

7. DISKUSSION

7.1 DBcAMP-stimulierte kultivierte Astrozyten als Modell der Situation *in vivo*

Die komplexe Architektur des ZNS bedingt, dass auf engstem Raum Zellen mit den unterschiedlichsten Funktionen interagieren. Im Hinblick auf experimentelle Studien bedeutet dies, dass eine Veränderung des zellulären Phänotyps durch einen exogenen Stimulus wie in diesem Falle Hypoxie immer durch zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen bedingt sein kann:

1. Die Wirkung des exogenen Stimulus auf die Zielzelle ist direkt, d. h. unabhängig vom zellulären Umfeld oder extrazellulären Milieu.
2. Die Wirkung des exogenen Stimulus auf die Zielzelle ist indirekt, d. h. durch den Stimulus bewirkte Veränderungen im zellulären oder humoralen Umfeld bewirken erst sekundär die Veränderung der Zielzelle.

Eine Unterscheidung dieser grundsätzlichen Mechanismen im experimentellen Modell ist bei Untersuchungen am intakten Gewebe entweder unmöglich oder mit hohem Aufwand verbunden (z. B. durch zellspezifische oder lokale Applikation des Stimulus). Um dieses methodische Problem zu umgehen, wurden Zellkulturmodelle geschaffen, die die Betrachtung nur einer Zellart unabhängig von Gewebearchitektur und extrazellulärem Milieu gestatten. Dies impliziert natürlich den Nachteil, dass der so untersuchte zelluläre Phänotyp *in vitro* sich von dem *in vivo* unterscheidet.

In dieser Studie wurde DBcAMP verwendet, um den morphologischen und funktionellen Phänotyp der kultivierten Astrozyten dem *in vivo* anzunähern. DBcAMP bewirkt, wie in früheren Studien gezeigt wurde (70,71), eine morphologische Differenzierung mit Ausbildung multipler Zellfortsätze. Zusätzlich exprimieren diese Zellen erhöhte Mengen an GFAP und Glutamin-Synthetase (72,73), die *in vivo* als Marker astrozytärer Differenzierung betrachtet werden (144,145). Auch sind diese Zellen effektiver in der Eliminierung extrazellulären K^+ als unbehandelte Astrozyten(146), was ebenfalls eine Annäherung an den Phänotyp *in vivo* bedeutet. Damit bieten die DBcAMP-stimulierten Astrozyten als kultivierte Zellen die Vorteile

der Kontrolle über den Extrazellulärraum und der Isolierung von der zerebralen Mikroarchitektur, während der Nachteil der Veränderung des zellulären Phänotyps im Vergleich zu Astrozyten *in vivo* zumindest minimiert wird.

Ein potentielles Problem in der Präparation primärer Zellkulturen ist die Kontamination mit anderen Zellarten. Im Fall der Astrozytenpräparation sind dies hauptsächlich Oligodendrozyten und Mikrogliazellen (138). Aus diesem Grund wurde die Methode von McCarthy und deVellis (138) zur Präparation verwendet, die durch mechanische Separation der verschiedenen Zellarten eine hohe Reinheit der Astrozytenkulturen gewährleistet. Durch phasenkontrastmikroskopische Differenzierung der Zellarten und Anfärbung der Zellen mit einem astrozytenspezifischen GFAP-Antikörper wurde der Astrozytengehalt für die in dieser Studie verwendeten Astrozytenkulturen mit mehr als 95% der Gesamtzellzahl ermittelt (2). Die demnach maximal 5% betragende Kontamination mit anderen Zellarten stellt nur bei der Verwendung hochsensitiver Methoden, wie z. B. der PCR zur qualitativen und quantitativen Messung der Genexpression, ein Problem dar. Aus diesem Grund wurde als einziges Transkript in dieser Studie ORP 150 mRNA mittels RT-PCR gemessen, da es ein spezifisch in Astrozyten exprimiertes Gen darstellt (139). Zur Quantifizierung der Genexpression von Komponenten des ET-Systems wurden *Northern Blots* verwendet, die nur in der Lage sind, mittelgradig bis stark exprimierte Transkripte zu detektieren. Daher ist die Detektion von ausschließlich in kontaminierenden Zellen exprimierten Transkripten durch diese Methode unwahrscheinlich.

7.2 Effekte der Hypoxie auf kultivierte Astrozyten

Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass bei schwerer arterieller Hypoxie (paO_2 31mmHg) der mediane O_2 -Partialdruck in oberflächennahen Zellen der Großhirnrinde bei etwa 5 mmHg liegt, während unter normoxischen Bedingungen ein medianer O_2 -Partialdruck von etwa 25 mmHg zu finden ist (147). In den am schlechtesten mit Sauerstoff versorgten Zellen im Versorgungsbereich des venösen Kapillarendes sind auch unter normoxischen Bedingungen O_2 -Paritaldrücke zwischen 1 und 2 mmHg zu erwarten. Der kritische O_2 -Partialdruck der Mitochondrien, unterhalb dessen die reduzierte Cytochromoxidase nicht mehr vollständig oxidiert werden kann und damit der Energiestoffwechsel zum Erliegen kommt, liegt in Abhängigkeit von Gewebe- und Zellart zwischen 0,1 und 1 mmHg (148). In dieser Studie wurden Astrozyten für 24 Stunden einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 0,48 mmHg ausgesetzt. Folglich war eine ausgeprägte zelluläre Hypoxie mit zumindest partieller Kompromittierung des oxidativen Metabolismus zu erwarten.

Zur Überprüfung dieser theoretischen Erwartungen wurde die Effizienz der Induktion von hypoxieinduzierten pathophysiologischen Veränderungen in den hypoxischen Astrozyten getestet. Zu diesem Zwecke wurde die Expression von ORP 150, einem unter hypoxischen Bedingungen in Astrozyten induzierten Stressprotein (139), gemessen. Dafür wurde cDNA aus Astrozytenkulturen als *Template* in einer ORP 150-spezifischen PCR verwendet. Auf diese Weise wurde nur in hypoxischen, nicht aber in normoxischen Astrozyten OPR 150-mRNA detektiert (**Abb 6-1**), was dafür spricht, dass die Hypoxie bei den verwendeten Zellen in der Lage war, die korrespondierenden pathophysiologischen Veränderungen zu induzieren.

Auf der anderen Seite war es wichtig auszuschließen, dass eine 24-stündige Hypoxie zytotoxisch auf die Zellen wirkt. Zwar kann auch die zerebrale Hypoxie *in vivo* Astrozyten vital schädigen, nur können diese in der Folge zellulärer Nekrose beobachteten Veränderungen nicht mehr als spezifische Folge der Hypoxie betrachtet werden. In einer früheren Studie von Lyons und Kettenmann (2) konnte anhand des auch in der vorliegenden Studie verwendeten Hypoxiemodells gezeigt werden, dass kultivierte Astrozyten sogar 42 Stunden Hypoxie ohne signifikante

Zellschädigung überleben. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden in der vorliegenden Studie nach 24-stündiger Hypoxie der DBcAMP-behandelten Astrozyten Propidiumjodidfärbungen durchgeführt, um Zellen mit kompromittierter Membranfunktion zu identifizieren (**Abb. 6-2**). Die Propidiumjodidfärbung stellt eine häufig angewandte Methode zur Detektion von Zytotoxizität dar (149). Dabei zeigte sich, dass der Anteil positiv gefärbter Zellen in den hypoxischen Kulturen unter 2% lag und sich nicht von dem in normoxischen Kulturen unterschied. Zusätzlich zeigten sich auch in der Phasenkontrastmikroskopie keine Zeichen der zellulären Schädigung, sondern lediglich die morphologischen Veränderungen, die Gegenstand dieser Arbeit sind (**Abb. 6-3**). Damit wurden die Voraussetzungen für die Validität der im folgenden diskutierten Beobachtungen als erfüllt betrachtet: Unter den experimentellen Bedingungen der Studie werden die für zelluläre Hypoxie typischen pathophysiologischen Veränderungen induziert, ohne die Zellen vital zu schädigen.

7.3 Hypoxieinduzierte morphologische Transformation kultivierter Astrozyten

Während funktionelle Astrozyten nach Ischämie und Hypoxie aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus neuroprotektive Effekte haben (43-50) und an der Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses mitwirken (52,53), scheint die Hypoxie ihrerseits die Astrozytenfunktionen zu beeinträchtigen. An kultivierten Astrozyten wurde beobachtet, dass durch Hypoxie sowohl die Fähigkeit zur Glutamat-Aufnahme beeinträchtigt wird, als auch die Aktivität des für die Glutamat-Elimination wichtigen Enzyms Glutaminsynthetase vermindert wird (59,60). Auch die Eigenschaft, die Ionenhomöostase zu gewährleisten, ist durch die Hypoxie eingeschränkt (61). Diese Effekte scheinen zum Teil durch einen hypoxieinduzierten Verlust astrozytärer Zellfortsätze bedingt zu sein, der als Clasmatomodendrosis bezeichnet wird (62). Während dieser Prozess *in vivo* schon vielfach beschrieben wurde (63-66), ist die Simulation in Zellkultur bisher nicht gelungen, da sich kultivierte Astrozyten unter Basisbedingungen morphologisch deutlich von Astrozyten *in vivo* unterscheiden und nach Hypoxie keine morphologischen Veränderungen zeigen.

Durch die Vorbehandlung kultivierter Astrozyten mit DBcAMP ist es in dieser Studie erstmals gelungen, der astrozytären Clasmatomodendrosis *in vivo* analoge morphologische Veränderungen *in vitro* zu beobachten. Während diese Zellen nach 24-stündiger Inkubation unter normoxischen Bedingungen eine zellfortsatzreiche Morphologie aufweisen (**Abb. 6-3 C**), führt die 24-stündige Hypoxie zu einem Verlust der zytoplasmatischen Fortsätze (**Abb. 6-3 D**). Während die morphologische Ähnlichkeit zwischen Clasmatomodendrosis *in vivo* und der hier beobachteten Reaktion augenfällig ist, sind zur näheren Charakterisierung der Analogie weitere Untersuchungen erforderlich. So steht die Charakterisierung eventueller Analogien im Verhalten astrozytärer Differenzierungsmarker wie Glutaminsynthetase und GFAP noch aus. Endothelin, das – wie in den nächsten Abschnitten diskutiert werden wird – einen wichtigen Mediator der hypoxieinduzierten morphologischen Veränderungen darstellt, bewirkt neben dem Verlust der Astrozytenfortsätze auch eine stark verminderte Aktivität der Glutaminsynthetase in diesen Zellen (77), was

auf eine Verminderung des Differenzierungsgrades hindeutet. Dazu passt auch die weiter unten diskutierte Beobachtung einer verminderten Expression des ET_BR in der vorliegenden Studie, die auf eine Dedifferenzierung der Zellen hinweist (77). Dies legt nahe, dass die hypoxieinduzierten morphologischen Veränderungen Ausdruck eines verminderten Differenzierungsgrades der Zellen sind.

Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse das Modell eines hypoxiebedingten Verlustes wichtiger Astrozytenfunktionen mit der Folge einer Verminderung neuroprotektiver Eigenschaften. Die Identifikation von Mediatoren dieser Reaktion ist Voraussetzung für das Verständnis von Mechanismen der zerebralen Schädigung nach Hypoxie und für die Entwicklung potentieller therapeutischer Ansätze.

7.4 Regulation der Endothelin-System-Genexpression durch Hypoxie

7.4.1 Endothelin-Biosynthese

Astrozyten sind je nach Untersuchungsbedingungen in der Lage wichtige Komponenten des Endothelin-Systems zu exprimieren (121,126,136,137). Im Tiermodell der globalen zerebralen Ischämie zeigen Astrozyten, die unter physiologischen Bedingungen kein ET bilden, bereits in der Frühphase der Ischämie ET-Immunoreaktivität, welche 24 Stunden nach Ischämie und darauffolgender Reperfusion ein Maximum erreicht (127-129). Kultivierte Astrozyten weisen im Gegensatz zu Astrozyten *in vivo* bereits eine Basisexpression von ET-1 auf (131). In Überständen hypoxischer Astrozytenkulturen unter Basisbedingungen finden sich im Vergleich zu normoxischen Kulturen erhöhte ET-Spiegel, was von einer Verminderung der Messenger-RNAs (mRNAs) für den ET_AR und ET_BR begleitet wird (131,133).

Während diese Ergebnisse in niedrig differenzierten Astrozytenkulturen erhoben wurden, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit zu charakterisieren, wie sich Hypoxie auf die Expression von Komponenten des ET-Systems in DBcAMP-behandelten, *stellaten* Astrozyten auswirkt. Eine 24-stündige Hypoxie dieser Zellen bewirkte im Vergleich zu normoxischen Zellen einen ca. 3-fachen Anstieg der Expression von Präproendothelin-1-mRNA, was von einem 1,5-fachen Anstieg des ET-Peptids in den Kulturüberständen begleitet war. Dies zeigt, dass die Regulation der ET-Expression durch Hypoxie zumindest teilweise auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Die Tatsache, dass der Anstieg der Präproendothelin-1-mRNA stärker ist als der des ET-Peptids, kann durch verschiedene Umstände bedingt sein: Einerseits detektiert der im RIA verwendete Antikörper alle ET-Isoformen, so dass ET-2, insbesondere aber ET-3 zur gemessenen ET-Konzentration beiträgt. Während Präpro-ET-3-mRNA in kultivierten Astrozyten durch *Northern Blots* nicht detektierbar ist, kann sie durch RT-PCR identifiziert werden, was auf nur geringe Mengen dieses Transkripts hindeutet (131). Unter der Voraussetzung einer effektiven Translation

könnte ET-3 die Gesamt-ET-Menge in den Überständen aber erhöhen, was durch eine frühere Studie unterstützt wird (132). Bei einer Steigerung der ET-1-Produktion durch Hypoxie wäre demnach nur ein vergleichsweise geringerer Anstieg der Gesamt-ET-Konzentration in den Überständen zu erwarten. Eine weitere Ursache für den nur moderaten Anstieg des ET-Peptids in den Medienüberständen nach Hypoxie kann in einer intrazellulären Translokation des vermehrt gebildeten Peptids gesucht werden. Eine ET-Rezeptor-vermittelte Internalisierung extrazellulären Endothelins ist beschrieben worden (150) und könnte unter Hypoxie mit veränderter Effizienz stattfinden. Natürlich wären auch andere Ursachen dafür denkbar, dass unter der Hypoxie die extrazelluläre Halbwertszeit des Endothelins verändert ist, wie beispielsweise die Induktion degradierender Enzyme.

Während die genannten möglichen Ursachen für den im Vergleich zur Präproendothelin-1-mRNA geringen Anstieg des ET-Peptids von einer intakten Prozessierung der mRNA zum aktiven Peptid ausgehen, könnte durch die zelluläre Hypoxie auch die Aktivität der an der Endothelin-Biosynthese beteiligten Enzyme verändert werden. Insbesondere das ECE scheint bei der Bildung reifen Endothelins in vielen Organen ein Schlüsselenzym darzustellen (94,151). Durch *in-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass Astrozyten *in vivo* unter physiologischen Bedingungen weder ECE-1- noch ECE-2-Transkripte enthalten (120), was gegen eine vollständige Prozessierung des gebildeten Präproendothelins in diesen Zellen spricht. Da andererseits Neurone sowohl ECE-1- als auch ECE-2-mRNA enthalten und immunreaktives ECE-1 und ECE-2 im Bereich neuronaler Fortsätze gefunden wird, ist von uns und anderen gemutmaßt worden, dass in Astrozyten gebildetes *Big*-Endothelin nach Spaltung durch neuronal lokalisiertes ECE zu Endothelin aktiviert wird, welches dann wiederum an astrozytäre Endothelin-Rezeptoren bindet (120-122). Dieses Modell basiert auf der Voraussetzung einer intensiven Interaktion von Astrozyten mit Neuronen, wie sie insbesondere im Bereich von Synapsen beobachtet wird. Dadurch wäre eine streng lokalisierte, auf einzelne Synapsen begrenzte Endothelinbildung möglich.

Unter bestimmten Bedingungen weisen jedoch auch Astrozyten eine eigene ECE-Aktivität auf. So fanden Davenport *et al.* (122) in perivaskulären Astrozyten in humanem Gewebe immunreaktives ECE-1 und ECE-2. Auch in kultivierten Astrozyten lässt sich ECE-Aktivität nachweisen (152). Während die von uns

verwendeten kultivierten Astrozyten nur geringe Mengen an ECE-1-mRNA enthalten (131), exprimieren sie ECE-2-mRNA konstitutiv auf höherem Niveau (131). Auch die in der vorgelegten Studie verwendeten DBcAMP-behandelten Astrozyten exprimieren unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen ECE-2-mRNA (**Abb. 6-6**). Ob ECE-2 in den Zellen für die Generierung reifen Endothelins notwendig und hinreichend ist, kann aus den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Auch wenn die Expression von ECE-2-mRNA unter Hypoxie unverändert war, ist eine Änderung der Enzymaktivität unter dieser Bedingung denkbar. Insbesondere ist die Aktivität des in Zellvesikeln lokalisierten ECE-2 stark pH-abhängig und erreicht ein Maximum bei pH 6,1 (84). Der intrazelluläre – und damit unter Umständen auch intravesikuläre - pH-Wert hypoxischer Astrozyten ist stark von der Glucosekonzentration abhängig, scheint aber bei Normoglykämie im neutralen bis alkalischen Bereich zu liegen und nur bei Hyperglykämie entsprechend dem azidotischen hypoxischen Interstitium abzufallen (153). Demnach ist bei den in der vorgestellten Studie verwendeten normoglykämischen Bedingungen eher mit einem Anstieg des astrozytären pH-Werts zu rechnen, der zu einer verminderten ECE-2-Aktivität führen würde. Dies könnte eine weitere Erklärung für den relativ geringen Anstieg des Endothelin-Peptids im Überstand der Zellen bei deutlichem Anstieg der Präproendothelin-1-mRNA sein.

Während in Bezug auf die exakte Regulation der Endothelin-Biosynthese in Astrozyten *in vivo* und in Zellkultur also noch Fragen offen bleiben, so kann als Ergebnis der vorliegenden Studie doch geschlossen werden, dass Hypoxie zu einer verstärkten Endothelin-Bildung in den verwendeten kultivierten Astrozyten führt, die ganz oder teilweise auf einer Erhöhung der Präproendothelin-1-mRNA beruht.

7.4.2 Endothelin-Rezeptoren

Die Wirkung des Endothelins wird in den Zielzellen über Bindung an ET-Rezeptoren vermittelt. Der ET_BR stellt die Hauptisoform im ZNS dar und ist vorrangig auf Gliazellen lokalisiert (123,136,154,155). Ischämie und Reperfusion bewirken in der betroffenen Hirnregion zunächst bereits nach etwa einer Stunde eine Reduktion der ET-Rezeptor-Dichte (127). Dagegen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der ET-

Rezeptor-Dichte nach 4 bis 7 Tagen, der wahrscheinlich durch astrozytäre Proliferation bedingt ist (130).

Analog beobachteten wir in kultivierten Astrozyten unter Basisbedingungen eine deutliche Verminderung der Expression von ET_AR- und ET_BR-mRNA nach Hypoxie (131). Die vorliegende Studie bestätigt diese Beobachtung auch in mit DBcAMP vorbehandelten Astrozyten. Es zeigte sich, dass die Hypoxie eine signifikante Verminderung der ET_AR- und ET_BR-mRNAs auf etwa 20% der normoxischen Kontrollen bewirkte (**Abb. 6-6**). Für diese Verminderung der ET-Rezeptor-Expression kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Auf der einen Seite können erhöhte Ligandenkonzentrationen zu einer *Down*-Regulation des zugehörigen Rezeptors führen. So konnte von Ehrenreich *et al.* für kultivierte Astrozyten gezeigt werden, dass Stimulation mit ET-1 zur verminderten Expression von ET_AR mRNA in diesen Zellen führt (126). Dagegen konnte dieselbe Studie einen solchen Effekt für den ET_BR nicht nachweisen. Eine mögliche Erklärung für die verminderten ET_BR-mRNA-Mengen kann in einer hypoxieinduzierten Veränderung des Differenzierungsgrades der kultivierten Astrozyten liegen. So bewirkt die Differenzierung von kultivierten Astrozyten mittels DBcAMP einen deutlichen Anstieg der ET_BR mRNA (77). Dagegen bewirkt die Hypoxie – wie in Abschnitt 7.3 beschrieben – eine morphologische Dedifferenzierung mit Verlust zytoplasmatischer Fortsätze. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass Hypoxie den Differenzierungsmarker Glutaminsynthetase in Astrozyten reduziert (59). Folglich könnte die verminderte ET_BR-mRNA nach Hypoxie Ausdruck des verminderten Differenzierungsgrades dieser Zellen sein.

Wie in Experimenten, die nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind, gezeigt werden konnte, ist die Verminderung der ET-Rezeptor-Transkripte nicht von einem Verlust der Rezeptorfunktion begleitet (156). So war die extrazelluläre Applikation von ET-1 in den hypoxischen, DBcAMP-behandelten Astrozyten in der Lage, Anstiege der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration hervorzurufen. Diese Antwort ist ET_BR-vermittelt (157) und deutet auf eine erhaltene Funktionalität der ET-System-vermittelten Signaltransduktion hin.

7.5 Die Aktivierung des astrozytären Endothelin-Systems induziert die morphologische Transformation durch Hypoxie

Die Arbeitsgruppen von Hama (77) und Koyama (78) publizierten Anfang der 90er Jahre unabhängig voneinander die Beobachtung, dass die Behandlung von DBcAMP-stimulierten, *stellaten* Astrozyten mit Endothelin zu einer morphologischen Transformation mit Verlust der Zellfortsätze führt. Dies beruht auf der Fähigkeit Endothelins, die Polymerisierung zytoplasmatischer Aktin-Filamente mit Ausbildung sogenannter Stress-Fasern zu induzieren (135). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen morphologischen Veränderungen DBcAMP-behandelter Astrozyten bei Hypoxie weisen deutliche Ähnlichkeiten zu den ET-induzierten Veränderungen auf. In **Abb. 6-7** zeigt sich, dass die phasenkontrastmikroskopische Morphologie der Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 100 nM ET-1 (**A**) von der nach 24 h Hypoxie (**C**) qualitativ nicht unterscheidbar ist.

Es lag daher nahe zu vermuten, dass die hypoxieinduzierte Aktivierung des Endothelin-Systems die morphologischen Veränderungen vermittelt. Um diese Hypothese zu testen, wurde die ET-vermittelte Signaltransduktion während der Hypoxie mit Hilfe von ET-Rezeptor-Antagonisten blockiert. Während der ET_BR die Hauptrezeptorisoform in Astrozyten darstellt (77,131), scheint die Kombination von ET_AR und ET_BR für einige astrozytäre Antworten notwendig zu sein (158,159). Um eine kombinierte Blockade von ET_AR und ET_BR zu erreichen, wurden daher die nicht-selektiven ET-Rezeptor-Antagonisten PD142893 oder PD145065 verwendet. Diese waren in der Lage, sowohl die ET-1-vermittelte (**Abb. 6-4; Abb. 6-7B**) als auch die hypoxievermittelte (**Abb. 6-4; Abb. 6-7D**) morphologische Transformation zu blockieren. Diese Beobachtung deutet auf eine zentrale Rolle des Endothelin-Systems als Mediator der morphologischen Veränderungen während der Hypoxie hin. **Abb. 7-1** fasst den daraus resultierenden Mechanismus der Induktion morphologischer Veränderungen durch Hypoxie zusammen.

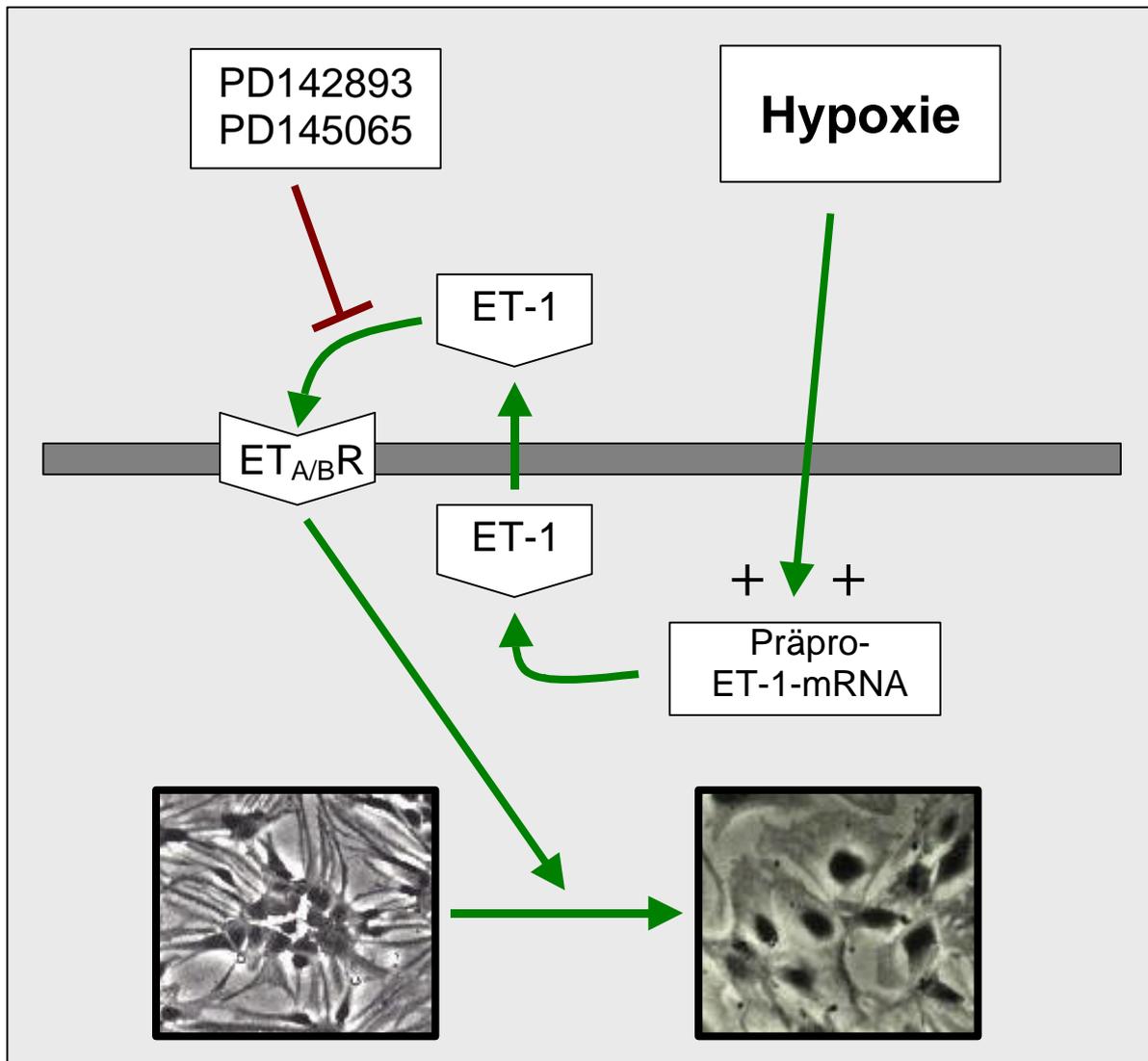


Abb. 7-1 Endothelinabhängige Transformation hypoxischer Astrozyten Hypoxie führt in kultivierten DBcAMP-behandelten Astrozyten zur verstärkten Expression von Präproendothelin-1-mRNA mit konsekutiv verstärkter Sekretion von ET-1 ins Medium. Dieses bewirkt durch Bindung an ET-Rezeptoren auf den Astrozyten eine Änderung der Morphologie mit Verlust zytoplasmatischer Fortsätze.

7.6 Potentielle Bedeutung für die Situation *in vivo*

Unsere Beobachtungen zeigen, dass das Verhalten von Astrozyten *in vivo* und in Zellkultur durchaus Parallelen aufweist. Der Verlust astrozytärer Zellfortsätze nach Ischämie oder Hypoxie *in vivo* (64-66) hat die potentielle Konsequenz einer Einschränkung der neuroprotektiven Effekte dieser Zellen. Gleichzeitig weisen Astrozyten *in vivo* bereits kurze Zeit nach Beginn der Ischämie ET-1-Immunoreaktivität auf. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellkulturmodell zeigt ein zur Situation *in vivo* analoges Verhalten. Dabei ist das zentrale Ergebnis, dass der Verlust zellulärer Fortsätze während der Hypoxie durch das Endothelin-System vermittelt wird. Überträgt man diese Erkenntnis auf die Situation *in vivo*, so lässt sich mutmaßen, dass die Clasmotodendrosis von Astrozyten während zerebraler Ischämie oder Hypoxie durch das Endothelin-System vermittelt wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung deutlicher Veränderungen der Endothelin-System-Expression in Astrozyten *in vivo* während der Ischämie unterstützt (127,128,130). In Tiermodellen der zerebralen Ischämie konnten für SB209670, einen nicht-selektiven ET-Rezeptor-Antagonisten, nach intravenöser oder intrazerebroventrikulärer Applikation positive Effekte auf Infarktvolume und neuronales Überleben gezeigt werden (160,161). Allerdings sind die Mechanismen dieses Effekts unklar. Während hämodynamische Faktoren und Effekte auf zerebrale Blutgefäße mit konsekutiver Änderung des Blutflusses eine Rolle spielen könnten, besteht auch die Möglichkeit einer Wirkung der ET-Rezeptor-Blockade auf Zellen des ZNS dieser Tiere mit den potentiell resultierenden protektiven Effekten. Eine gezielte Untersuchung des Einflusses einer Blockade des ET-Systems auf die Astrozytenmorphologie während zerebraler Ischämie im Tiermodell wird daher erforderlich sein, um die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen genauer einzuordnen.