

Cornelius Hirsch
Dr. med.

Auswirkungen von extrazellulärer Hyperosmolalität und Alkalose auf die endotheliale Zelllinie EA.hy 926

Geboren am 29.05.1977 in Bielefeld
Reifeprüfung am 12.06.1996 in Lemgo
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1998 bis SS 2005
Physikum am 22.03.2000 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg und Sevilla (1 Jahr)
Praktisches Jahr in Barcelona, Spanien (Chirurgie); Sunderland, England (Innere Medizin); Heidelberg (Dermatologie)
Staatsexamen am 11.05.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. C. Haller

Lokal-metabolische und endotheliale Mechanismen interagieren bei der lokalen Durchblutungsregulation in vivo. Es wurde geprüft, ob und wie stark extrazelluläre Alkalose bzw. Hyperosmolalität die Freisetzung der endothelialen vasoaktiven Substanzen NO und Endothelin aus Endothelzellen in vitro beeinflussen. Da Alkalose in vivo eine Vasokonstriktion und Hyperosmolalität eine Vasodilatation induziert, wurde die Hypothese getestet, daß bei Alkalose das vasokonstriktorische Endothelin und bei Hyperosmolalität das vasodilatatorische NO zunimmt.

Als endotheliales Zellkulturmodell wurde die Zelllinie EA.hy 926 eingesetzt. Bei der Charakterisierung dieser Zelllinie konnte neben der Bestätigung bekannter Befunde als neues Charakteristikum eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber extrazellulärer Hyperosmolalität mit und ohne Alkalose gezeigt werden.

Zur Untersuchung der Freisetzung vasoaktiver Substanzen wurden EA.hy 926-Zellen durch Zugabe von Mannit (50 mM, 100 mM und 200 mM) oder NaHCO₃ (25 mM, 50 mM und 100 mM) extrazellulärer Hyperosmolalität bzw. Alkalose ausgesetzt. Nach sechs Stunden wurde die Konzentration von Endothelin und von cGMP, welches als Surrogatparameter für NO gilt, gemessen. Das Überleben der Zellen wurde über die LDH-Aktivitätsmessung im Zellkulturüberstand und die Bestimmung der Zellzahl überprüft. Außerdem wurde die Proliferationsaktivität der Zellen durch Einbau von BrdU bestimmt und die Zelldichte immunfluoreszenzmikroskopisch überprüft.

EA.hy 926-Zellen zeigten sich während dieser Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von sechs Stunden sehr widerstandsfähig gegenüber alkalischen bzw. hyperosmolalen Streß mit Werten im Kulturmedium von bis zu 519 mOsm/l bzw. einem pH von 8,14. Die Zellzahl blieb während der Inkubation gleich, die Zelldichte zeigte optisch keine auffälligen Unterschiede. Die LDH-Aktivität im Überstandsmedium nahm allerdings im Vergleich zur Kontrolle zu, wobei sie bei osmotischem bzw. alkalischen Streß viel geringer ausfiel als bei mechanischer Lyse der Zellen, was auf eine allenfalls leichte Störung der Membranintegrität hindeutet.

Der Einbau von BrdU war vor allem bei den beiden höchsten Konzentrationsstufen von Mannit bzw. NaHCO₃ vermindert, so daß eine geringe Abnahme der Zellproliferation vorlag. Hyperosmolalität und Alkalose hatten auf die cGMP-Konzentration keinen eindeutigen konzentrationsabhängigen Effekt. Nur die niedrigste Konzentrationsstufe von Mannit bewirkte eine signifikante Erhöhung der cGMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

Die Konzentration von Endothelin fiel verglichen mit der Kontrolle bei der höchsten Konzentrationsstufe sowohl von Mannit als auch von NaHCO₃ deutlich ab. Dieser Abfall war

bei beiden hyperosmolalen Medien in gleicher Weise ausgeprägt, so daß die Alkalose im Vergleich zur Hyperosmolalität keinen wesentlichen Einfluß auf die Endothelinfreisetzung zu haben scheint.

Die Hypothese, daß bei alkalischen Veränderungen des Zellmediums die Endothelinkonzentration und bei hyperosmolalen Veränderungen die NO- bzw. cGMP-Menge zunimmt, muß also verworfen werden.

Zusammenfassend zeigen die Befunde dieser Arbeit, daß sich die Zelllinie EA.hy 926 als Zellkulturmodell mit endothelialen Eigenschaften für Untersuchungen auto- und parakriner Durchblutungsmediatoren eignet.

Nach den *in vitro* Befunden der vorliegenden Arbeit scheint weder cGMP bzw. NO an einer Vasodilatation bei Hyperosmolalität noch Endothelin an einer Vasokonstriktion bei Alkalose *in vivo* direkt beteiligt zu sein. Allerdings könnte die deutliche Abnahme des Vasokonstriktors Endothelin zur Vasodilatation bei Hyperosmolalität beitragen.