b) Stimulation mit 1M KCl

Die intrinsisch optischen Signale der *spreading depression* wurden durch das Heranspülen eines Tropfens 1 mol/l KCl-Lösung ausgelöst. Dieser Tropfen wurde mit Hilfe eines Picospritzers (General Valve Corporation) in $1050 \pm 50 \mu\text{m}$ Entfernung von der Pia mater des Hirnschnitts appliziert und durch den Druck und die Fließrichtung in der Versuchskammer an den Schnitt herangespült. Der Druck (1,0 bar), der Durchmesser der Applikationskanüle (Innendurchmesser 0,25 mm), die Kaliumkonzentration (1 mol/l), der Abstand zum Hirnschnitt ($1050 \pm 50 \mu\text{m}$), die Höhe (Applikationskanüle lag auf dem Kammerboden auf) und die Ausrichtung der Applikationskanüle (ca. 90° zur Pia), die Fließgeschwindigkeit (2 ml/ min) und Fließrichtung (der Schnitt wurde immer senkrecht zur Fließrichtung in der Versuchskammer plziert) wurden konstant gehalten, so daß immer das gleiche Volumen an eine vergleichbare Stelle appliziert wurde.

Um das Modell der Bedingungen nach einem ischämischen Insult besser anzupassen, wurde nicht lokal in einem kleinen Punkt mit einer

Applikationskanüle in den Hirnschnitt eingestochen, sondern ein Tropfen 1 mol/l KCl-Lösung an den Hirnschnitt mit Hilfe eines Picospritzers herangespült. Im Gegensatz zu einer eher punktförmigen Applikation wird hier ein etwas größeres Areal mit unterschiedlich hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen konfrontiert, genau wie beim Gewebeuntergang nach einem ischämischen Insult.

2.3.2 Meßsignale

Durch das verwendete Dunkelfeldverfahren (s.o.) erschien der Hirnschnitt im unverarbeiteten Bild hell auf dunklem Hintergrund. Die elektrische Stimulation bewirkte in den erregten Arealen eine weitere Aufhellung oder Abdunklung des mikroskopischen Bildes. Die Amplitude dieser Änderung lag in der Größenordnung von 1 Promille der Hintergrundintensität. Im unverarbeiteten videomikroskopischen Bild wären diese Signale nicht auflösbar, da die Digitalisierung des Videosignals nur mit einer Auflösung von 8 Bit erfolgt und so das Signal vom Rauschen überdeckt würde. Aus diesem Grund wurde, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, in einer weiteren Bildverarbeitung das Meßsignal in den Bereich der digitalisierenden *frame-grabber*-Karte aufgespreizt.

2.3.3 Bildverarbeitung

Durch die Kamerasteuerungseinheit wurde das Signal der CCD-Kamera zunächst analog um einen Faktor 3 kontrastverstärkt und die Grundhelligkeit des Bildes durch eine analoge *shading*-Korrektur homogen ausgesteuert. Die nachfolgenden Verarbeitungsschritte wurden durch den Videometrieprozessor durchgeführt. Das analoge Videobild wurde dazu mit einer Auflösung von 12 Bit digitalisiert und alle Berechnungen mit dieser Auflösung durchgeführt. Anschließend

wurde das Videobild mit einer Auflösung von 8 Bit digital-analog-gewandelt. 8 Sekunden vor jeder Reizung wurde das Hintergrundbild als Mittel aus 64 aufeinanderfolgenden Videohalbbildern aufgenommen. Dieses Hintergrundbild wurde nun von jedem neu hereinkommenden Videobild abgezogen und die Differenz mit einem Faktor zwischen 4 und 8 digital verstärkt. Das so verrechnete Videosignal stand spätestens 2 Sekunden vor Beginn der Reizung zur Verfügung. Die Bildverarbeitung geschah in Echtzeit, so daß die zeitliche Auflösung der Messung der Videofrequenz von 50 Halbbildern pro Sekunde entsprach. Die Signale wurden in einem späteren Schritt mit NIH-Image-Software ausgewertet (s.o.).

2.4 Registrierung von Feldpotentialen

2.4.1 Herstellung der Feldpotentialelektroden

Mit Hilfe von Glasmikroelektroden wurden extrazelluläre Feldpotentiale registriert. Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1 mm wurden mit einem Puller (P-87, Sutter Instrument Co.) zu einer Spitze ausgezogen. Anschließend wurde die Elektrode mit 500 mM NaCl gefüllt und vorhandene Luftblasen durch Unterdruck im Exsikkator entfernt. Danach wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt und die hintere Öffnung der Elektrode mit Deiberit verschlossen.

2.4.2 Positionierung der Feldpotentialelektrode im erregten Areal

Zuerst wurde die Reizelektrode im Hirnschnitt positioniert und ein intrinsisch optisches Signal ausgelöst. Die gewünschte Position der Feldpotentialelektrode wurde dann auf dem Videobildschirm markiert. Die Elektrode konnte dann unter Sicht mit einem Mikromanipulator an der gewählten Stelle im Schnitt positioniert werden. Mit einem Extrazellulärverstärker (LSE, Münster) wurden die Signale der

Feldpotentialelektroden verstärkt, direkt digitalisiert (CED 1401, Science Products Inc.) und gleichzeitig mit einer DC-Tonbandmaschine (Store 4 DS, Racal) aufgezeichnet.

2.5 Kalium- und Tetramethylammonium- Messungen mit ionensensitiven Mikroelektroden

Mit Hilfe der Technik der ionensensitiven Mikroelektroden können freie Konzentrationen von ein- und zweiwertigen Ionen in wässrigen Lösungen selektiv gemessen werden. Die Meßgröße der ionensensitiven Mikroelektroden ist die Potentialdifferenz E , also eine elektrische Spannung. In erster Näherung ist der Betrag dieser Spannung dem Logarithmus der freien Konzentration des zu messenden Ions in der Meßlösung direkt proportional. Jede ionenselektive Mikroelektrode weist neben der Sensitivität für das Meßion auch Nebensensitivitäten für andere Ionensorten auf, die im allgemeinen um Größenordnungen unter der des Meßions liegen. Diese Nebensensitivitäten werden durch Selektivitätskoeffizienten K_{ij}^{pot} charakterisiert. In zweiter Näherung wird die Funktion der Meßgröße ionenselektiver Mikroelektroden durch die Nicholsky- Eisenman-Gleichung (Eisenman, 1962) beschrieben:

$$E = E_0 + s \cdot \log [a_i + \sum K_{ij}^{\text{pot}} (a_j)^{z_i/z_j}]$$

E	:	Meßgröße der ISGM
E ₀	:	Meßgröße unter Standardbedingungen
s	:	Nernst'sche Gleichung (s = 58.8 mV/ Dekade bei 22°C)
a _i	:	freie Konzentration des Meßions
a _j	:	freie Konzentration des Störions
z _i	:	Ladungszahl des Meßions
z _j	:	Ladungszahl des Störions
K _{ij} ^{pot}	:	Selektivitätskoeffizient

Ionenselektive Mikroelektroden wurden verwendet, um im Hirnschnitt zeitinduzierte Veränderungen in der extrazellulären Kaliumkonzentration oder Änderungen des Extrazellulärraumvolumens (indirekt durch Änderung der Tetramethylammonium-Konzentration) zu registrieren (s. 2.6).

2.5.1 Bau ionensensitiver Mikroelektroden

a) Ziehen doppelläufiger Glasmikroelektroden

Zwei 75 mm lange Glaskapillaren mit unterschiedlichem Durchmesser (1,5 mm und 1,0 mm Außendurchmesser) mit Filament (Science Products Inc.) wurden mit ihren Enden 5 mm versetzt mit dem Zweikomponenten-Kleber Araldit (Roth) parallel verklebt. Diese Rohlinge wurden zur Aushärtung des Klebers eine Stunde bei 80°C im Wärmeschrank inkubiert.

Danach wurden die Rohlinge in einem mehrstufigen Prozeß mit einem Puller (Getra, München) zu Elektroden ausgezogen. Dazu wurden zuerst nach 30 Sekunden größter Hitze beide Kapillaren um 180° umeinander gedreht und um 2 mm vorgezogen. So wurden die Kapillaren fest miteinander verbunden und konnten zu einer gemeinsamen Spitze ausgezogen werden. Danach wurde der Rohling im Glühwendel neu zentriert und bei mittlerer Hitze zu einer doppelläufigen Glasmikroelektrode ausgezogen.

b) Silanisierung des Zentralkanals (1,5 mm Außendurchmesser)

Die gezogenen Mikroelektroden bestehen aus Borosilikat und besitzen damit wie die meisten Glassorten eine stark hydrophile Oberfläche. Bei der Herstellung der ionensensitiven Mikroelektroden muß der größere Kanal, Zentralkanal genannt, in der Spitze mit einem hydrophoben Gemisch aus verschiedenen Substanzen (Sensor) gefüllt werden. Dieser Sensor basiert auf einem hydrophoben Lösungsmittel und bewirkt die Ionenselektivität der Elektroden. Damit der Sensor nicht durch die zu messenden wäßrigen Lösungen aus der Spitze der Elektrode verdrängt werden kann, muß die innere Oberfläche des Zentralkanals hydrophobisiert werden. Dies wurde mit Hilfe von Hexamethyldisilazan (HMDS, Sigma) erreicht, welches mit den

hydrophil wirkenden Hydroxyl-Gruppen an der Oberfläche des Glases reagiert und diese mit hydrophoben Siliziumverbindungen absättigt.

Der zweite Kanal, Referenzkanal genannt, wird mit einer Elektrolytlösung gefüllt und muß vor der Silanisierung geschützt werden. Dazu wurde dieser Kanal vorher mit destilliertem Wasser gefüllt. Mit einer Glasspritze mit Stahlkanüle wurden dann in den Zentralkanal wenige Tropfen HMDS gefüllt. Anschließend wurden die Elektroden 15 Minuten auf eine 250°C heiße Heizplatte gelegt. Überflüssiges HMDS und das Wasser im Referenzkanal verdampften so unter Hitzeeinwirkung. Die Elektroden wurden dann bis zum weiteren Füllen in einem luftdicht verschlossenen Gefäß und zum Schutz vor Feuchtigkeit auf Blaugel (Behr Labor-Technik) aufbewahrt.

Beim Füllen der Elektroden wurden zuerst wenige Tropfen des K^+ -selektiven Sensors (K-Austauscher 477317, WPI früher Corning) mit Hilfe eines Mikrofilaments in den Zentralkanal eingefüllt. Die entstehenden Luftblasen wurden durch Unterdruck im Exsikkator entfernt. Danach wurde der Referenzkanal mit einer 500 mM NaCl-Lösung gefüllt und der Sensor im Zentralkanal mit 200 mM KCl- (bei K^+ -sensitiven Elektroden) oder 200 mM TetramethylammoniumCl-Lösung (bei TMA^+ -sensitiven Elektroden) überschichtet. Auch hier wurden die entstehenden Luftblasen durch Unterdruck im Exsikkator entfernt. Anschließend wurde in beide Kanäle ein chlorierter Silberdraht eingeführt und die hinteren Enden der Elektroden mit Deiberit, einem durch Hitze verflüssigbaren Wachs, verschlossen, um sie gegen Austrocknen zu schützen.

2.5.2 Eichung der ionensensitiven Mikroelektroden

Vor jedem Versuch wurden die ionensensitiven Mikroelektroden geeicht. Dazu wurden die Elektroden in der Versuchskammer mit mehreren Eichlösungen mit verschiedenen Kalium- oder Tetramethylammonium (TMA^+)-Konzentrationen überspült (Abb. 1-3). Die Eichlösungen entsprachen in ihrer Zusammensetzung weitgehend der aCSF, mit der die Hirnschnitte perfundiert wurden. Auf diese Weise wurden die Nebensensitivitäten, wie sie während des Versuchs auftraten, schon während der Eichung berücksichtigt.

Alle Eichlösungen wurden mit HEPES auf einen pH- Wert von 7.4 (gleich dem pH-Wert der aCSF) gepuffert. Die Osmolarität der verschiedenen Lösungen wurde konstant gehalten. Dazu wurden equimolare Mengen an NaCl, wenn die Konzentration des Meßions von der Konzentration in der aCSF- Lösung abwich, entweder zugegeben oder weggelassen. Eine Übersicht über die ionale Zusammensetzung der Eichlösungen gibt Tabelle 2 (A: K^+ -Eichlösungen, B: TMA^+ -Eichlösungen):

A: K⁺-Eichlösungen (alle Angaben in mM)

	2 K⁺	5 K⁺	10 K⁺	20 K⁺
NaCl	141	138	133	123
NaH₂PO₄	1.25	1.25	1.25	1.25
KCl	2	5	10	20
CaCl₂	2	2	2	2
MgSO₄	2	2	2	2
Glucose	10	10	10	10
HEPES	10	10	10	10

B: TMA⁺- Eichlösungen (alle Angaben in mM)

	5 TMA⁺	10 TMA⁺	20 TMA⁺	50 TMA⁺
NaCl	135	130	120	90
TMACl	5	10	20	50
NaH₂PO₄	1.25	1.25	1.25	1.25
KCl	3	3	3	3
CaCl₂	2	2	2	2
MgSO₄	2	2	2	2
Glucose	10	10	10	10
HEPES	10	10	10	10

Tab. 2: A: K⁺-Eichlösungen B: TMA⁺- Eichlösungen

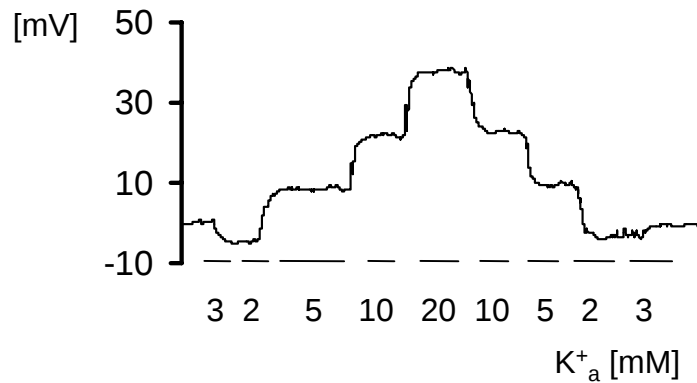


Abb. 1: Darstellung der Eichkurve einer Kalium-selektiven Mikroelektrode. Die ionensensitive Mikroelektrode wurde mit Eichlösungen, mit unterschiedlichen Konzentrationen von KCl überspült.

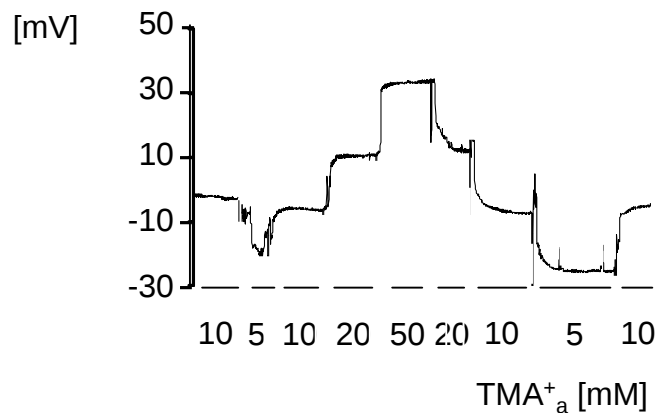


Abb. 2: Darstellung der Eichkurve einer TMA^+ -selektiven Mikroelektrode. Die ionensensitive Mikroelektrode wurde mit Eichlösungen, mit den Konzentrationen 5, 10, 20 und 50 mM TMACl überspült.

Vor jedem Experiment wurde die Grundlinie beider Kanäle vor dem Einstich der Elektroden in das Gewebe auf 0 mV abgeglichen und während des Experiments nicht verändert. Bei den Versuchen, bei denen zwischendurch zu einer aCSF mit erniedrigter Chlorid-Lösung gewechselt wurde, mußte wegen der unterschiedlichen Chlorid-Konzentrationen und des daraus entstehenden unterschiedlichen *liquid junction potentials* zwischen Elektrode und Badlösung noch einmal auf 0 mV abgeglichen werden.

2.6 Messung der reizinduzierten Änderung des Extrazellulärraumvolumens

Volumenänderungen können mit Hilfe von intrinsisch optischen Methoden sichtbar gemacht werden (s. 2.2). Da in der Literatur noch diskutiert wird (Witte et al., 2001), welche Ursachen und Ereignisse zusätzlich neben den Änderungen des Extrazellulärraums zur Entstehung der intrinsisch optischen Signale beitragen, wurden die Änderungen des Extrazellulärraums in einigen Versuchen zusätzlich indirekt über Konzentrationsveränderungen von Tetramethylammonium (TMA^+) registriert. Dieses Ion verbleibt zum größten Teil im Extrazellulärraum. Ransom et al. (1985), Huang und Karowski (1992) beschreiben die Messung von Extrazellulärraumvolumen-Veränderungen durch die Registrierung der Konzentration eines auf den extrazellulären Raum beschränkten Markermoleküls. In den Experimenten wurden 10 mM TMAcI durch equimolare Mengen NaCl ersetzt (Eichkurve s. Abb.2). Unter diesen Bedingungen ist die ionensensitive Mikroelektrode blind für Änderungen der K^+ -Konzentration (Huang und Karowski, 1992). Da TMA^+ nur in vernachlässigbaren Mengen in das intrazelluläre Kompartiment übertritt (Nicholson und Phillips, 1981), können Änderungen in der TMA^+ -Konzentration als Schwankungen des Extrazellulärraumvolumens interpretiert werden. Die relativen Änderungen im

Extrazellulärraumvolumen ΔV) wurden mit Hilfe folgender Gleichung aus den Konzentrationsänderungen berechnet (Dietzel et al., 1980):

$$\Delta V [\%] = (1 - [\text{TMA}^+]_0 \text{ vor Aktivität} / [\text{TMA}^+]_0 \text{ nach Aktivität}) \cdot 100$$

2.7 Pharmakologische Substanzen

Zur Untersuchung der Aquaporin-Regulation wurden folgende Substanzen eingesetzt:

- a) in Phosphat-Puffer (pH = 7.4) gelöst: (Arg⁸)-Vasopressin (500 nM, Bachem), [Phe², Ile³, Orn⁸]-Vasopressin (entspricht [Phe², Orn⁸]-Vasotocin) (500 nM, Peninsula Laboratories), (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin (500nM, Bachem), (Deamino-Cys¹, D-Arg⁸)-Vasopressin (DDAVP) (500nM, Bachem), (d(CH₂)₅¹, D-Ile⁴, Arg⁸, Ala-NH₂⁹)-Vasopressin (500nM, Bachem)
- b) in Dimethylsulfoxid (Merck) gelöst: Bisindolylmaleimide I (300nM, 2μM, Calbiochem), Thapsigargin (1μM, ICN).

2.8 Auswertung der SD-Verläufe (Fächer/ Zeit) in Anlehnung an das Hodgkin-Huxley-Modell der Depolarisation

Hodgkin und Huxley stellten (1952d) ein Modell vor, indem die Kinetiken bei Depolarisationsprozessen beschrieben wurde. Der Verlauf einer SD entspricht weitestgehend diesen Prozessen (Abb. 3), wobei der Zeitverlauf deutlich verlangsamt ist. Mit Hilfe dieses Modells wurden die Aktivierung und die Inaktivierung des SD-Prozesses bei Kontrollversuchen und bei pharmakologischen Versuchen bestimmt. Der reale (gemessene) Verlauf (rot) setzt sich aus den Komponenten Aktivierung (blau), Inaktivierung (grün) und der Amplitude (A_{exp}) zusammen. Mit Hilfe des Software-Programms Neuron (zur Verfügung

gestellt von W. Wadmann, Amsterdam) wurde die Funktion der Kurvenverläufe ermittelt. Der Anstieg und der Abfall der Kurven wurde iterativ (durch eine Fitfunktion) angeglichen. Mit Hilfe der Fitfunktionen wurden τ der Aktivierung (τ_{Akt} , Zeitpunkt, an dem die Fläche der SD auf 37 % angestiegen ist) und τ der Inaktivierung (τ_{Inakt} , Zeitpunkt, an dem die Fläche der SD auf 37 % abgefallen ist) berechnet.

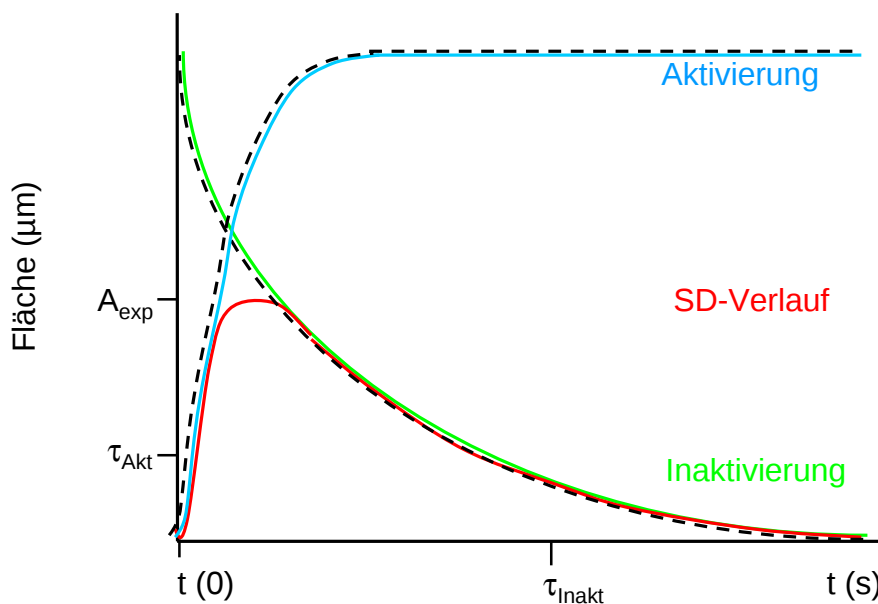


Abb. 3: Depolarisations-Modell nach Hogkin und Huxley. Der gemessene SD-Verlauf (rot) setzt sich aus den Komponenten Aktivierung (blau), Inaktivierung (grün) und der Amplitude (A_{exp}) zusammen. τ der Aktivierung (τ_{Akt}) ist der Zeitpunkt, an dem die Fläche der SD auf 37 % angestiegen ist und τ der Inaktivierung (τ_{Inakt}) ist der Zeitpunkt, an dem die Fläche der SD auf 37 % abgefallen ist. Die gestrichelten Linien deuten die Fitfunktionen an, mit denen die τ -Werte ermittelt wurden.

2.9 Statistik

Die statistischen Angaben werden (wenn nicht anders angegeben) in der Form: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes angegeben (n = Anzahl der Tiere). Signifikanzen wurden mit dem T-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation eines radialen, aktivitätsabhängigen Wasserflusses im Neokortex

3.1.1 Elektrische Stimulation in Lamina VI induziert eine Extrazellulärraumaufweitung in Lamina I

Kortikale Hirnschnitte wurden vor Beginn der elektrischen Stimulation 50 Minuten mit einer artifiziellen Zerebrospinallösung (aCSF) mit erniedrigter Chloridlösung vorinkubiert. Diese erniedrigte Chloridlösung bewirkte eine fast vollständige Inhibierung des Chlorid-gekoppelten Kaliumtransports über den Na-K-2Cl-Kotransporter (Holthoff und Witte, 1996). Der vorinkubierte Hirnschnitt wurde dann im Abstand von 10 Minuten mit einer Elektrode in Kortexschicht VI elektrisch stimuliert. Die intrinsisch optischen Signale wurden durch eine Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz ausgelöst. Die Reizstärken lagen zwischen 2 V und 9 V. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μ s. Der durch die Reizserie hervorgerufene Wasserfluß wurde als intrinsisch optisches Signal registriert. Extrazellulärraumaufweitungen führten zu einer Abdunklung, Schrumpfungen zu einer Aufhellung des Signalbildes (Holthoff und Witte, 1996, 2000). Abb. 4 zeigt IOS 6 Sekunden nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht VI. In Schicht IV zeigt sich eine Aufhellung des Signals (Falschfarben codiert: rot, Zellschwellung), in den Schichten I-III eine Abdunklung des Signals (Falschfarben codiert: blau, Extrazellulärraumaufweitung).

Das dunkle IOS (hiernach schwarze Welle genannt) startete in den oberen Kortexschichten (I-III) senkrecht zur Stimulationselektrode und breitete sich tangential mit einer Geschwindigkeit von $115 \pm 13 \mu\text{m/s}$ ($n = 5$) aus. Die schwarze Welle startete $1.9 \pm 0.4 \text{ s}$ ($n = 9$) nach der Stimulation und hielt 1-2 Minuten an. Die Fläche der schwarzen Welle

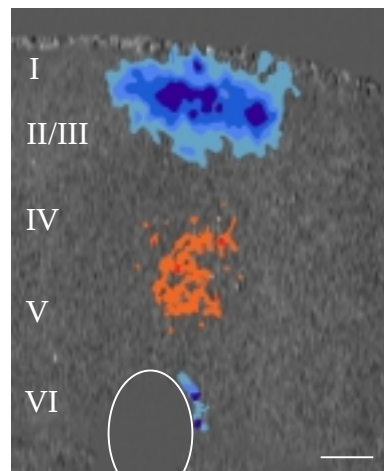


Abb. 4: IOS 6 Sekunden nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht VI. In Schicht IV zeigt sich eine Aufhellung des Signals (Falschfarben codiert: rot, Zellschwellung), in den Schichten I-III eine Abdunklung des Signals (Falschfarben codiert: blau, Extrazellulär-raumaufweitung). Die Stimulationselektrode ist weiß umrandet. Der Eichbalken entspricht 200 μm .

variierte unter Kontrollbedingungen von Hirnschnitt zu Hirnschnitt im Mittel um $281.53 \pm 230.73 \mu\text{m}^2$ ($n = 14$). Die Ausbreitung des Signals wurde jeweils beim Maximum nach der Stimulation gemessen. In Kortexschicht IV konnte eine Aufhellung des Signals registriert werden. Diese Aufhellung korrelierte mit einer Extrazellulär-raumschrumpfung (Zellschwellung) (Holthoff und Witte, 1996, 2000). Diese Zellschwellung wird einer Wasserumverteilung zugeschrieben, die nach einer Aktivierung der Neurone in Schicht VI erfolgt. Die Neurone der Schicht IV werden direkt durch aufsteigende Fasen stimuliert. Daraufhin wird Kalium aus den Neuronen transportiert und muß von den Gliazellen aufgenommen werden. Diese Aufnahme wird von einem Wasserfluß in die Zellen begleitet.

Obwohl in der Literatur beschrieben wird, daß neben Extrazellulärraumveränderungen auch andere Komponenten zur Entstehung der IOS unter extremen Bedingungen (z.B. Zelluntergang, Aitken et al., 1999) beitragen, korrelieren unter diesen Versuchsbedingungen IOS und Extrazellulärraumveränderungen sehr gut miteinander. Die Extrazellulärraumveränderungen wurden indirekt über die Konzentration des nicht membrangängigen Tetramethylammoniums (TMA^+) registriert. Abb. 5 zeigt die Korrelation von IOS und Extrazellulärraumbedingungen in Kortexschicht I nach elektrischer Stimulation in Schicht VI.

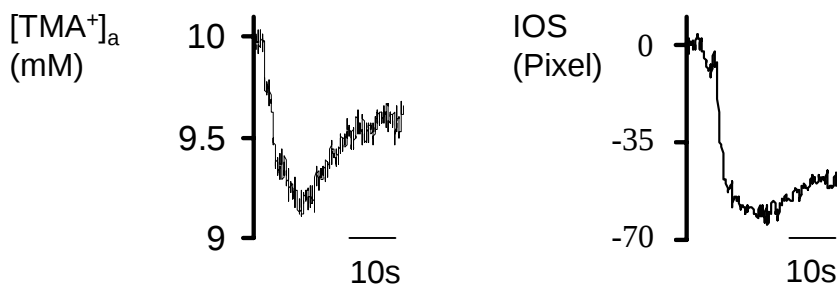


Abb. 5: Korrelation von intrinsisch optischem Signal (IOS) und Extrazellulärraumveränderungen, die indirekt über die Konzentration des nicht membrangängigen Tetramethylammoniums (TMA^+) registriert wurden. Unter den Versuchsbedingungen in dieser Arbeit gibt es eine sehr gute Korrelation zwischen IOS und Extrazellulärraumveränderungen.

3.1.2 Vasopressin verstärkt die induzierte Extrazellulär- raumaufweitung

Eine Superfusion mit [Arg⁸]-Vasopressin (AVP) vergrößerte die Ausbreitung der schwarzen Welle (Abb. 6 B) im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 6 A). Die größere Ausdehnung erfolgte hauptsächlich in tangentialer Richtung. In der radialen Achse des Kortex konnte nur eine kleine Vergrößerung beobachtet werden. Die größere Ausdehnung konnte bereits 10 Minuten nach dem Lösungswechsel beobachtet werden. Ihre maximale Ausdehnung erreichte die schwarze Welle aber erst nach ca. 30 Minuten. Für diese verspätetete Antwort ist wahrscheinlich die langsame Diffusion der Testsubstanz in den Hirnschnitt verantwortlich.

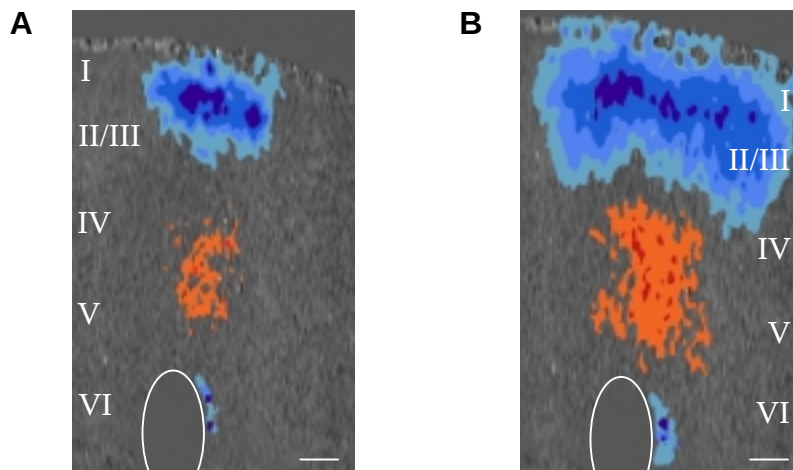


Abb. 6: Vergrößerte Ausbreitung des IOS nach Superfusion mit [Arg⁸]-Vasopressin (AVP) (B) im Vergleich zu Kontrollbedingungen (A). Die größere Ausdehnung erfolgte hauptsächlich in tangentialer Richtung. In der radialen Achse des Kortex konnte nur eine kleine Vergrößerung beobachtet werden. Der Eichbalken entspricht 200 µm.

Die Ausdehnung des hellen Signals in Kortexschicht IV (Abb. 6) (korreliert mit Extrazellulärraumschrumpfung) vergrößerte sich nach Superfusion mit AVP um $368 \pm 157 \%$ ($p < 0.001$, $n = 9$) im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

AVP änderte die Amplitude der Extrazellulärraumaufweitung nicht signifikant. Dies wurde mit TMA⁺-Messungen in Kortexschicht I senkrecht zur Stimulationselektrode registriert. Die TMA⁺-Konzentration verringerte (Grundlevel 10 mM) sich um 0.56 ± 0.4 mM (10 Hirnschnitte von drei Tieren) unter Kontrollbedingungen und um 0.68 ± 0.4 mM (9 Hirnschnitte von drei Tieren) nach Superfusion des Hirnschnitts mit AVP.

3.1.3 Die größere Ausdehnung des IOS durch Vasopressin ist nicht auf eine Veränderung in der Erregbarkeit des Gewebes zurückzuführen

Die AVP-induzierte verstärkte Aufweitung des Extrazellulärraums könnte auch durch eine Veränderung der neuronalen Erregung hervorgerufen worden sein. Um dies auszuschließen, wurden in einigen Experimenten zusätzlich Feldpotentiale registriert. Die Feldpotentialelektrode wurde in Kortexschicht IV plaziert. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Feldpotentialen unter Kontrollbedingungen und nach Superfusion des Hirnschnitts mit AVP ($n = 3$) (Abb. 7). Abb. 8 zeigt zwei Beispiel-Feldpotentiale unter Kontrollbedingungen (A) und nach Superfusion mit AVP (B). Die Feldpotentiale blieben ebenfalls unverändert nach Superfusion mit dem Vasopressin1a-Rezeptorantagonisten (V1a-Antagonist) (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin ($n = 3$) (Abb. 7).

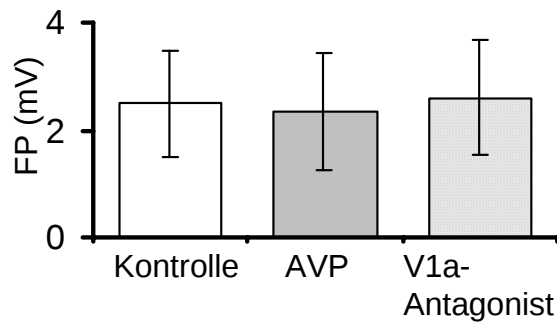


Abb. 7: Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Feldpotentialen unter Kontrollbedingungen nach Superfusion des Hirnschnitts mit AVP oder nach Superfusion mit dem V1a-Antagonisten (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin (jeweils n = 3) festgestellt werden.

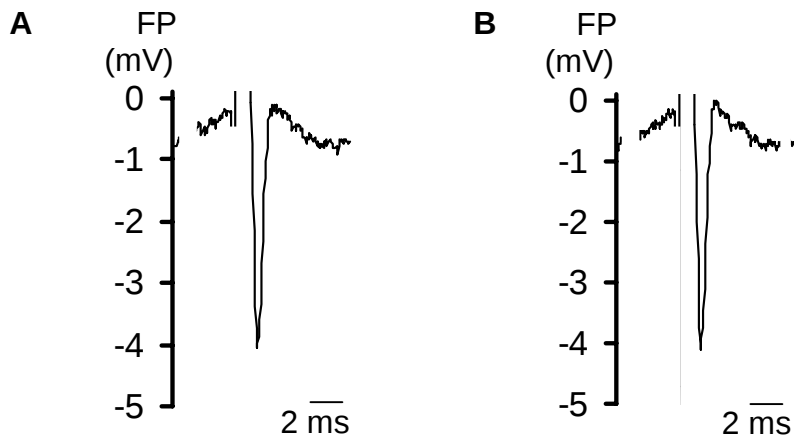


Abb. 8: Beispiel-Feldpotentiale unter Kontrollbedingungen (A) und nach Superfusion mit AVP (B). Es wurde jeweils das fünfte Feldpotential in der Reizserie ausgewählt. Es wurden 100 Reize mit einer Frequenz von 50 Hz ausgelöst. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μ s. Die Feldpotentialelektrode wurde in Kortexschicht IV plaziert.

3.1.4 Messung von Kaliumkonzentrationen

Nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht VI stieg die Kaliumkonzentration sowohl in Schicht IV (wo der Extrazellulärraum schrumpfte), als auch in den oberen Kortexschichten (wo der Extrazellulärraum größer wurde) (Abb. 9 A). Ein ähnlicher Anstieg der Kaliumkonzentration wurde in Hirnschnitten beobachtet, die in Anwesenheit von AVP stimuliert wurden (Abb. 9 B). Die Kaliumkonzentrationen wurden begleitend zur Registrierung der intrinsch optischen Signale mit ionensensitiven Mikroelektroden erfaßt. Vor jedem Versuch wurde die Elektrode mit Eichlösungen mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen überspült und so eine Eichkurve erstellt. (s. Abb. 1 in Material und Methoden).

Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der maximalen Amplitude des Kaliumanstiegs und der räumlichen Ausbreitung der schwarzen Welle (Abb. 10). Die erhöhte Kaliumkonzentration blieb in Kortexschicht IV (24.6 ± 5.4 s) länger bestehen als in Schicht I (13.5 ± 1.4 s, $p < 0.02$, $n = 5$). Der Zeitpunkt des Abfalls des Kaliumsignals änderte sich nicht signifikant nach einer Superfusion mit AVP. Die Verweildauer betrug in Schicht I 13.9 ± 1.4 s und in Schicht IV 27.1 ± 4.2 s (registriert an fünf Hirnschnitten von drei Tieren).

3.1.4 Messung von Kaliumkonzentrationen

Nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht VI stieg die Kaliumkonzentration sowohl in Schicht IV (wo der Extrazellulärraum schrumpfte), als auch in den oberen Kortexschichten (wo der Extrazellulärraum größer wurde) (Abb. 9 A). Ein ähnlicher Anstieg der Kaliumkonzentration wurde in Hirnschnitten beobachtet, die in Anwesenheit von AVP stimuliert wurden (Abb. 9 B). Die Kaliumkonzentrationen wurden begleitend zur Registrierung der intrinsch optischen Signale mit ionensensitiven Mikroelektroden erfaßt. Vor jedem Versuch wurde die Elektrode mit Eichlösungen mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen überspült und so eine Eichkurve erstellt. (s. Abb. 1 in Material und Methoden).

Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der maximalen Amplitude des Kaliumanstiegs und der räumlichen Ausbreitung der schwarzen Welle (Abb. 10). Die erhöhte Kaliumkonzentration blieb in Kortexschicht IV (24.6 ± 5.4 s) länger bestehen als in Schicht I (13.5 ± 1.4 s, $p < 0.02$, $n = 5$). Der Zeitpunkt des Abfalls des Kaliumsignals änderte sich nicht signifikant nach einer Superfusion mit AVP. Die Verweildauer betrug in Schicht I 13.9 ± 1.4 s und in Schicht IV 27.1 ± 4.2 s (registriert an fünf Hirnschnitten von drei Tieren).

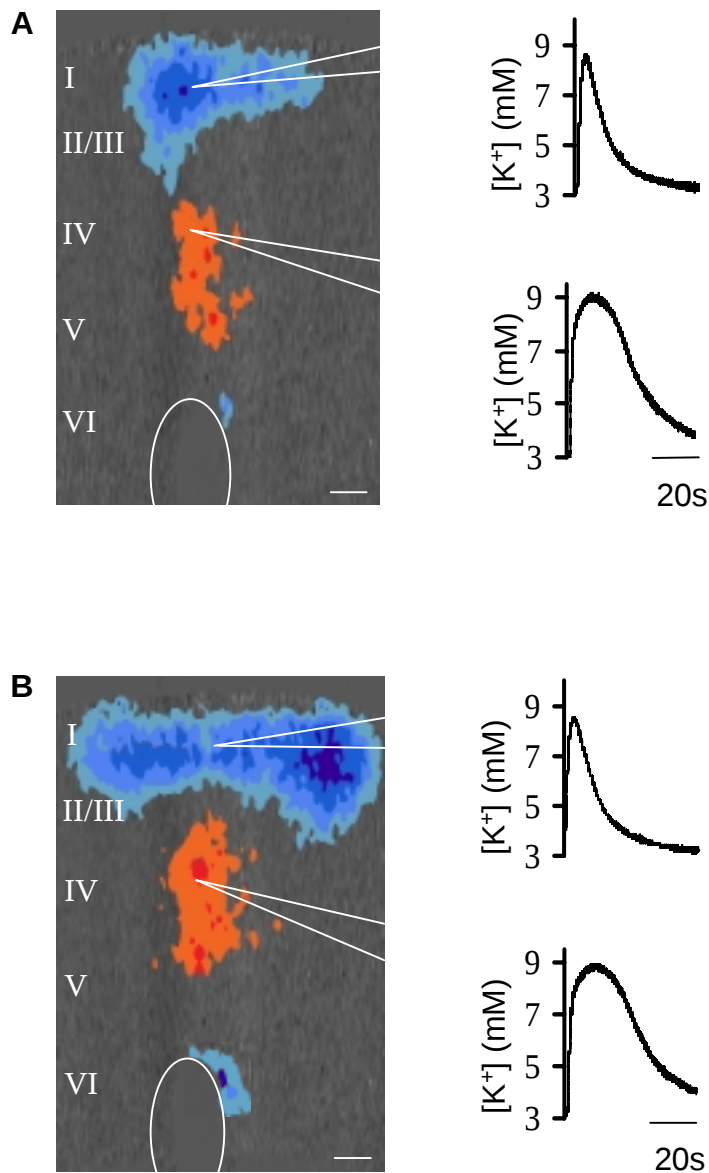


Abb. 9: Kaliumkonzentrationsveränderungen in Kortexschicht I und Schicht IV, die das intrinsisch optische Signal begleiten nach Stimulation in Schicht VI. A zeigt die Konzentrationsveränderungen unter Kontrollbedingungen und B die Veränderungen nach 30 Minuten Superfusion mit AVP. Die erhöhte Kaliumkonzentration blieb in Kortexschicht IV länger bestehen als in Schicht I. Der Zeitpunkt des Abfalls des Kaliumsignals änderte sich nicht signifikant nach einer Superfusion mit AVP. Die Lokalisation der Kaliumsensitiven Mikroelektroden ist durch schematische Elektroden angedeutet. Die Stimulationselektrode ist weiß umrandet. Die Eichbalken entsprechen 200 μm .

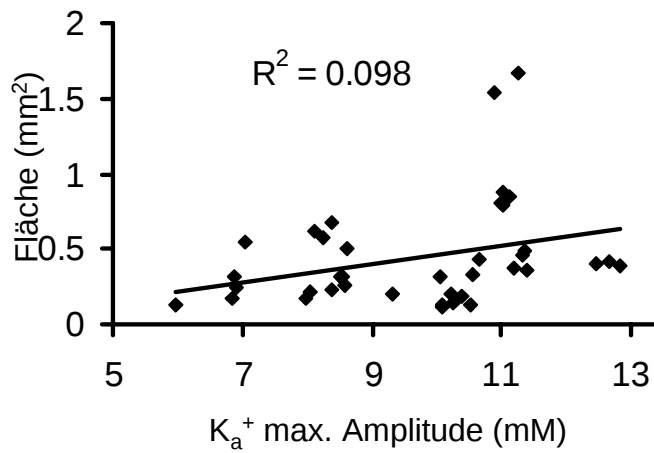


Abb. 10: Darstellung der Größe der Ausbreitung der schwarzen Welle gegenüber der maximalen Kaliumamplitude. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der maximalen Amplitude des Kaliumanstiegs und der räumlichen Ausbreitung der schwarzen Welle. Die Kaliumkonzentrationen wurden mit Kalium-sensitiven Mikroelektroden registriert.

3.1.5 Die Vasopressin induzierte verstärkte Aufweitung erfolgt über den Vasopressin1a-Rezeptor

Welcher Vasopressin-Rezeptor bei der AVP-vermittelten verstärkten Aufweitung des Extrazellulärraums induziert beteiligt ist, wurde durch Applikation von Vasopressin1- Rezeptor (V1) und Vasopressin2- Rezeptor (V2) Agonisten und Antagonisten ermittelt. Hirnschnitte wurden mit den Substanzen überspült und die intrinsisch optischen Signale registriert. Die Ausdehnung der Signale wurden 40 Minuten nach Applikation der Testsubstanzen bestimmt. Alle Agonisten und Antagonisten wurden in der Konzentration 500 nM eingesetzt.

Abb. 11 zeigt ein typisches Experiment mit (Arg8)-Vasopressin (AVP). Nach drei Kontrollstimulationen wurde der Hirnschnitt mit AVP überspült. Dies verursachte eine vergrößerte Ausdehnung der schwarzen Welle. Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μ s. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde jeweils am Maximum der Ausdehnung bestimmt.

[Arg8]-Vasopressin (Abb. 11 und 12) ($n = 9$) und der V1-Agonist [Phe², Orn⁸]-Vasotocin ($n = 3$) (Abb. 12) vergrößerten die Ausdehnung der schwarzen Welle um über 50 %. Der V1a-Antagonist (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin (Abb. 12) verringerte die Ausdehnung der schwarzen Welle ($n = 3$). Dies deutet darauf hin, daß endogene V1-Agonisten einen anhaltenden begünstigenden Effekt ausüben. Der V2-Agonist (Deamino-Cys¹, D-Arg⁸)-Vasopressin (DDAVP) (Abb. 12) hatte keinen Effekt auf die Größe der Ausdehnung. Ebenfalls keinen Effekt hatte der V2-Antagonist (d(CH₂)₅¹, D-Ile⁴, Arg⁸, Ala-NH₂⁹)-Vasopressin (Abb. 12). Die Größe

der Ausdehnung wurde 40 Minuten nach Applikation der Testsubstanz bestimmt.

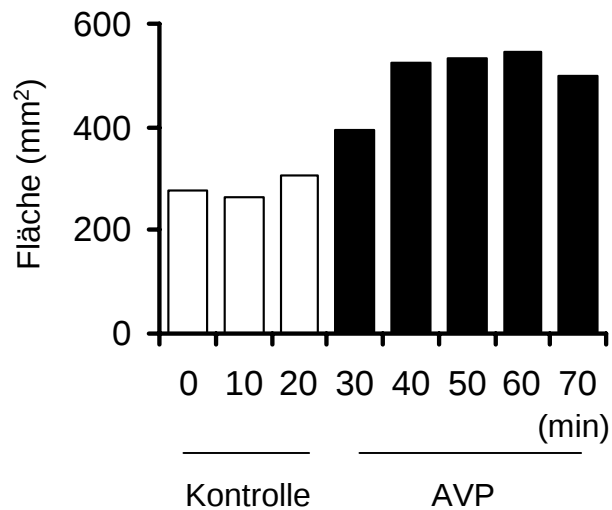


Abb. 11: Typisches Experiment mit (Arg8)-Vasopressin (AVP). Nach drei Kontrollstimulationen wurde der Hirnschnitt mit AVP überspült. Dies verursachte eine vergrößerte Ausdehnung der schwarzen Welle. Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μ s. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde jeweils am Maximum der Ausdehnung bestimmt.

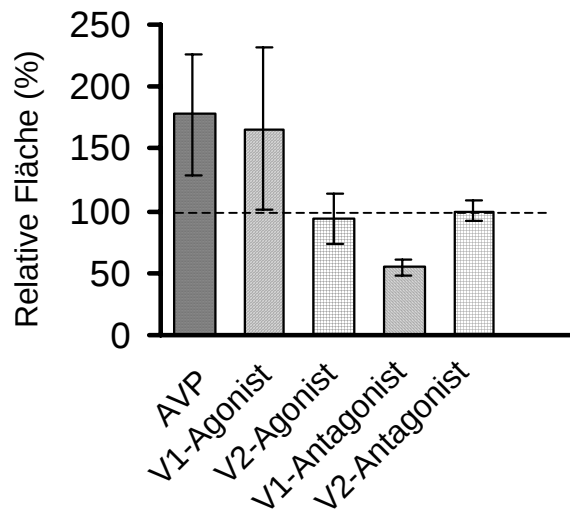


Abb. 12: Pharmakologische Einflüsse auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle. (Arg⁸)-Vasopressin (n = 9) und der V1-Agonist (Phe², Orn⁸)-Vasotocin (n = 3) vergrößerten die Ausdehnung der schwarzen Welle um über 50 %. Der V1a-Antagonist (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin verringerte die Ausdehnung der schwarzen Welle (n = 3). Der V2-Agonist (Deamino-Cys¹, D-Arg⁸)-Vasopressin (DDAVP) und der V2-Antagonist (d(CH₂)₅¹, D-Ile⁴, Arg⁸, Ala-NH₂⁹)-Vasopressin hatten keinen Effekt auf die Größe der Ausdehnung. Die Größe der Ausdehnung wurde 40 Minuten nach Applikation der Testsubstanz bestimmt. Die Differenz der Größenänderung zwischen AVP (n = 9) und dem V1-Agonisten (n = 3) war statistisch nicht signifikant (p> 0.05). Die Größenveränderung beider Substanzen im Vergleich zur Kontrolle sind statistisch signifikant (p<0.05). Ebenfalls signifikant ist die Verringerung der Ausdehnung durch den V1-Antagonisten (n = 3) im Vergleich zur Kontrolle (p<0.05). Die gestrichelte Linie zeigt den Kontrollwert.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der AVP-vermittelten Größenänderung der schwarzen Welle ($n = 9$) und der V1-Agonisten-vermittelten Größenänderung ($n = 3$) ($p > 0,05$). Die induzierte Größenveränderung beider Substanzen im Vergleich zur Kontrolle sind statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 12). Ebenfalls signifikant ist die Verringerung der Ausdehnung durch den V1-Antagonisten ($n = 3$) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) (Abb. 12).

Nachdem der V1-Antagonist appliziert worden ist, hat AVP keinen begünstigenden Effekt mehr auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle. Abb. 13 zeigt, daß die Ausdehnung sich trotz AVP (appliziert nach einer kurzen Auswaschphase mit der Kontrolllösung) noch weiter verringert.

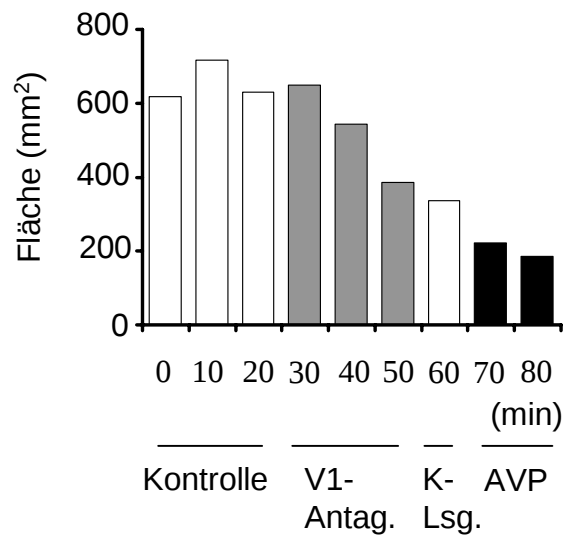


Abb. 13: AVP hat keinen weiteren begünstigenden Effekt auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle nach Applikation des V1-Antagonisten. Die Ausdehnung verringert sich trotz AVP (appliziert nach einer kurzen Auswaschphase mit der Kontrolllösung) sogar noch weiter. Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μ s. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde jeweils am Maximum der Ausdehnung bestimmt. K-Lsg.: Lösung, die unter Kontrollbedingungen verwendet wurde.

3.1. 6 Der AVP-Effekt ist Kalziumabhängig

V1a-Rezeptoren sind über G-Proteine an Phospholipase C gekoppelt (Thibonnier et al., 1994). Phospholipase C bewirkt eine Aktivierung von Inositol-1, 4, 5-Triphosphat (IP_3), welches u.a. einen Kalzium-Ausstrom aus den intrazellulären Kalziumspeichern zur Folge hat. Welche Rolle intrazelluläre Kalziumspeicher beim AVP-Effekt spielen, wurde durch Applikation von Thapsigargin ($1\ \mu M$, 60 Minuten) untersucht. Thapsigargin inhibiert die Ca^{2+} ATP-ase des Endoplasmatischen Reticulums (SERCA) und verhindert ein Wiederauffüllen der Ca^{2+} -Speicher (Norup et al., 1986).

Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug $200\ \mu s$. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde jeweils am Maximum der Ausdehnung bestimmt. Die Ausdehnung der schwarzen Welle wurde durch Thapsigargin verringert (Abb. 14 und 15). Abb. 14 zeigt ein typisches Thapsigargin-Experiment. Nach drei Kontrollstimulationen wurde für 60 Minuten Thapsigargin ($1\ \mu M$) appliziert.

In der Anwesenheit von Thapsigargin hatte AVP keinen begünstigenden Effekt auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle mehr (Abb. 15). Es wurde die Fläche der Ausdehnung nach 60 Minuten Thapsigargin Applikation verglichen mit der Fläche nach 30 Minuten Thapsigargin gefolgt von 30 Minuten Thapsigargin plus AVP ($500\ nM$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Flächen ($p > 0,05$). Der Unterschied zu Kontrollwerten war in beiden Fällen signifikant ($p < 0,05$).

Abb. 16 zeigt ein typisches Kontrollexperiment. Um zu zeigen, daß die Ausdehnung der schwarzen Welle unter Kontrollbedingungen (nach

den ersten drei Teststimulationen im pharmakologischen Experiment) stabil bleibt, wurden 90 Minuten lang Hirnschnitte im Intervall von 10 Minuten stimuliert. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle änderte sich vom dritten Teststimulus zu allen weiteren nicht signifikant ($p < 0.5$, $n = 3$).

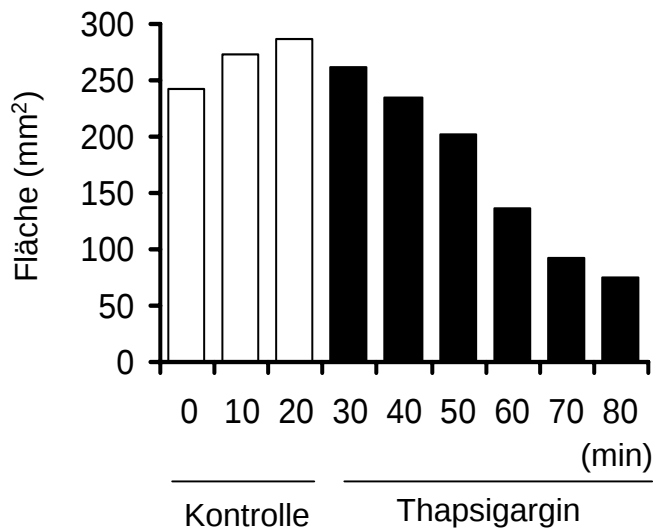


Abb. 14: Darstellung eines typischen Thapsigargin-Experiments. Nach drei Kontrollstimulationen wurde für 60 Minuten Thapsigargin (1 μM) appliziert. Die Ausdehnung der schwarzen Welle wurde durch Thapsigargin verringert. Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Reizlänge des Einzelreizes betrug 200 μs . Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde jeweils am Maximum der Ausdehnung bestimmt.

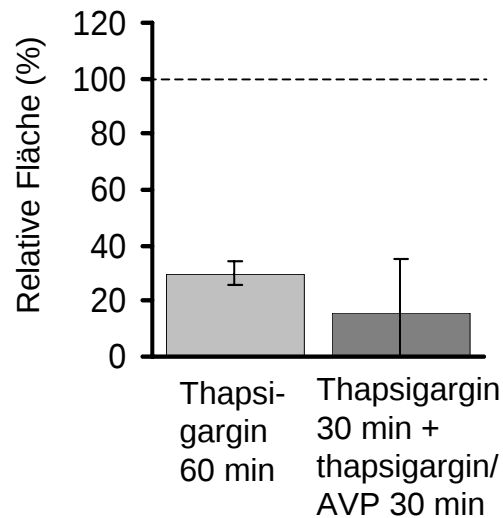


Abb. 15: Die Ausdehnung der schwarzen Welle wurde durch Thapsigargin verringert. Nach drei Kontrollstimulationen wurde für 60 Minuten Thapsigargin (1 μ M) appliziert. Die Hirnschnitte wurden alle 10 Minuten mit einer Serie von 100 Reizen mit einer Frequenz von 50 Hz stimuliert. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle wurde am Maximum der Ausdehnung nach 60 Minuten Applikation bestimmt. In der Anwesenheit von Thapsigargin hatte AVP keinen begünstigenden Effekt auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle mehr. Vergleicht man die Fläche der Ausdehnung nach 60 Minuten Thapsigargin Applikation mit der Fläche nach 30 Minuten Thapsigargin gefolgt von 30 Minuten Thapsigargin plus AVP (500 nM) ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Flächen ($p > 0,05$). Der Unterschied zu Kontrollwerten war in beiden Fällen signifikant ($p < 0,05$). Die gestrichelte Linie zeigt den Kontrollwert.

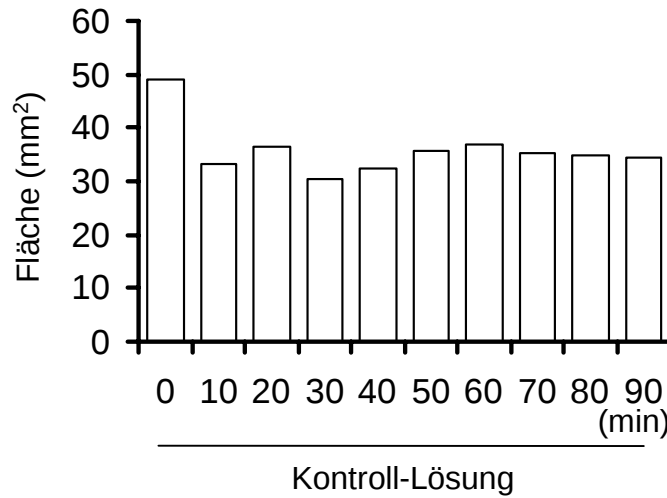


Abb. 16: Darstellung eines typischen Kontrollexperiments. Um zu zeigen, daß die Ausdehnung der schwarzen Welle unter Kontrollbedingungen (nach den ersten drei Teststimulationen im pharmakologischen Experiment) stabil bleibt, wurden 90 Minuten lang Hirnschnitte im Intervall von 10 Minuten stimuliert. Die Fläche der Ausdehnung der schwarzen Welle änderte sich vom dritten Teststimulus zu allen weiteren nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 3$). Mit Kontroll-Lösung ist die in allen pharmakologischen Experimenten verwendete aCSF mit erniedrigtem Chlorid gemeint.

3.1.7 Phosphokinase C ist an der AVP-induzierten Vergrößerung der Ausdehnung der schwarzen Welle beteiligt

V1a-Rezeptoren sind über G-Proteine an Phospholipase C gekoppelt (Thibonnier et al., 1994). Phospholipase C bewirkt eine Aktivierung von Phosphokinase C. Ob Phosphokinase C (PKC) eine Rolle beim AVP-Effekt spielt, wurde mit simultaner Applikation von PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIS I) und AVP (500 nM) untersucht. BIS I wurde in den Konzentrationen 2 μ M (n = 5) und 300 nM (n = 4) eingesetzt. BIS I blockierte den begünstigenden Effekt, den AVP auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle hatte, in beiden Konzentrationen (Abb. 17). Die Ausdehnung verringerte sich sogar unter das Kontrollniveau. Die Hirnschnitte wurden in einem Intervall von 10 Minuten stimuliert. Die Fläche der Ausdehnung wurde am Maximum nach 60 Minuten BIS I (2 μ M oder 300 nM) plus AVP bestimmt. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Verringerung der Ausdehnung zwischen den verschiedenen Konzentrationen an BIS I (2 μ M, 300 nM) ($p > 0,05$). Beide Konzentrationen hatten aber eine signifikante Verringerung der Ausdehnung der schwarzen Welle zur Folge ($p < 0,05$).

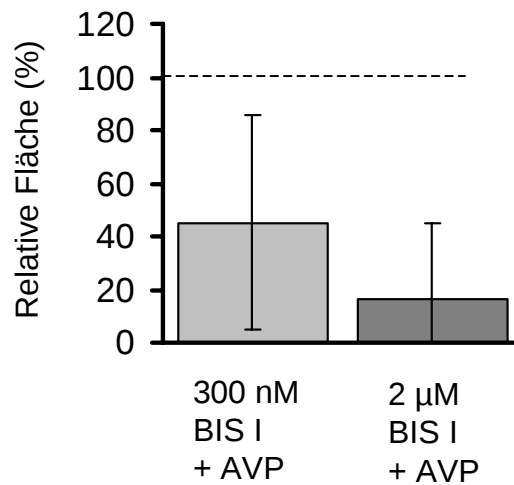


Abb. 17: Der Phosphokinase C-Inhibitors Bisindolylmaleimide I (BIS I) blockiert den begünstigenden Effekt von AVP auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle. Um zu testen, ob Phosphokinase C (PKC) eine Rolle beim AVP-Effekt spielt, wurde der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIS I) simultan mit AVP (500 nM) appliziert. BIS I wurde in den Konzentrationen 2 μM (n = 5) und 300 nM (n = 4) eingesetzt. BIS I blockierte den begünstigenden Effekt, den AVP auf die Größe der Ausdehnung der schwarzen Welle hatte, in beiden Konzentrationen. Die Ausdehnung verringerte sich sogar unter das Kontrollniveau. Die Hirnschnitte wurden in einem Intervall von 10 Minuten stimuliert. Die Fläche der Ausdehnung wurde am Maximum nach 60 Minuten bestimmt. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Verringerung der Ausdehnung zwischen den verschiedenen Konzentrationen an BIS I (2 μM, 300 nM) ($p > 0,05$). Beide Konzentrationen hatten aber eine signifikante Verringerung der Ausdehnung der schwarzen Welle zur Folge ($p < 0,05$). Die gestrichelte Linie zeigt den Kontrollwert an.

3.1.8 AQP4-Verteilung in AVP behandelten Hirnschnitten

Hirnschnitte, die im Experiment 60 Minuten mit AVP überspült worden waren, wurden immunhistochemisch auf das AQP4-Verteilungsmuster hin untersucht. Die immunhistochemische Aufbereitung wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. O.P. Ottersen (Anatomisches Institut der Universität von Oslo, Norwegen) durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen an AVP-behandelten Hirnschnitten zeigten eine intensive AQP4-Markierung im Bereich der Pia und in der Umgebung der Blutgefäße (Abb. 18 A und B). Das Verteilungsmuster der AQP4-Markierungen war nicht unterscheidbar von Kontroll-Hirnschnitten (nicht gezeigt). Extrazerebrale Blutgefäße zeigten keine Markierung (Abb. 18 B). Dies stimmt mit den Immunogold-Markierungen (Abb. 18 C) überein. Diese zeigen, eine Markierung von AQP4 in Astrozyten-Endfüßen, die die Blutgefäße umgeben, aber keine Markierung der Endothelzellen. Hohe Dichten an Goldpartikel wurden auch entlang der glialen Plasmamembran zur Pia hin beobachtet (nicht gezeigt). Andere Bereiche der astrozytären Plasmamembran waren ebenfalls markiert, aber mit geringerer Intensität. Die Verteilung der AQP4-Markierung in nachträglich fixierten kortikalen Hirnschnitten unterschied sich nicht vom Verteilungsmuster in perfundiert fixierten Hirnen.

Abb. 18: AQP4-Verteilungsmuster in Vasopressin-behandelten Hirnschnitten. A und B: Immunfluoreszenz-Markierungen von AQP4 in Vasopressin-behandelten Hirnschnitten. A: Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen an AVP-behandelten Hirnschnitten zeigten eine intensive AQP4-Markierung im Bereich der Pia und in der Umgebung der Blutgefäße. Doppelpfeile weisen auf die Markierung der glialen Plasmamembran, die an die Pia grenzen, hin. Kurze Pfeile weisen auf gliale Endfüße, die die Blutgefäße umgeben, hin. B: In dieser Vergrößerung ist ein unmarkiertes Blutgefäß (Pfeil) der Pia zu sehen. Die Eichbalken entsprechen 20 µm. C und D: Immunogold-Markierung von AQP4. C: AQP4-Markierung eines glialen Endfußes, der ein kollabiertes Blutgefäß umgibt. D: Elektronenmikroskopische Aufnahme von AQP4-Markierungen von glialen Plasmamembranen gegenüber eines pialen Blutgefäßes im parietalen Kortex der Ratte. Das Verteilungsmuster der AQP4-Markierungen war nicht unterscheidbar von Kontroll-Hirnschnitten (nicht gezeigt). Die Verteilung der AQP4-Markierung in nachträglich fixierten kortikalen Hirnschnitten unterschied sich nicht vom Verteilungsmuster in perfundiert fixierten Hirnen (D). P = Pia, V = Lumen des Blutgefäßes, B = Basal-Lamina, G = glialer Fortsatz. Die Eichbalken entsprechen 0.3 µm.

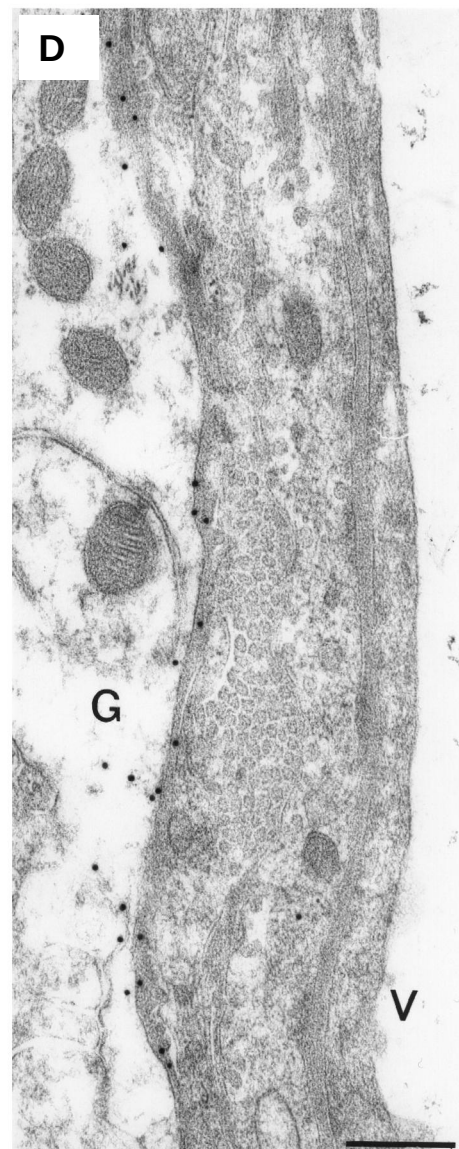
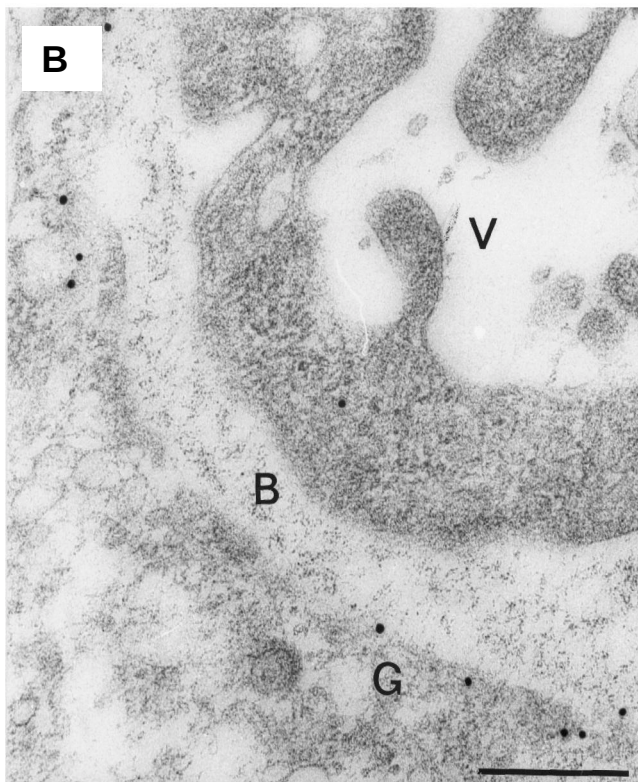
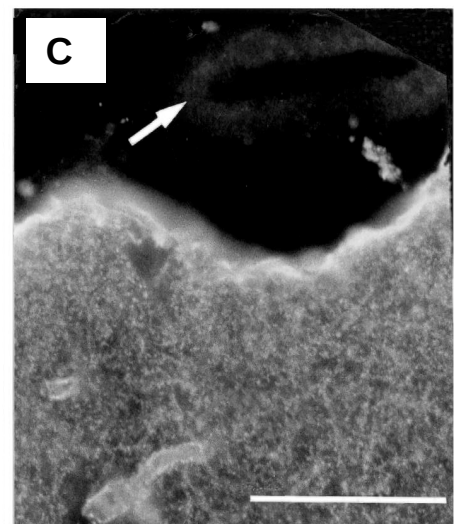
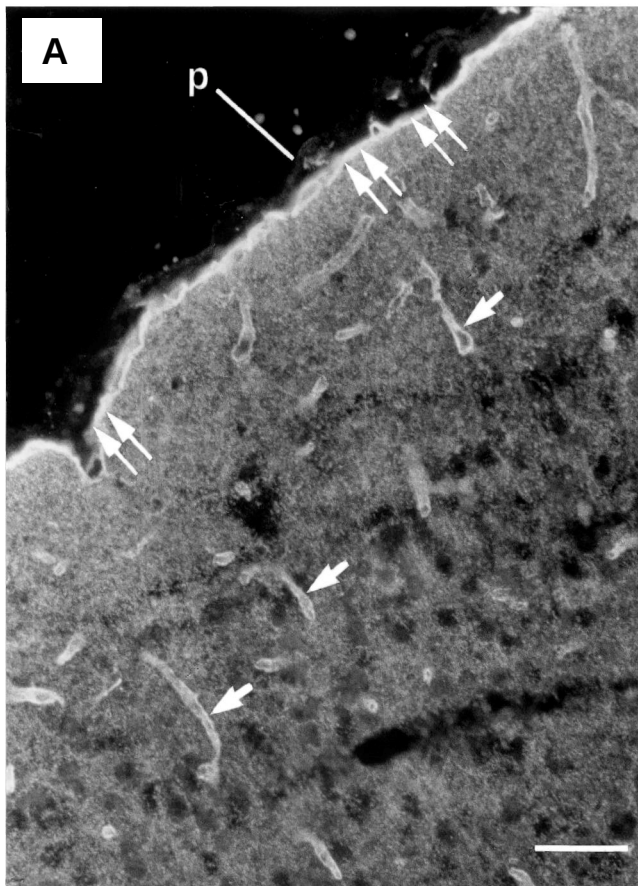


Abb. 18: Abb.-Legende s. vorhergehende Seite

3.2 Modulation von *spreading depressions* durch einen Vasopressin1a-Rezeptorantagonisten

3.2.1 Auslösung von *spreading depressions* durch Kaliumchlorid

Spreading depressions (SDs) lassen sich unter anderem durch hohe Kaliumkonzentrationen auslösen (s. Einleitung). In der vorliegenden Arbeit wurde die *spreading depression* durch Applikation von Kalium hervorgerufen. Um das Modell den Bedingungen nach einem ischämischen Insult besser anzupassen, wurde nicht lokal in einem kleinen Punkt mit einer Applikationskanüle in den Hirnschnitt eingestochen, sondern ein Tropfen 1 mol/l KCl-Lösung herangespült. Im Gegensatz zu einer eher punktförmigen Applikation wird hier ein etwas größeres Areal mit unterschiedlich hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen konfrontiert, genau wie beim Gewebeuntergang nach einem ischämischen Insult.

Die SDs wurden mit Hilfe von intrinsisch optischen Signalen als zweiphasige sich ausbreitende Welle (mit einem hellen und einem dunklen Anteil) registriert. Damit die Signale deutlicher zu erkennen waren, wurde vor dem Auslösen jeder SD mit Hilfe eines Videometrieprozessors über 64 Bilder gemittelt und dieses Bild dann vom Hintergrundbild abgezogen. Die SD wurde über einen Zeitraum von 18 Minuten registriert. Zum Zeitpunkt 0 wurde Kaliumchlorid appliziert (Abb. 19). Die SD startete dann in Kortexschicht I mit einem dunklen Signal in tangentialer Richtung, welches schnell von einem hellen Signal abgelöst wurde. Danach breitete sich die SD in der Regel bis Kortexschicht IV aus. Nach 2-3 Minuten konnten in den Randbezirken und manchmal auch innerhalb des hellen Signals eine Abdunklung beobachtet werden. In den darauffolgenden Minuten verringerte sich die Fläche des hellen Signals immer weiter, während

die Fläche der Abdunklung sich vergrößerte. In den letzten Minuten der Registrierung verschwanden beide Signalanteile (hell und dunkel).

Abb. 19: Intrinsisch optische Signale einer typischen SD. Die SD wurde durch einen Tropfen 1 M KCl-Lösung, der aus einer Entfernung von $1050 \pm 50 \mu\text{m}$ an die Pia des Hirnschnitts herangespült wurde, ausgelöst. In Bild 1 (0 s) ist die Position der Applikationskanüle mit einem weißen Kreis angedeutet. Die SD wurden als zweiphasige sich ausbreitende Welle (mit einem hellen und einem dunklen Anteil) registriert. Damit die Signale deutlicher zu erkennen waren, wurde vor dem Auslösen jeder SD mit Hilfe eines Videometriprozessors über 64 Bilder gemittelt und dieses Bild dann vom Hintergrundbild abgezogen. Die SD wurde über einen Zeitraum von 18 Minuten registriert. Zum Zeitpunkt 0 wurde KCl appliziert. Die SD startete dann in Kortexschicht I mit einem dunklen Signal in tangentialer Richtung, welches schnell von einem hellen Signal abgelöst wurde. Danach breitete sich die SD in der Regel bis Kortexschicht IV aus. Nach 2-3 Minuten konnten in den Randbezirken und manchmal auch innerhalb des hellen Signals eine Abdunklung beobachtet werden. In den darauffolgenden Minuten verringerte sich die Fläche des hellen Signals immer weiter, während die Fläche des dunklen Signals größer wurde. In den letzten Minuten der Registrierung verschwanden beide Signalanteile (hell und dunkel). Der Eichbalken entspricht $500 \mu\text{m}$.

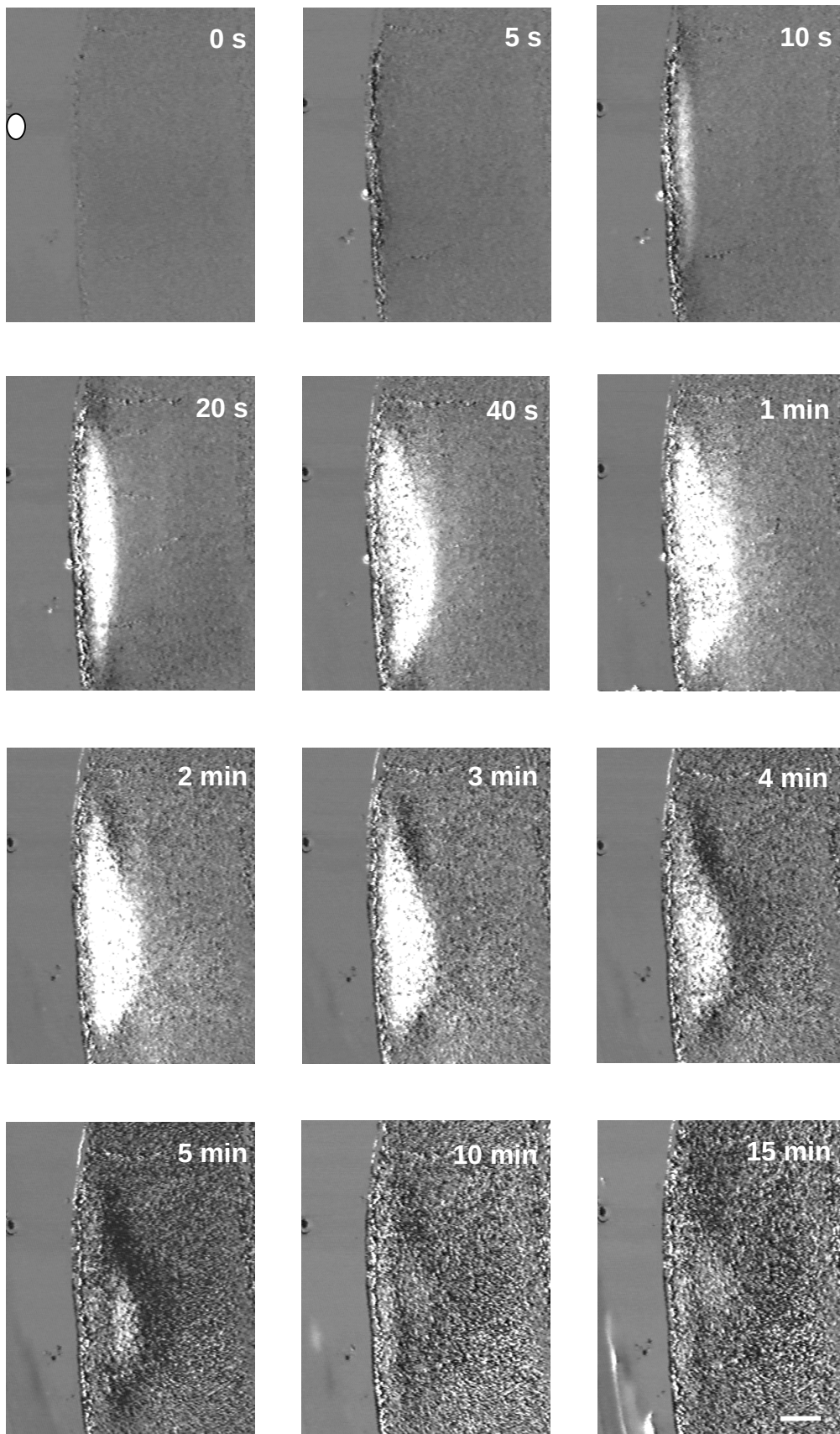


Abb. 19: Abb.-Legende siehe vorhergehende Seite

3.2.2 Die SDs lassen sich in diesem Modell wiederholt vergleichbar auslösen

Abb. 20 zeigt die Verläufe von sechs aufeinander folgenden *spreading depressions*. Anhand intrinsisch optischer Signale wurden mit dem Programm NIH-Image die Flächen der SDs zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Flächen des hellen und des dunklen Signalanteils getrennt ausgemessen. Das helle Signal repräsentiert Zellschwellung, das dunkle Signal eine Aufweitung des Extrazellulärraums. Die SDs wurden in einem Abstand von 20 Minuten ausgelöst. Die in Abb. 20 abgebildeten Kurven zeigen den bereits beschriebenen (Abb. 19) SD-Verlauf. Zuerst erscheint ein dunkles Signal, welches schnell durch ein helles ersetzt wird. Die Fläche des hellen Signals vergrößert sich in den nächsten Minuten und verringert sich anschließend wieder, während gleichzeitig die Fläche des dunklen Signals wieder zunimmt. Die Verläufe der aufeinanderfolgenden SDs sind sehr ähnlich. Die Amplituden des hellen Signals (Zellschwellung) variieren gegenüber der ersten ausgelösten SD nur um $4,07 \pm 2,21 \%$ (5 Tiere, 24 SDs). Der Zeitraum bis zum Abfall der Kurven auf $1/e = 37 \%$ (τ) variiert um $15,72 \pm 3,82 \%$ (5 Tiere, 24 SDs). Der dunkle Signalanteil der SD-Verläufe variierte zwischen den aufeinanderfolgenden SDs in den ersten Minuten fast gar nicht (Abb. 20). Gegen Ende des Verlaufs zeigten sich unterschiedlich starke erneute Anstiege, wobei die erste SD sich von allen weiteren durch einen höheren Anstieg unterschied.

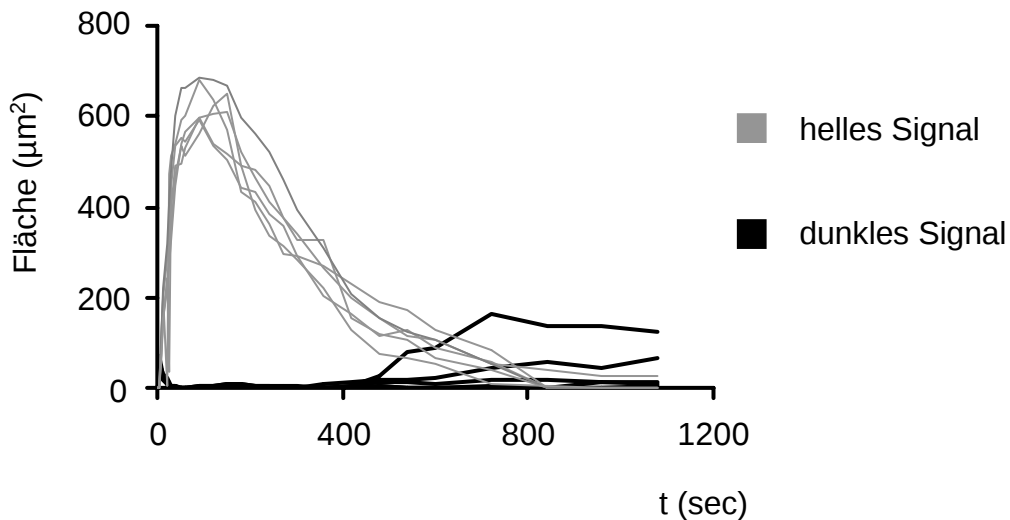


Abb. 20: Signalverläufe von sechs aufeinanderfolgenden SDs. Aufgetragen ist die mit Hilfe der intrinsisch optischen Signale ermittelten Fläche der SD gegenüber der Zeit. Die SD zeigt einen helle (grau) und eine dunkle Komponente (schwarz). Es lassen sich in einem Abstand von 20 Minuten vergleichbare SDs auslösen. Die Amplituden des hellen Signals (Zellschwellung) variieren gegenüber der ersten ausgelösten SD nur um $4,07 \pm 2,21 \%$ (5 Tiere, 24 SDs). Der Zeitraum bis zum Abfall der Kurven auf $1/e = 37 \%$ (τ) variiert um $15,72 \pm 3,82 \%$ (5 Tiere, 24 SDs). Der dunkle Signalanteil der SD-Verläufe variierte zwischen den aufeinanderfolgenden SDs in den ersten Minuten fast gar nicht. Gegen Ende des Verlaufs zeigten sich unterschiedlich starke erneute Anstiege, wobei die erste SD sich von allen weiteren durch einen höheren Anstieg unterschied.

3.2.3 Die Ausbreitung der SD (helles Signal) verringert sich nach Applikation eines V1a-Antagonisten

Der Vasopressin1a-Antagonist (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹) Vasopressin, der unter physiologischen Bedingungen (s. 3.1) die Ausbreitung der schwarzen Welle verringert, hat auch einen inhibierenden Effekt auf die Ausbreitung des hellen Signals der SD (Zellschwellung). Zuerst wurde eine Kontroll-SD ausgelöst. Zwei Minuten vor der zweiten SD wurde der V1a-Antagonist appliziert. Die nachfolgenden vier SDs zeigten in den meisten Fällen einen unterschiedlichen Verlauf gegenüber der ersten SD. Die Ausbreitung der SD (Fläche) wurde deutlich kleiner. Die Amplituden der letzten vier SDs (maximale Fläche der Ausbreitung) (unter Einfluß des Antagonisten waren im Mittel um $32,88 \pm 6,63 \%$ (6 Tiere, 18 SDs) kleiner als die erste SD (Kontrolle).

Abb. 21 zeigt die SD-Verläufe eines typisches Antagonisten-Experiments. Die Abfolge der SDs ist farbig markiert. Die dritte (gelb), vierte (türkis) und sechste (rot) SD sind ungefähr um die Hälfte kleiner, als die erste SD (Kontrolle, dunkelblau). In wenigen Fällen (6 von 24) konnte bei den nachfolgenden SDs auch eine SD beobachtet werden, die wieder auf dem Kontrollniveau lag (fünfte SD, violett). Die darauffolgende SD (sechste SD, rot) lag aber wieder deutlich unterhalb der ersten SD (Kontrolle, dunkelblau).

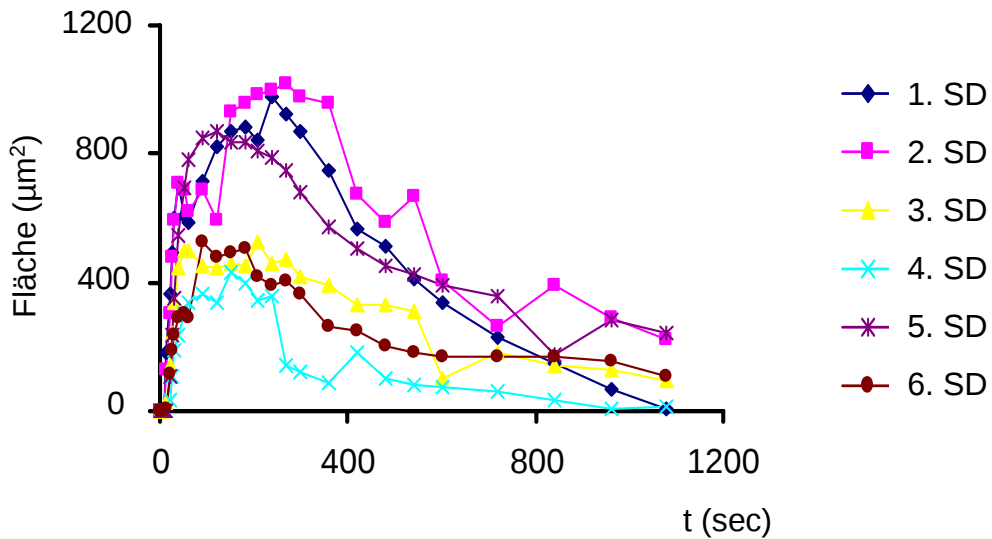


Abb. 21: SD-Verläufe eines typischen Antagonisten-Experiments. Der V1a-Antagonist verringert die Ausbreitung der SD (helles Signal, Zellschwellung). Die Abfolge der SDs ist farbig markiert. Die dritte (gelb), vierte (türkis) und sechste (rot) SD sind ungefähr um die Hälfte kleiner, als die erste SD (Kontrolle, dunkelblau). In wenigen Fällen (6 von 24) konnte bei den nachfolgenden SDs auch eine SD beobachtet werden, die wieder auf dem Kontrollniveau lag (fünfte SD, violett). Die darauffolgende SD (sechste SD, rot) lag aber wieder deutlich unterhalb der ersten SD (Kontrolle, dunkelblau).

3.2.4 Der V1a-Antagonist verlangsamt die Aktivierung und die Inaktivierung des SD-Verlaufs im Bezug auf die Zellschwellung (helles Signal)

Mit Hilfe des Depolarisationsmodells von Hodgkin und Huxley (1952d, s. Material und Methoden 2.8) können die Kinetiken der SD beschrieben werden. Im Verlauf ähnelt die SD Depolarisationsprozessen, wenn auch der Zeitverlauf deutlich langsamer ist. Der Kurve (SD Fläche/ Zeit) setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: der Aktivierung, der Inaktivierung und der Amplitude (A_{exp}). Die Mittelwerte der Maximalamplituden (A_{exp}) der Kurven nach Applikation des Antagonisten waren signifikant kleiner ($p \leq 0.01$, 6 Tiere, 24 SDs) als der Mittelwert der Maximalamplituden der Kontrollkurven (jeweils erste SD des Experiments). Der Mittelwert der Amplituden nach Applikation des Antagonisten betrug $545,69 \pm 125,29 \text{ mm}^2$ und der Mittelwert der Kontrollen $814,16 \pm 115,06 \text{ mm}^2$ (Abb. 22 A).

Mit Hilfe des Programmes Neuron konnte Abfall der Kurve (SD Fläche/ Zeit) iterativ angeglichen werden:

$$\text{Fitfunktion} = A_1 \cdot \exp(t - t_0 / \tau)$$

Die linke Grenze war die Maximalamplitude, die rechte Grenze der 0-Wert. Diese Fitfunktion entspricht der Inaktivierungskomponente. Dort, wo diese Fitfunktion die Y-Achse schneidet, befindet sich A_1 . A_1 ist die Amplitude, die das Signal erreichen könnte, wenn es die Inaktivierung nicht gäbe. Desweiteren wurde τ ermittelt. Diese Variable gibt den Zeitpunkt an, an welchem die Kurve auf $1/e = 37 \%$ abfällt. Abb. 22 B zeigt die Veränderung von τ gegen die Abfolge der SDs. Die SDs wurden im Abstand von 20 Minuten ausgelöst. Die erste SD stellt die Kontrolle dar. Mit der zweiten SD wird der Antagonist eingewaschen. Die Einwaschphasen im Hirnschnitt betragen ca. 30 Minuten. Bei der dritten,

vierten und fünften SD wird τ größer. Bei der sechsten SD fällt τ wieder auf das Kontrollniveau ab. Dieser Trend war aber nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 6$ pro Zeitpunkt).

Der Anstieg der Kurve wurde ebenfalls iterativ angeglichen:

$$\text{Fitfunktion} = A1 \cdot (1 - \exp(t - t_0 / \tau))$$

Die linke Grenze war der 0-Wert, die rechte Grenze die Maximalamplitude. Diese Fitfunktion entspricht der Aktivierungskomponente. Die Variable τ gibt hier den Zeitpunkt an, an welchem die Kurve auf 37 % ($1/e$) angestiegen ist. Abb. 22 C zeigt die Veränderung von τ gegen die Abfolge der SDs. Die SDs wurden im Abstand von 20 Minuten ausgelöst. Die erste SD stellt die Kontrolle dar. Mit der zweiten SD wird der Antagonist eingewaschen. Die Einwaschphasen im Hirnschnitt betragen ca. 30 Minuten. Bei der dritten SD wird τ kleiner. Bei der vierten, fünften und sechsten SD wird τ größer als der Kontrollwert. Dieser Trend war aber nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 6$ pro Zeitpunkt).

Der Gesamtverlauf wird durch folgende Funktion beschrieben:

$$SD = A_{Akt} \cdot (1 - \exp(t - t_0 / \tau_{Akt})) \cdot A_{Inakt} \cdot (\exp(t - t_0 / \tau_{Inakt}))$$

Wenn die Mittelwerte der Kontroll-SDs (erste im Versuch) und die Mittelwerte der vierten SD (der Antagonist ist zu diesem Zeitpunkt komplett eingewaschen und wirksam) für $A1$ und die beiden τ -Werte eingesetzt werden, erhält man die Kurven von Abb. 23 A. Diese entsprechen im Verlauf den gemittelten Kurven der gemessenen Kontroll-SDs und den gemittelten Kurven der vierten SDs.

Abb. 22: Darstellung der Maximalamplitude (A_{exp}), τ der Aktivierung und τ Inaktivierung der SD-Verläufe im Vergleich Kontrollen zu Versuchen, bei denen der V1a-Antagonist appliziert wurde. A: Die Mittelwerte der Maximalamplituden (A_{exp}) der Kurven nach Applikation des Antagonisten waren signifikant kleiner ($p \leq 0.01$, 6 Tiere, 24 SDs) als der Mittelwert der Maximalamplituden der Kontrollkurven (jeweils erste SD des Experiments). Der Mittelwert der Amplituden nach Applikation des Antagonisten betrug $545,69 \pm 125,29 \text{ mm}^2$ und der Mittelwert der Kontrollen $814,16 \pm 115,06 \text{ mm}^2$. B: Veränderung von τ (Inaktivierung) gegen die Abfolge der SDs. Die SDs wurden im Abstand von 20 Minuten ausgelöst. Die erste SD stellt die Kontrolle dar. Mit der zweiten SD wird der Antagonist eingewaschen. Die Einwaschphasen im Hirnschnitt beträgt ca. 30 Minuten. Bei der dritten, vierten und fünften SD wird τ größer. Bei der sechsten SD fällt τ wieder auf das Kontrollniveau ab. Dieser Trend war aber nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 6$ pro Zeitpunkt). C: Veränderung von τ (Aktivierung) gegen die Abfolge der SDs. Die SDs wurden im Abstand von 20 Minuten ausgelöst. Die erste SD stellt die Kontrolle dar. Mit der zweiten SD wird der Antagonist eingewaschen. Die Einwaschphasen im Hirnschnitt betragen ca. 30 Minuten. Bei der dritten SD wird τ kleiner. Bei der vierten, fünften und sechsten SD wird τ größer als der Kontrollwert. Dieser Trend war aber nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 6$ pro Zeitpunkt).

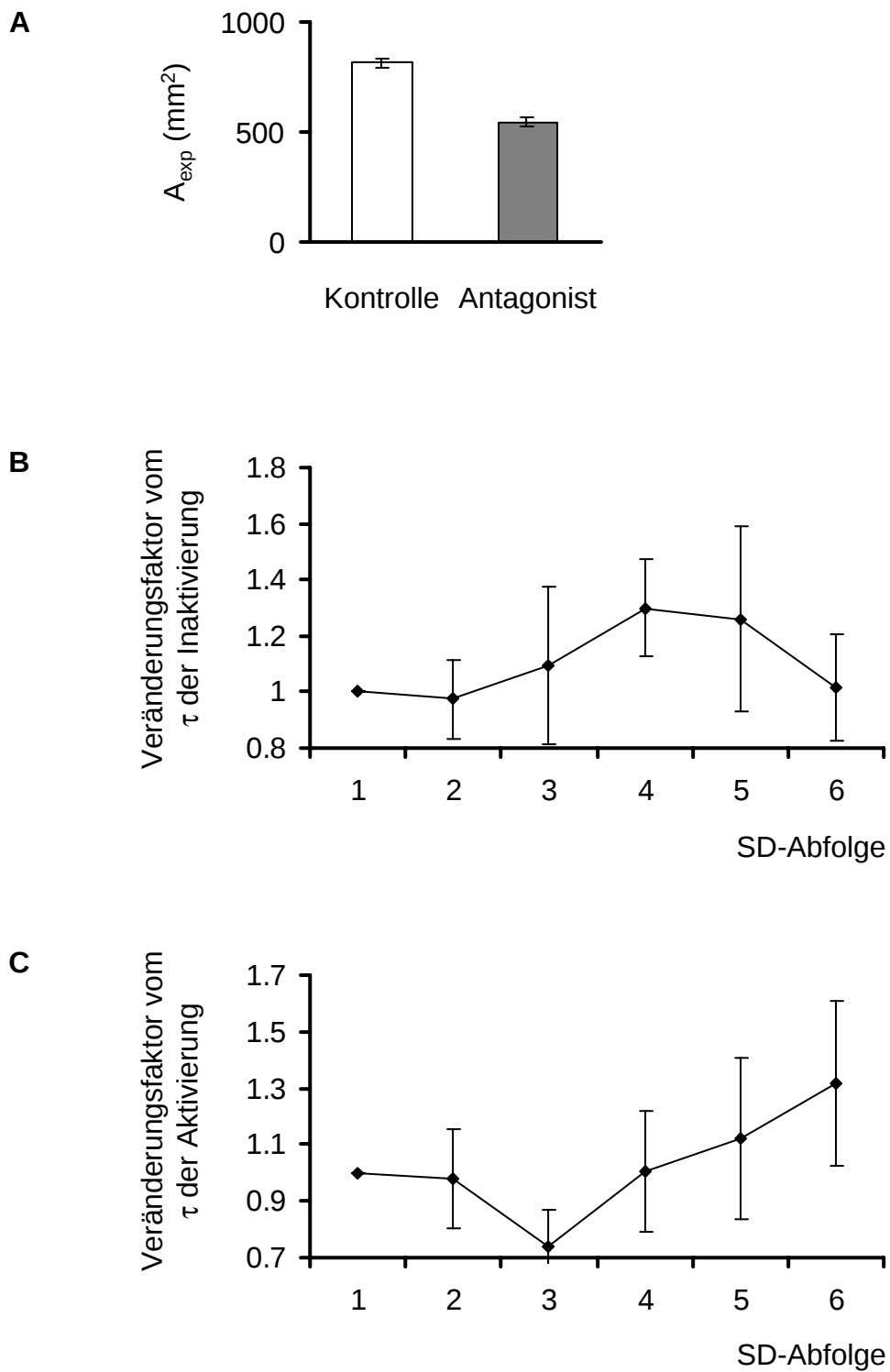


Abb. 22: Abbildungslegende s. vorhergehende Seite

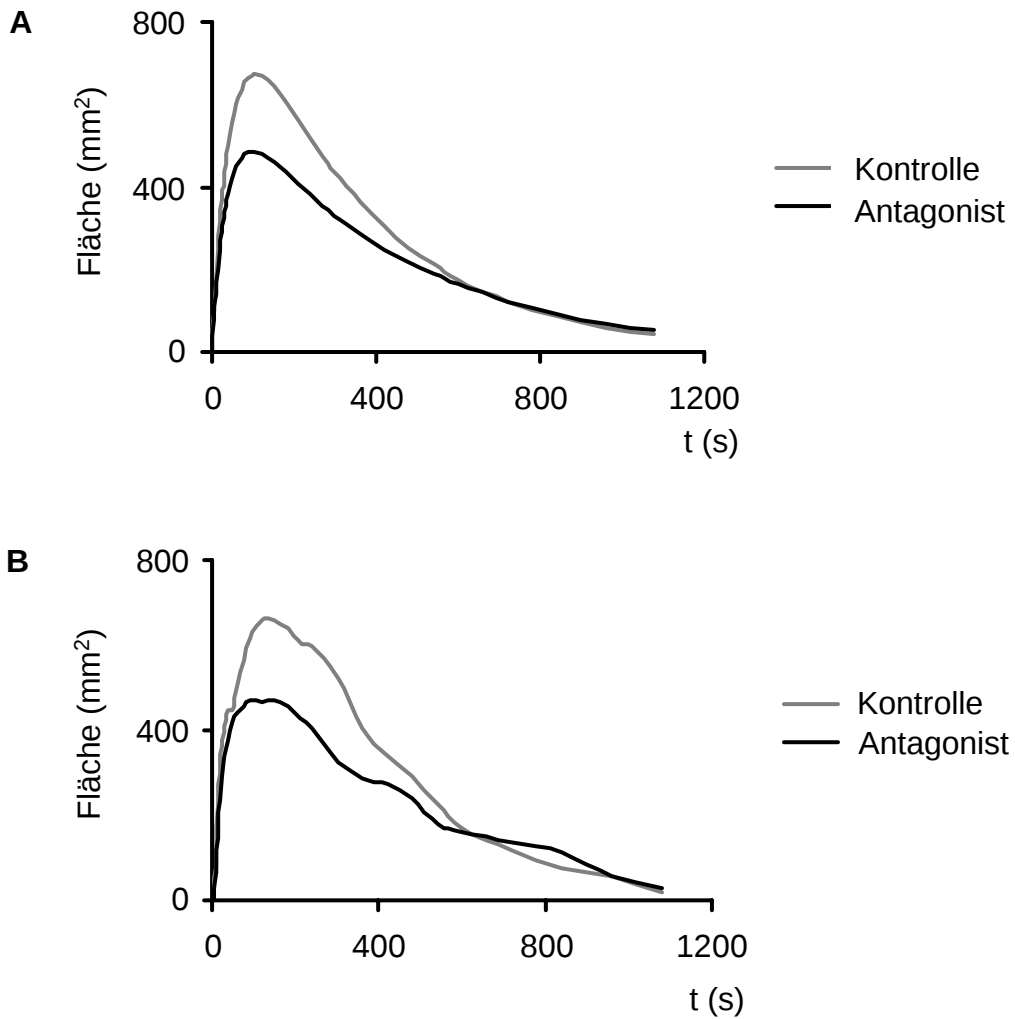


Abb. 23: Darstellung der guten Übereinstimmung von berechneten Kurvenverläufen mit gemessenen Verläufen. Der Gesamtverlauf wird durch folgende Funktion beschrieben: $SD = A_{Akt} * (1 - \exp(-t/\tau_{Akt})) * A_{Inakt} * \exp(-t/\tau_{Inakt})$. A: Kurvenverläufe nach Einsetzen der Mittelwerte der Kontroll-SDs (erste im Versuch) und der Mittelwerte der vierten SDs (der Antagonist ist zu diesem Zeitpunkt komplett eingewaschen und wirksam) für A1 und die beiden τ -Werte in die Formel. Diese Verläufe entsprechen den Kurvenverläufen der gemittelten Kurven der gemessenen Kontroll-SDs und den gemittelten Kurven der gemessenen vierten SDs.

3.2.5 Der V1a-Antagonist verändert die Relation der einzelnen SDs zueinander im Bezug auf die Extrazellulärraum-aufweitung (dunkles Signal) tendenziell

Die intrinsisch optischen Signale (IOS) der SD zeigen einen biphasischen Verlauf (Abb. 19). Das helle Signal repräsentiert Zellschwellung und das dunkle Signal eine Aufweitung des Extrazellulärraums. Der V1a-Antagonist hat neben seinem inhibierenden Einfluß auf die Fläche des hellen Signals (3.2.4) einen verstärkenden Einfluß auf die Extrazellulärraum-aufweitung in der zweiten Hälfte des SD-Verlaufs (Abb. 24 A). Die Verläufe der einzelnen SDs wurde über sechs Versuche gemittelt (Abfolge ist farbig markiert). Abb. 24 B zeigt den über fünf Kontroll-Versuche gemittelten Verlauf von sechs aufeinanderfolgenden SDs (Abfolge ist farbig markiert). Die erste SD zeigt einen anderen Verlauf als die fünf folgenden SDs. Das dunkle Signal dieser SD zeigt gegen Ende des SD-Verlaufs einen Anstieg, der weit über dem Anstieg der folgenden SDs liegt. Die folgenden SDs liegen ungefähr auf einem Level. In den Versuchen, bei denen der V1a-Antagonist appliziert wurde (Abb. 24 A), liegen die Verläufe der zweiten bis sechsten SD im Bereich der ersten SD. Abb. 24 C zeigt die Fläche der SDs zum Zeitpunkt 600 s gegen die Abfolge der SDs. Zu diesem Zeitpunkt bestätigen sich die zuvor beschriebenen Abläufe. Die Flächenwerte des Zeitpunkts 600 s sind aber nicht signifikant unterschiedlich. Der unterschiedliche Verlauf zeigt sich nur tendenziell ($p < 0,1$, je sechs Tiere pro Kontrollen und Antagonisten-Versuch).

Abb. 24: Verläufe des dunklen (Aufweitung des Extrazellulärraums) intrinsisch optischen Signals (IOS) in sechs aufeinanderfolgenden SDs. A: Der V1a-Antagonist verändert die Relation der SD-Verläufe zueinander im Bezug auf die Extrazellulärraumaufweitung (dunkles Signal). Die Verläufe der einzelnen SDs wurde über sechs Versuche gemittelt (Abfolge ist farbig markiert). Die Verläufe der zweiten bis sechsten SD liegen im Bereich der ersten SD. B: Über fünf Kontroll-Versuche gemittelter Verlauf von sechs aufeinanderfolgenden SDs (Abfolge ist farbig markiert). Die erste SD zeigt einen anderen Verlauf, als die fünf folgenden SDs. Das dunkle Signal dieser SD zeigt gegen Ende des SD-Verlaufs einen Anstieg, der weit über dem Anstieg der folgenden SDs liegt. Die folgenden SDs liegen ungefähr auf einem Level. C: Fläche der SDs zum Zeitpunkt 600 s gegen die Abfolge der SDs. Zu diesem Zeitpunkt bestätigen sich die zuvor beschriebenen Abläufe. Die Flächenwerte des Zeitpunkts 600 s sind aber nicht signifikant unterschiedlich. Der unterschiedliche Verlauf zeigt sich nur tendenziell ($p < 0,1$, je sechs Tiere pro Kontrollen und Antagonisten-Versuch).

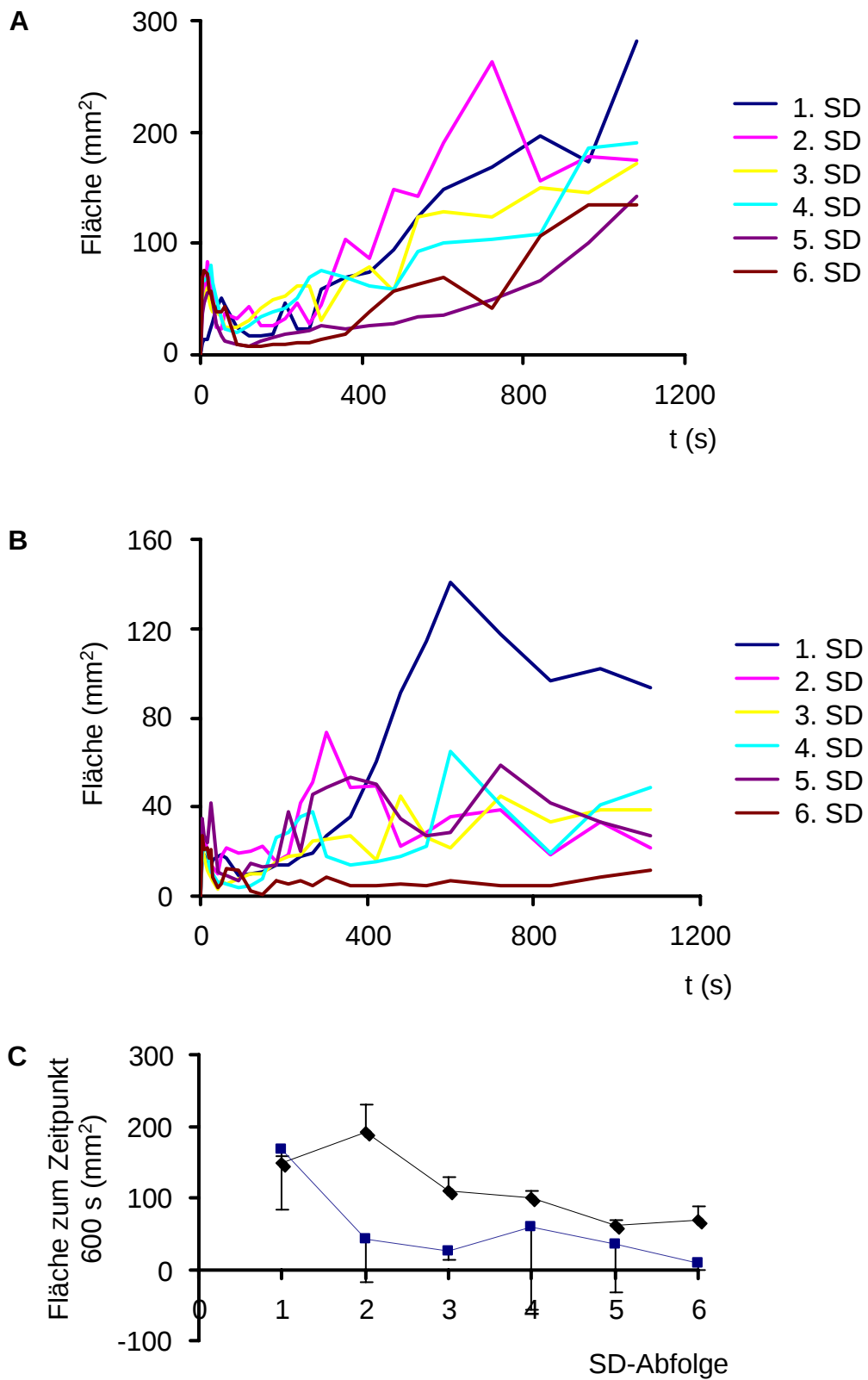


Abb. 24: Abbildungslegende s. vorhergehende Seite

3.2.6 Der V1a-Antagonist hat keinen Einfluß auf das Gleichspannungspotential der SD

Während einer *spreading depression* (SD) wird eine Erniedrigung der EEG-Amplitude und eine Negativierung der kortikalen Gleichspannung, die sich mit einer Geschwindigkeit von 2-5 mm/min über den Kortex ausbreitet, registriert. Von diesen Phänomenen leitet sich auch der Name *spreading deoression* ab. Abb. 25 A zeigt einen typischen Verlauf des Gleichspannungspotentials (DC) während einer SD. Die elektrophysiologische Registrierung erfolgte mit einer Feldpotentialelektrode. Diese Elektrode war in Kortexschicht II/III lokalisiert. Als das sich ausbreitende intrinsisch optische Signal (entspricht der SD, Abb. 25 B) die Feldpotentialelektrode erreicht hatte, trat zeitgleich auch der Potentialsprung (Abb. 25 A) auf. Die Dauer des DC-Sprungs und die maximale Signalamplitude der DC-Registrierung wurde für drei Kontroll-SDs (jeweils die erste SD in einem Versuch, bei dem nach der ersten SD der Antagonist appliziert wurde) und fünf SDs, bei denen eine deutliche Inaktivierung des hellen Signals beobachtet werden konnte, berechnet. Die maximale Amplitude des DC-Sprungs betrug bei Kontrollen $11,90 \pm 3,15$ mV und bei Versuchen, bei denen eine deutliche Inaktivierung durch den Antagonisten zu beobachten war, $12,75 \pm 2,90$ mV (Abb. 26).

Der Zeitraum über den sich der DC-Sprung erstreckte, betrug bei Kontrollen $220 \pm 45,83$ s und bei Versuchen, bei denen eine deutliche Inaktivierung durch den Antagonisten zu beobachten war, $258 \pm 50,20$ s (Abb. 27).

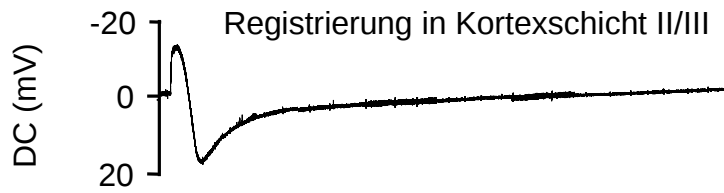
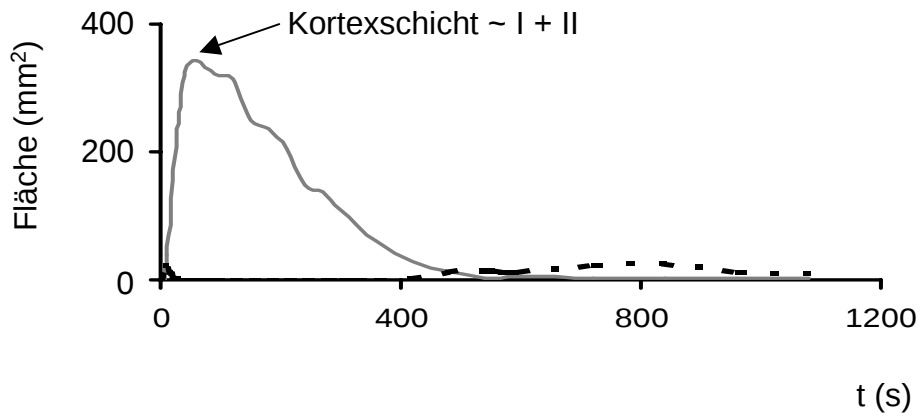
A**B**

Abb. 25: A: Typischer Verlauf des Gleichspannungspotentials (DC) während einer SD. Die elektrophysiologische Registrierung erfolgte mit einer Feldpotentialelektrode. Diese Elektrode war in Kortexschicht II/III lokalisiert. B: Intrinsisch optische Signale (IOS) während der DC-Registrierung. Als das sich ausbreitende intrinsisch optische Signal (entspricht der SD) die Feld-potentialelektrode erreicht hatte, trat zeitgleich auch der Potentialsprung auf. Die graue Linie stellt das helle IOS (Zellschwellung), die gestrichelte Linie das dunkle IOS (Extrazellulärraumaufweitung) dar.

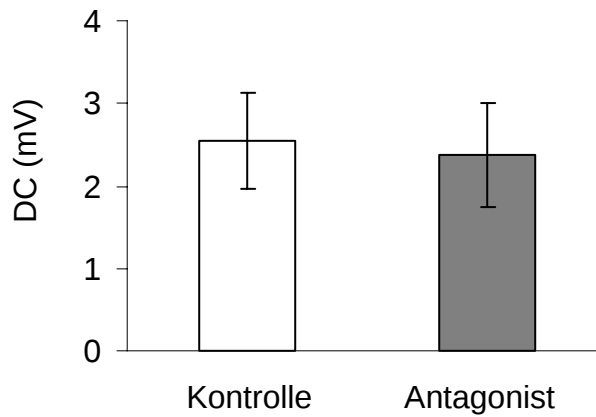


Abb. 26: Die maximale Signalamplitude der DC-Registrierung wurde für drei Kontroll-SDs (jeweils die erste SD in einem Versuch, bei dem nach der ersten SD der Antagonist appliziert wurde) und fünf SDs, bei denen eine deutliche Inaktivierung des hellen Signals beobachtet werden konnte, berechnet. Die maximale Amplitude des DC-Sprungs betrug bei Kontrollen $2,55 \pm 0,58$ mV und bei Versuchen, bei denen eine deutliche Inaktivierung durch den Antagonisten zu beobachten war, $2,38 \pm 0,63$ s.

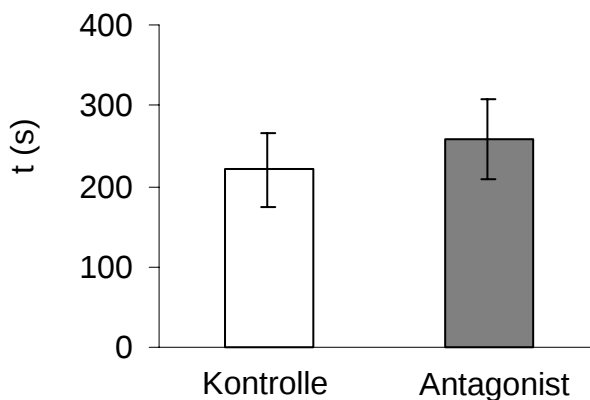


Abb. 27: Der Zeitraum, über den sich der DC-Sprung erstreckte, wurde für drei Kontroll-SDs (jeweils die erste SD in einem Versuch, bei dem nach der ersten SD der Antagonist appliziert wurde) und fünf SDs, bei denen eine deutliche Inaktivierung des hellen Signals beobachtet werden konnte, berechnet. Der Zeitraum, über den sich der DC-Sprung erstreckte, betrug bei Kontrollen $220 \pm 45,83$ s und bei Versuchen, bei denen eine deutliche Inaktivierung durch den Antagonisten zu beobachten war, $258 \pm 50,20$ s.

4 Diskussion

Physiologische Zellaktivität und pathophysiologische Bedingungen können von Änderungen des Zellvolumens und Volumenänderungen des Extrazellulärtraums begleitet werden. In einem intrinsisch optischen Signale-Meßstand können während dieser Volumenveränderungen Änderungen der intrinsisch optischen Signale (IOS) beobachtet werden. Bei Hirnschnitten in *submerged chambers* (die Schnitte sind untergetaucht) ruft eine afferente Stimulation einen Anstieg des transmittierten Lichts hervor (Kreisman et al., 1995).

Die IOS wurden erstmals von Hill und Keynes (1949) beschrieben. In den letzten 10 Jahren mehrten sich die Hinweise, daß die IOS durch Volumenänderung von Zellen und damit durch Änderungen der Größe des Extrazellulärtraumes verursacht sein könnten (MacVicar und Hochman, 19991; McManus et al., 1993; Andrew und Hochman, 1991). Die direkte Korrelation beider Meßgrößen erfolgte durch Holthoff und Witte (1996, 1998, 2000). Die Änderungen des Extrazellulärtraums wurden indirekt über Konzentrationsveränderungen des nichtmembrangängigen Tetramethylammonium-Ions (TMA^+) registriert. Die IOS korrelierten im Ausmaß und Zeitverlauf mit den Änderungen des Extrazellulärtraums. Unter extremen Bedingungen, z. B. bei Zelluntergang von Neuronen, kann ebenfalls eine Änderung des IOS beobachtet werden (Polischuk et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden auch im pathophysiologischen Modell die Bedingungen so gewählt, daß das Gewebe nicht irreversibel geschädigt wurde.

Die hier verwendete Methode der IOS in der Dunkelfeldkonfiguration (Dodt et al., 1993; Dodt und Ziegelgänsberger, 1994, nur gestreutes, transmittiertes Licht wird registriert) und unter Verwendung eines Hintergrundabzuges mit anschließender Signalverstärkung durch einen Videometrieprozessor (s. Material und Methoden) hat ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis und erlaubt eine Erfassung von Veränderungen der

IOS im Bereich von wenigen Prozent über größere Gewebeflächen mit Videogeschwindigkeit.

Extrazellulärraumveränderungen wurden bislang hauptsächlich mit ionensensitiven Mikroelektroden über die Bestimmung von Konzentrationsveränderungen nichtpermeabler Testsubstanzen (z.B. TMA⁺, Ransom et al., 1985, Nicholson und Phillips, 1981) erfaßt. Diese haben eine limitierte Zeitauflösung (etwa 30 Sekunden) und können Veränderungen nur an einem Punkt zur gleichen Zeit erfassen.

Starke neuronale Erregung bewirkt einen K⁺-Ausstrom aus Neuronen. Die daraus resultierende Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration muß aus der synaptischen Region entfernt werden, um die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Übertragung nicht zu stören (Dietzel et al., 1980). Eine Umverteilung über den engen Extrazellulärraum ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ausreichend (Dietzel et al., 1980). Daher ist eine Beteiligung des glialen Synzytiums, welches den größten Raum zwischen den zerebralen Neuronen einnimmt, erforderlich. Astrozyten können hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen auf verschiedene Weise von den Neuronen entfernen. Über den Na-K-2Cl-Kotransporter kann K⁺ aufgenommen und den Neuronen verzögert wieder abgegeben werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im sogenannten *spatial buffer*-Mechanismus (Dietzel et al., 1980; Orkand, 1980; Holthoff und Witte, 2000) der Gliazellen. Die durch *gap junctions* (Connexin 43) zu einem Synzytium verbundenen Gliazellen nehmen K⁺ an Stellen mit hoher neuronaler Aktivität auf und verteilen dieses Ion durch das gliale Netzwerk.

Die Beteiligung des *spatial buffers* an der Entfernung von hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen kann durch die Verwendung einer artifiziellen Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) mit erniedrigter Chloridkonzentration verstärkt werden. Die erniedrigte Chloridlösung

bewirkt eine fast vollständige Inaktivierung des chloridabhängigen Na-K-2Cl-Kotransporters (Holthoff and Witte, 1998).

Es ist bekannt, daß die räumliche Pufferung von K^+ osmotische Gradienten hervorruft, die von Wasserumverteilungen kompensiert werden müssen (Dietzel et al., 1980). Das bedeutet, daß jeder Kaliumfluß durch das gliale Synzytium von einem gerichteten Wasserfluß begleitet werden muß (Holthoff and Witte, 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt genau diesen spezialisierten gerichteten Wasserfluß. Elektrische Stimulationen in tiefen kortikalen Schichten rufen einen Kaliumfluß zu den oberen Kortexschichten hervor. Dies wurde mit Kaliumsensitiven Mikroelektroden registriert. Der Kaliumfluß wurde von einem Wasserfluß begleitet. Dies wurde als Veränderung des Extrazellulärraumes gemessen. Der Wasserfluß stammt aus der Region aktiver Neurone von Kortexschicht IV. In dieser Schicht konnte eine Schrumpfung des Extrazellulärraumes festgestellt werden. Die Extrazellulärraumvergrößerungen in tiefen und oberflächlichen Kortexschichten erschienen mit einer Zeitverzögerung von 2 Sekunden nach der elektrischen Stimulation. Der schnellere Abfall des Kaliumsignals in oberen Kortexschichten liegt wahrscheinlich am Kaliumverlust durch die kortikale Oberfläche.

Ein schneller transmembraner Wassertransport scheint durch eine spezialisierte Klasse von kanalbildenden Proteinen - den Aquaporinen - ermöglicht zu werden (Agre et al., 1995). AQP4 kommt in hoher Konzentration im Gehirn vor (Jung et al., 1994). Neuere Studien zeigten, daß dieses Aquaporin größtenteils auf Astrozyten beschränkt ist (Nielsen et al., 1997). Dies legt nahe, daß die Aquaporine beim Wasserfluß, der den *spatial buffer*-Mechanismus begleitet, beteiligt sind. In der Retina konnte eine direkte Kolo-kalisation von AQP4 mit dem Kaliumkanal Kir1.4 in Müllerzellen gezeigt werden, die einen gerichteten Kaliumtransport zeigen (Nagelhus et al., 1998). Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Immunhistochemie zeigen die AQP4-Expression in Astrozyten. Dieser experimentelle

Ansatz basiert auf der Idee, daß ein evozierter K^+ -Fluß einen AQP4 vermittelten Wassertransport hervorruft. Obwohl hier eine hochfrequenter Stimulus verwandt wurde, spiegelt dieser Ansatz die physiologische Situation besser wieder, als alternative Ansätze in der Zellkultur, die mit hypo- und hyperosmolaren Lösungen arbeiten. Ein Nachteil im Hirnschnittmodell im Vergleich zur *in vivo* Situation ist der fehlende Zufluß zum Blutstrom und Subarachnoidalraum. Von diesen nimmt man an, daß dorthin das überschüssige Kalium abgegeben wird. Dieser fehlende Abfluß wird aber, wenn Wassertransport durch IOSs registriert wird, zum Vorteil, da durch den fehlenden Abfluß wahrscheinlich die Volumenveränderungen des Extrazellulärraums deutlicher werden.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob Vasopressin einen wichtigen regulatorischen Einfluß auf den Wassertransport des Gehirns ausübt. Die Idee, daß Vasopressin einen regulatorischen Einfluß haben könnte, entstand aus folgenden Untersuchungen. Erstens liegt Vasopressin endogen im Gehirn vor (Landgraf, 1992). Zweitens besitzt das Gehirn ein intrinsisches Vasopressin-haltiges Fasersystem (Buijs, 1978; de Vries and Miller, 1998). Drittens sind Vasopressin1-Rezeptoren über den gesamten zerebralen Kortex verteilt (Brinton, 1998; Chen et al., 1993). Viertens ist bekannt, daß Vasopressin die Rate von osmotisch induzierten Volumenveränderungen in Astrozytenkulturen erhöht (Sarfaraz et al., 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich mit folgender Vorstellung vereinbaren. Aufgrund von neuronaler Aktivität wird K^+ in den Extrazellulärraum von Kortexschicht IV (Oc1 nach Zilles) abgegeben und akkumuliert dort. Ein Teil dieses K^+ wird durch den *spatial buffer*-Mechanismus entfernt. In der Anwesenheit von AVP wird der Wassertransport durch die Astrozyten modifiziert. Die Zellen können den osmotischen Gradienten, der durch den Kaliumtransport entsteht, besser kompensieren. Vasopressin begünstigt also einen radialen Wasserfluß auch lateral zur Simulationselektrode. Dort ist die neuronale

Aktivität geringer und die treibende Kraft des Kaliums geringer, als in Kortexgebieten senkrecht zum Stimulationsgebiet. Dies konnte als verstärktes sich tangential ausbreitendes intrinsisch optisches Signal (IOS) sowohl in oberen, als auch in tieferen Kortexschichten registriert werden. Das IOS repräsentierte als dunkles Signal eine Aufweitung und als helles Signal eine Schrumpfung des Extrazellulärraums. Die Beteiligung des glialen Synzytiums konnte durch ein pharmakologisches Entkoppeln der Gliazellen gezeigt werden. Die Entkopplung verhinderte die Aufweitung des Extrazellulärraums in oberen Kortexschichten (Holthoff and Witte, 2000).

Beteiligung des V1a-Rezeptors

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß der Effekt des Vasopressins durch Vasopressin1-Rezeptoren und nicht durch Vasopressin2-Rezeptoren vermittelt wird. Eine Applikation mit dem V1a-Antagonisten (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin verkleinerte die schwarze Welle auch ohne zusätzliche Applikation von AVP. Das deutet auf eine tonische V1a-Rezeptor vermittelte Modulation der Wasserpermeabilität hin. Diese tonische Stimulation könnte durch AVP, freigesetzt von intrinsischen Nervenfasern des zerebralen Kortex (Sofroniew, 1983), hervorgerufen worden sein. Eine weitere Möglichkeit wäre eine AVP Diffusion über den Extrazellulärraum in den Kortex. *In vivo* kann die AVP-Konzentration im nanomolaren Bereich liegen (Landgraf, 1992; Robinson, 1983). Das bedeutet, daß die eingesetzte Konzentration (500 nM) im physiologischen Bereich liegt. Landgraf (1992) konnte außerdem eine erhöhte Freisetzung von Vasopressin in Hirngewebe durch hohe Kaliumkonzentrationen erreichen.

Intrazelluläre Mechanismen

V1a-Rezeptoren sind über G-Proteine an Phospholipase C gekoppelt (Thibonnier et al., 1994). Daher ist es wahrscheinlich, daß die Effekte der V1a-Rezeptor-Stimulation auf die Größe des Extrazellulärraums durch einen Inositol-1, 4, 5-Triphosphat (IP_3)-vermittelten Kalzium-Ausstrom aus intrazellulären Speichern verursacht wird. Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit durch den Einsatz von Thapsigargin bestätigt werden. Thapsigargin inhibiert die Ca^{2+} ATP-ase des endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und verhindert ein Wiederauffüllen der Ca^{2+} -Speicher (Norup et al., 1986). Nach 30-minütiger Applikation von 1 μ M Thapsigargin und elektrischer Stimulation im Abstand von 10 Minuten (um die intrazellulären Speicher zu leeren) konnte durch Vasopressin kein begünstigender Effekt auf die Wasserverteilung erreicht werden.

Neben der Aktivierung eines IP_3 -vermittelten Kalzium-Ausstroms aus den intrazellulären Speichern erfolgt nach V1a-rezeptor-Stimulation auch eine Aktivierung von Phosphokinase C (PKC). Die Beteiligung von PKC am Vasopressin-Effekt auf die Wasserverteilung konnte durch eine Applikation des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide I (BIS I) gezeigt werden. Bei gleichzeitiger Applikation von BIS I und Arg^8 -Vasopressin (AVP) hatte Vasopressin keinen begünstigenden Effekt auf die Wasserverteilung. BIS I-Konzentrationen von 300 nM und 2 μ M (dieses Konzentrationen wurden ausgewählt, um alle PKC-Isoformen zu inhibieren) verringerten sogar die Ausbreitung der schwarzen Welle (dunkles IOS, Extrazelluläraufweitung). Die Signale wurden sogar kleiner, als die Signale unter Kontrollbedingungen. Dies könnte auf einen inhibierenden Einfluß auf die Auswirkungen des intrinsischen Vasopressingehalts des Gewebes durch den PKC-Inhibitor hinweisen. Dies widerspricht den Beobachtungen von Yang and Verkman (1997). Sie erreichten keine AQP4-Aktivität durch eine PKC-Aktivierung. Diese Studie wurde aber in Oozyten durchgeführt. Diese könnten andere

PKC-Isoformen und PKC-Substrate aufweisen und deshalb keine AQP4-Aktivität nach PKC-Aktivierung zeigen.

Es sollte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, ob der PKC-Einfluß durch eine direkte Phosphorylierung von AQP4 (besitzt drei mögliche Phosphorylierungsstellen), oder durch eine Phosphorylierung eines anderen Moleküls, welches in der Signalkaskade früher lokalisiert ist, bewirkt wird.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Vasopressin Effekte auf andere Membranproteine zeigt. Da es bisher keine spezifischen AQP4-Blocker gibt, fehlt der direkte Beweis, daß die beobachteten Effekte durch AQP4 vermittelt werden. Die Aquaporine ließen sich z.B. durch AQP4-Antikörper blocken. Zur Zeit besteht allerdings die Schwierigkeit, daß alle kommerziell erhältlichen Antikörper gegen intrazelluläre Epitope gerichtet sind. Diese Antikörper können intakte Zellmembranen nicht passieren und sind daher für Untersuchungen an lebenden Zellen nicht geeignet. Ein deutlicher Hinweis, daß der durch Vasopressin verstärkte gerichtete Wasserfluß wahrscheinlich durch AQP4 vermittelt wird, ist die besonders starke Lokalisation der AQP4-Kanäle im Bereich der verstärkten Extrazellulärraumaufweitung. AQP4 ist hauptsächlich in Gliazellen der Kortexschicht I und in Astrozytenendfüßen, die die Blutgefäße umgeben, lokalisiert (Nielsen et al., 1997).

Eine Beeinflussung von *gap junctions* (Zell-Zell-Verbindungen im glialen Synzytium) durch Vasopressin ist aus folgenden Gründen relativ unwahrscheinlich. Erstens reduziert PKC die Leitfähigkeit der *gap junctions* (Greenfield et al., 1990) und zweitens erniedrigt intrazelluläres Kalzium, zumindest in hohen Konzentrationen, die Permeabilität der *gap junctions* (Blomstrand et al., 1999). Dies widerspricht unseren Beobachtungen, daß PKC und intrazelluläres Kalzium in der Modulation der Wasserumverteilung durch Vasopressin beteiligt sind.

Vasopressin hat keinen Einfluß auf das Expressionsmuster von AQP4

Die Regulation des Vasopressin-vermittelten Wasserflusses könnte durch Änderungen in der AQP4-Expression erfolgen. Diese Hypothese ließ sich durch immunhistochemische Untersuchungen nicht bestätigen. Es zeigte sich keine Vasopressin-induzierte Translokation der AQP4 zur Plasmamembran. Tatsächlich waren, ähnlich wie in anderen Zellpopulationen (Nielsen et al., 1997) die Mehrheit der AQP4-Moleküle in kortikalen Astrozyten auch unter Kontrollbedingungen an der Zelloberfläche lokalisiert. Daher ist eine Regulation des Vasopressin-induzierten Wasserflusses durch eine allosterische Modulation des AQP4-Wasserkanals wahrscheinlich. Die Immunogold-Untersuchungen können allerdings keinen Aufschluß über die Reorganisation der AQP4-Plasmamembran-Moleküle im individuellen Membrankompartiment geben. Dies sollte in weiteren Arbeiten durch einen gemeinsamen Ansatz der *freeze fracture*-Methode (Rash et al., 1998) mit Immunogold-Histochemie untersucht werden.

Der Beobachtungen, daß Vasopressin über den V1a-Rezeptor unter physiologischen Bedingungen einen Einfluß auf die kortikale Wasserumverteilung hat, schließt sich die Frage an, ob pathophysiologische Volumenprozesse ebenfalls beeinflusst werden können. Pathophysiologische Volumenprozesse treten z.B. in der Ödementstehung nach einem Schlaganfall oder bei *spreading depressions* auf.

Auswirkungen des V1a-Antagonisten unter pathophysiologischen Bedingungen auf die Zellschwellung

Das Phänomen der *spreading depression* (SD) wurde zuerst von Leão (1944) beobachtet. Er applizierte beim Kaninchen auf die kortikale Oberfläche Kaliumchlorid (KCl)-Lösung und registrierte eine Erniedrigung der EEG-Amplitude und eine Negativierung der kortikalen Gleichspannung. Die SD breitete sich mit einer Geschwindigkeit von 2-5 mm/min über den Kortex aus und hielt etwa 15-30 min an. SDs lassen sich im Kortex (und Hippocampus) durch verschiedene Stimuli auslösen: Applikation von Kaliumkonzentrationen über 10-12 mM, Applikation von Glutamat, massive elektrische Stimulation, mechanische Stimulation, Traumata und Ischämien (Leão, 1947).

In der vorliegenden Arbeit wurden SDs durch eine Kalium-Applikation ausgelöst. Ein Tropfens KCl-Lösung (Konzentration 1 mol/l) wurde an die Pia eines Hirnschnitts aus definierter Entfernung herangespült. Auf diese Weise wurde ein größeres Areal mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen konfrontiert. Dort wo die Kaliumkonzentration im Hirnschnitt am größten ist, startet die SD. Diese läuft über Zellareale, die mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen vorbelastet sind. Die Bedingungen in der Umgebung eines ischämischen Insultes, der von Gewebeuntergang begleitet wird, werden so simuliert.

Die intrinsisch optischen Signale der SDs zeigen einen biphasischen Verlauf. Die SD startete in Kortexschicht I mit einem dunklen Signal (Extrazellulärraumaufweitung) in tangentialer Richtung. Diese dunkle Signal wird schnell von einem hellen Signal (Zellschwellung) abgelöst. Danach breitete sich die SD in der Regel bis Kortexschicht IV aus. Nach 2-3 Minuten konnten in den Randbezirken und in einigen Fällen auch innerhalb des hellen Signals eine Abdunklung beobachtet werden. In den darauffolgenden Minuten verringerte sich die Fläche des hellen Signals immer weiter, während die Fläche der Abdunklung sich

vergrößerte. In den letzten Minuten der Registrierung verschwanden beide Signalanteile (hell und dunkel).

Eine Verringerung von Ausbreitung und Abfolge der SDs nach Ischämien ist möglicherweise bedeutsam unter therapeutischen Gesichtspunkten. In der Umgebung fokaler Ischämien treten in den ersten Stunden nach Beginn der Durchblutungsstörung repetitiv SD-ähnliche Periinfarktdepolarisationen (Back et al., 1994, Hossmann, 1996) auf. Treffen solche Periinfarktdepolarisationen auf vorgeschädigte, aber noch lebende Zellen, so kann der mit der Repolarisation einhergehende starke Energieverbrauch einen Untergang der Zellen, und damit ein Wachsen der ischämischen Läsion zur Folge haben (Hossman, 1996; Iijima et al., 1992). Werden experimentell (z.B. mit epikortikaler KCl-Applikation) SDs in der Umgebung eines ischämischen Insultes ausgelöst, korreliert ihre Anzahl mit der Vergrößerung des resultierenden Infarktes (Back et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Ausbreitung der SDs zu verringern. Der V1a-Antagonist (Phenylac¹, D-Tyr(Me)², Arg^{6,8}, Lys-NH₂⁹)-Vasopressin reduzierte unter physiologischen Bedingungen die Ausbreitung der durch afferente Reizung ausgelösten weißen und schwarzen Welle (Extrazellulärraumschrumpfung und -aufweitung). Dieser Antagonist verringerte auch die Ausbreitung der SDs (Fläche der Zellschwellung) um ca. ein Drittel. In wenigen Fällen (6 von 24) wurden während der folgenden SDs eine deutliche Variabilität der Ausbreitungsareale beobachtet. Dieses Phänomen könnte auf unterschiedliche intrinsische Vasopressin-Konzentrationen in den einzelnen Hirnschnitten (Buijs, 1978; deVries und Miller, 1998) oder auf eine Desensibilisierung gegenüber dem Antagonisten zurückzuführen sein.

Einfluß des V1a-Antagonisten auf die Kinetiken des SD-Verlaufs

Mit Hilfe des Depolarisationsmodells von Hodgkin und Huxley (1952d) können die Kinetiken der SD beschrieben werden. Das Modell beschreibt die Aktivierungs- und die Inaktivierungs-Komponente solcher Prozesse. Wir haben daher die Zeitkonstanten für die Aktivierung und Inaktivierung der SDs berechnet. Dabei sind wir in dem Modell von monoexponentiellen Anstiegen und Abfällen ausgegangen. Die Berechnungen ergaben sowohl für die Aktivierung wie auch für die Inaktivierung einen Trend zur Vergrößerung der Zeitkonstanten. Diese Veränderungen der Zeitkonstanten waren zwar nicht statistisch signifikant, der beobachtete Trend entspricht jedoch den theoretischen Überlegungen: Im Vordergrund stand allerdings nicht die veränderte Kinetik, sondern eine Verminderung der Ausbreitung der SDs. Wir gehen davon aus, dass durch V1a-Antagonisten Wasserkanäle inhibiert werden. Das hat zur Folge, daß die Aufnahme von Kalium-Ionen in die Zellen und die Umverteilung durch das gliale Synzytium erschwert sind, da Aufnahme und Umverteilung mit Wasserflüssen einhergehen, wenn eine Netto-Ionen-Aufnahme erfolgt (Dietzel et al., 1980). Entsprechend wird die Ausbreitung (Fläche) des hellen Signals der SD (Zellschwellung) kleiner. Die verlangsamte Inaktivierung passt ebenfalls zum Befund, daß der V1a-Antagonist die Wasserumverteilung durch das gliale Synzytium reduziert: Ist die Wasserumverteilung erschwert, muß die Zurückbildung der Zellschwellung verlangsamt sein.

Der V1a-Antagonist verstärkt die Extrazellulärraumaufweitung im SD-Verlauf

Auffallend und hoch signifikant war, dass das dunkle Signal der ersten ausgelösten SD einen anderen Verlauf zeigt als die darauffolgenden: Das dunkle Signal war deutlich ausgedehnter als das der folgenden SDs. Die folgenden SDs zeigten dann ein einheitliches Verhalten. Dieser Unterschied zwischen der ersten und den darauffolgenden SDs

steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Menge an intrinsischem Vasopressin, die am Anfang höher ist als später.

Durch den V1a-Antagonisten wurde die Fläche des hellen Signals (Zellschwellung) reduziert, und die Ausdehnung des dunklen Signals (der Extrazellulär-raum-aufweitung) -im Vergleich zu der Größe bei repetitiven SDs unter Kontroll-Bedingungen- vergrößert. Diese Beobachtung läßt sich mit der Vorstellung vereinbaren, daß durch den V1a-Antagonisten eine Wasserumverteilung -und durch die Kopplung auch eine Umverteilung von Kalium-Ionen- durch das gliale Synzytiums erschwert ist. Die Zellen geben Kalium-Ionen und Wasser lokal wieder ab. Dies führt dann zur verstärkten Extrazellulär-raum-aufweitung.

Der V1a-Antagonist hat keinen Einfluß auf das lokale Gleichspannungssignal der SD

Spreading depressions (SD) gehen mit einer Erniedrigung der EEG-Amplitude und eine Negativierung des kortikalen Gleichspannungspotentials einher. Die SD breitet sich mit einer Geschwindigkeit von 2-5 mm/min über den Kortex aus (Leão, 1947). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die elektrophysiologische Registrierung mit einer Feldpotential-elektrode. Diese war in Kortexschicht II/III lokalisiert. Der Potentialsprung in der DC-Registrierung zeigte sich zu dem Zeitpunkt, an dem das intrinsisch optische Signal der SD die Feldpotential-elektrode erreichte.

Die Dauer des DC-Sprungs und die maximale Signalamplitude der DC-Registrierung im Vergleich von Kontrollversuchen und Versuchen, bei denen der Antagonist appliziert wurde, waren nicht signifikant unterschiedlich. Dies läßt sich durch die räumlich begrenzte Reichweite der Feldpotential-elektrode im Bezug auf die Registrierung erklären. Die Position der Elektrode war so gewählt, daß die SD die Elektrode auf jeden Fall erreicht.

Schlußbemerkungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, daß es einen gerichteten Wasserfluß durch das gliale Synzytium gibt, der durch den V1a-Rezeptor reguliert wird. Der schnelle Zeitverlauf der Volumenänderungen deutet auf die Beteiligung eines spezialisierten Wasserkanals hin. Dieser spezialisierte Kanal ist mit großer Wahrscheinlichkeit Aquaporin4. Der direkte Beweis, daß durch Vasopressin die AQP4 direkt beeinflusst werden, steht noch aus. In den nächsten Jahren werden wahrscheinlich Antikörper gegen AQP4 entwickelt, die extrazelluläre Epitope erkennen. Dann ließe sich an lebenden Zellen zeigen, ob sich die sehr wahrscheinliche Beteiligung der AQP4 bei den hier geschilderten Prozessen bestätigt.

In vivo ist der hier beschriebene Efflux-Weg verbunden mit extrazerebralen Flüssigkeitskompartimenten. Da ein Wasserfluß durch AQP4 osmotisch angetrieben ist, erlaubt dieser Kanal einen Wasserfluß auch in die entgegengesetzte Richtung. DePasquale et al. (1989) beschrieben einen Vasopressin-induzierten Netto-Anstieg des Wassergehaltes im Gehirn. Dieser Netto-Anstieg wurde von einer Netto-Akkumulation an Elektrolyten begleitet. Die Aufklärung von Schritten in der Regulation dieses spezialisierten, gerichteten Wasserflusses eröffnet Ansatzmöglichkeiten zur Beeinflussung von Volumenveränderungen. Im pathophysiologischen Modell der *spreading depressions* konnte durch den Einsatz eines V1a-Antagonisten eine Verringerung der Ausbreitung der SD erreicht werden. Dies könnte therapeutisch bedeutsam sein, da in der Umgebung eines Insultes wiederholt SDs auftreten. Die Repolarisierung der Zellen nach einer SD ist Energie-abhängig. Dadurch sterben vorgeschädigte Zellen in der Insult-Umgebung ab und die ursprüngliche Läsion wird größer. In weiteren Arbeiten wäre es interessant, *in vivo* zu untersuchen, ob die

Behandlung mit V1a Antagonisten eine Läsionsverkleinerung -im Vergleich zu Kontrollen- bewirkt.

Therapeutisch von großem Interesse ist ebenfalls die Verhinderung bzw. Verringerung von Ödemen, wie sie z.B. nach einem Schlaganfall auftreten. Möglicherweise könnte der V1a-Antagonist einen verlangsamen oder sogar inhibierenden Einfluß auf den Anstieg des Netto-Wassergehalts ausüben und somit den schnell lebensbedrohlich werdenden ansteigenden Hirndruck vermindern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation gerichteter Wasserflüsse im Gehirn untersucht. Ausgehend davon wurden in einem zweiten Schritt gezielt die Modulation pathophysiologischer Volumenveränderungen analysiert.

Die Kontrolle der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie der damit assoziierten Wasserflüsse im Gehirn ist von großer Bedeutung, da hierdurch z. B. die synaptische Transmission beeinflusst wird. Astrozyten können überschüssiges Kalium u.a. über den sogenannten *spatial buffer*-Mechanismus durch das gliale Synzytium umverteilen. Der schnelle Zeitverlauf der damit gekoppelten Veränderungen des Extrazellulärraumvolumens deutet auf die Beteiligung spezialisierter Wasserkanäle (sehr wahrscheinlich Aquaporin4) hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden Volumenänderungen (Zellschwellung und Extrazellulärraumaufweitung) über größere Gewebeflächen mit Hilfe von intrinsisch optischen Signalen (IOS) und ionensensitiven Mikroelektroden an Hirnschnittpräparaten der Ratte untersucht. Die Volumenänderungen wurden durch pharmakologische Substanzen moduliert und damit Schritte der beteiligten Signalkaskade analysiert: a) Vasopressin verstärkt die Wasserumverteilung durch das gliale Synzytium; b) dieser Effekt erfolgt über den V1a-Rezeptor; c) dieser, durch Vasopressin aktivierte, Rezeptor aktiviert über G-Proteine IP_3 und damit intrazelluläres Kalzium; d) außerdem wird Phosphohokinase C aktiviert. Wenn eine dieser Komponenten inhibiert wird, erfolgt keine verstärkte Wasserumverteilung durch Vasopressin. Die Wasserumverteilung wurde ebenfalls durch einen V1a-Antagonisten verringert.

Dieser Befund lieferte die Hypothese, daß große pathophysiologische Volumenprozesse, wie sie z.B. bei *spreading depressions* (SDs) auftreten, sich ebenfalls durch einen V1a-Antagonisten beeinflussen

lassen. Tatsächlich konnte in einer zweiten Experimentalserie gezeigt werden, daß V1a-Antagonisten die Ausbreitung der SDs um ca. ein Drittel reduzieren.

Die beschriebenen Regulationsmechanismen des gerichteten Wasserflusses liefern Hypothesen, wie pathophysiologische Volumenprozesse im Hirn möglicherweise therapeutisch beeinflußt werden können. Eine Verminderung der SDs wäre beispielsweise nach Ischämien bedeutsam, wo durch die SDs das Hirngewebe, daß das Läsionszentrum umgibt (Penumbra), geschädigt wird und sich damit der Schlaganfall ausweitet. SDs werden auch verantwortlich gemacht als Ursache der transienten neurologischen Ausfälle bei der komplizierten Migräne: denkbar ist, daß klinisch verwendbare V1a-Antagonisten hier therapeutisch bedeutsam sind.

6. Literaturverzeichnis

- Agre, P., Brown, D. und Nielsen, S. (1995) Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 472-483.
- Aitken, P.G., Fayuk, D., Somjen, G.G. und Turner, D.A. (1999) Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18: 91-103.
- Andrew, R.D. und MacVicar, B.A. (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62: 371-383.
- Brightman, M.W., Anders, J.J., Schmechel, P. und Rosenstein, J.M. (1978) The lability of the shape and content of glial cells. In: *Dynymic Properties of glial cells*. Herausgeber: Schoffeniels, E., Frank, G., Tower, D.B. und Hertz. Pergamon Press, Oxford 21-44.
- Back, T., Ginsberg, M.D., Dietrich, W.D. und Watson, B.D. (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 202-213.
- Back, T., Kohno, K. und Hossmann, K.A. (1994) Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 12-19.

- Blomstrand, F., Aberg, N.D., Eriksson, P.S., Hansson, E. und Ronnback, L. (1999) Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92: 255-265.
- Brinton, R.D., Yamazaki, R.S., Chen, Q. und Son, M. (1998) Vasopressin action in the mammalian cerebral cortex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449: 211-213.
- Buijs, R.M. (1987) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192: 423-435.
- Chen, C., Diaz Brinton, R.D., Shors, T.J. und Thompson, R.F. (1993) Vasopressin induction of long- lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus. *Hippocampus* 3: 193-203.
- Csiba, L., Paschen, W. und Mies, G. (1985) Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain. *Brain Res.* 336: 167-170.
- DePasquale, M., Patlak, C.S. und Cserr, H.F. (1989) Brain ion and volume regulation during acute hypernatremia in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol.* 256: F1059-F1066.
- de Vries, G.J. und Miller, M.A. (1998) Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain, *Prog. Brain Res.* 119:3-20.

- Diaz Brinton, R. (1999) Vasopressin in the mammalian brain: the neurobiology of a mnemonic peptide. *Prog. Brain Res.* 119: 177-199.
- Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G. und Lux, H.D. (1980) Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp. Brain Res.* 40: 432-439.
- Dodt, H.U., Hager, G. und Zieglgansberger, W. (1993) Direct observation of neurotoxicity in brain slices with infrared videomicroscopy. *J. Neurosci. Methods* 50: 165-171.
- Dodt, H.U. und Zieglgansberger, W. (1994) Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function *Trends. Neurosci.* 17: 453-458.
- Eisenmann, G. (1962) Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* 2: 259-323.
- Gardner-Medwin, A.R., Gibson, J.L. und Willshaw, D.J. (1979) The mechanism of potassium dispersal in brain tissue [proceedings]. *J. Physiol.* 293: 37P-38P.
- Gardner-Medwin, A.R. (1977) The migration of potassium produced by electric current through brain tissue [proceedings]. *J. Physiol.* 269: 32P-33P.
- Gault, L.M., Lin, C.W., LaManna, J.C. und Lust, W.D. (1994) Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression. *Brain Res.* 641: 176-180.

- Greenfield, L.J.J., Hackett, J.T. und Linden, J. (1990) Xenopus oocyte K⁺ current. III. Phorbol esters and pH regulate current at gap junctions. *Am. J. Physiol.* 259: C792-C800.
- Hansen, A.J. und Olsen, C.E. (1980) Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol. Scand.* 108: 355-365.
- Heinemann, U. und Lux, H.D. (1977) Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 120: 231-249.
- Hill, D.K. und Keynes, R.D. (1949) Opacity changes in stimulated nerve. *J. Physiol.* 108: 278-281.
- Hodgkin, A.L. und Huxley, A.F. (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117: 500-522.
- Holthoff, K. und Witte, O.W. (1996) Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near- infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J. Neurosci.* 16: 2740-2749.
- Holthoff, K. und Witte, O.W. (1998) Intrinsic optical signals in vitro: a tool to measure alterations in extracellular space with two-dimensional resolution. *Brain Res. Bull.* 47: 649-655.
- Holthoff, K. und Witte, O.W. (2000) Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia* 29: 288-292.

- Hossmann, K.A. (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8: 195-208.
- Huang, B. und Karwoski, C.J. (1992) Light-evoked expansion of subretinal space volume in the retina of the frog. *J. Neurosci.* 12: 4243-4252.
- Iijima, T., Mies, G. und Hossmann, K.A. (1992) Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 727-733.
- Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M. und Agre, P. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 13052-13056.
- Kenyon, J.L. und Gibbons, W.R. (1977) Effects of low-chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers, *J. Gen. Physiol.* 70: 635-660.
- Kreisman, N.R., LaManna, J.C., Liao, S.C., Yeh, E.R. und Alcala, J.R. (1995) Light transmittance as an index of cell volume in hippocampal slices: optical differences of interfaced and submerged positions. *Brain Res.* 693: 179-186.
- Landgraf, R. (1992) Central release of vasopressin: stimuli, dynamics, consequences. *Prog. Brain Res.* 91: 29-39.
- Leão, A.A.P. (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7: 359-390 1944

- Leão, A.A.P. (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 10: 409-419.
- MacVicar, B.A. und Hochman, D. (1991) Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 11: 1458-1469.
- Marrannes, R., Willems, R., De Prins, E. und Wauquier, A. (1988) Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.* 457: 226-240.
- McManus, M., Fischbarg, J., Sun, A., Hebert, S. und Strange, K. (1993) Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am. J. Physiol.* 265: C562-C570.
- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P. und Ottersen, O.P. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci.* 18: 2506-2519.
- Nicholson, C. und Phillips, J.M. (1981) Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 321:225-57.
- Nielsen, S., DiGiovanni, S.R., Christensen, E.I., Knepper, M.A. und Harris, H.W. (1993) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 11663-11667.

- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P. und Ottersen, O.P. (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high- resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17: 171-180.
- Norup, E., Smitt, U.W. und Christensen, S.B. (1986) The potencies of thapsigargin and analogues as activators of rat peritoneal mast cells. *Planta Med.* 4: 251-255.
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G. und Kuffler, S.W. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 29: 788-806.
- Orkand, R.K. (1980) Extracellular potassium accumulation in the nervous system. *Fed. Proc.* 39: 1515-1518.
- Peters, A. (1962) Plasma membrane contacts in the central nervous system. *J.Anat. (Lond.)* 96: 237-248
- Polischuk, T.M., Jarvis, C.R. und Andrew, R.D. (1998) Intrinsic optical signaling denoting neuronal damage in response to acute excitotoxic insult by domoic acid in the hippocampal slice. *Neurobiol. Dis.* 4: 423-437.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. und Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387.
- Rash, J.E., Yasumura, T., Hudson, C.S., Agre, P. und Nielsen, S. (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat

brain and spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 11981-11986.

Ransom, B.R., Yamate, C.L. und Connors, B.W. (1985) Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study. J. Neurosci. 5: 532-535.

Robinson, I.C. (1983) Neurohypophysial peptides in cerebrospinal fluid. Prog. Brain Res. 60: 129-145.

Sarfaraz, D. und Fraser, C.L. (1999) Effects of arginine vasopressin on cell volume regulation in brain astrocyte in culture. Am. J Physiol. 276: E596-E601.

Sofroniew, M.V. (1983) Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. Prog. Brain Res. 60: 101-114.

Somjen, G.G., Rosenthal, M., Cordingley, G., LaManna, J. und Lothman, E. (1976) Potassium, neuroglia, and oxidative metabolism in central gray matter. Fed. Proc. 35: 1266-1271.

Thibonnier, M., Auzan, C., Madhun, Z., Wilkins, P., Berti-Mattera, L. und Clauser, E. (1994) Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. J. Biol. Chem. 269: 3304-3310.

Yang, B. und Verkman, A.S. (1997) Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 272: 16140-16146.

- Vaughan-Jones, R.D. (1979) Non-passive chloride distribution in mammalian heart muscle: micro-electrode measurement of the intracellular chloride activity. *J. Physiol*, 295: 83-109.
- Witte, O.W., Niemann, H. und Holthoff, K. (2001) Cell swelling and ion redistribution assessed with intrinsic optical signals. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73: (im Druck).
- Zilles, K. (1985) *The cortex of the rat (A stereotaxic atlas)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lebenslauf

Name	Heike Niermann
Geburtsdatum:	01.12.1970 in Neheim-Hüsten (heute Arnsberg)
Schulausbildung:	1977-1981 Mühlenberg-Grundschule der Stadt Arnsberg 1981-1990 St. Ursulagymnasium der Stadt Arnsberg, 1990 Abitur
Hochschulausbildung:	WS 1990/91–WS191/92 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf SS 1992 Quereinstieg in den Studiengang Diplom-Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf September 1997-Mai 1998 Diplomarbeit mit dem Thema „Einfluß kollagenreduzierender Substanzen auf die läsionsinduzierte Glia- und Extrazellulärmatrix-Reaktion im postkommissuralen Fornix der adulten Ratte“ bei Frau PD. Dr. C.C. Stichel-Gunkel in der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie, Prof. Dr. H. W. Müller.
berufliche Tätigkeit:	seit Juni 1998 Arbeit an der Dissertation im Labor von Herrn Prof. Dr. O. W. Witte in der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
Stipendium:	seit 01.01.2000 Stipendiatin der Entrepreneurs Foundation Düsseldorf

Danksagung

Herrn Professor Dr. O. W. Witte, Oberarzt der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung des Themas, die stets hilfreichen Diskussionen und für das hervorragende Arbeitsklima im Labor.

Herrn Professor Dr. H. Mehlhorn, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. H.-J. Freund, Direktor der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Professor Dr. O. P. Ottersen, Anatomisches Institut der Universität Oslo, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. K. Holthoff danke ich für die Einweisung in das Thema der intrinsisch optischen Signale und fruchtbare Diskussionen.

Herrn Dr. C. Brühl danke ich für seine Unterstützung bei elektrophysiologischen Fragestellungen und für viele hilfreiche Diskussionen über Kinetiken von biologischen Prozessen.

Allen Kolleginnen und Kollegen, Herrn Dipl.-Biol. R. Buchholz, Frau Dipl.-Biol. Armelle Divanac'h, Herrn Dr. G. Hagemann, Frau S. Hamm, Frau Dr. K. Keyvani, Herrn Dipl.-Biol. M. Kluska, Herrn Dr. T. Neumann-Haefelin, Herrn Dr. O. Peters, Herrn Dr. C. Redecker, Frau Dipl.-Biol. S. Reinecke, Herrn Dipl. Biol. E. Sagnak, Herrn Dr. K. Schiene, Herrn C. Schorn, Herrn Dr. M. Schroeter, Frau Dipl.- Biol. E. Shanina, Frau D. Steinhoff danke ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Hilfestellung.

Besonders bedanken möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung meiner Eltern Heinz und Hedwig Niermann und meines Partners Jürgen Krutmann.

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Doktorschrift eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation ist in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch keiner anderen Institution eingereicht worden. Ich versichere, daß ich keine erfolglosen Promotionversuche unternommen habe.

Heike Niermann