

**Lang anhaltende Prozesse der retinalen Spreading Depression:
Untersuchung des intrinsischen optischen Signals**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen
Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biochem. Yuliya A. DAHLEM
geb. am 4. Oktober 1974 in Dnepropetrowsk

Gutachter: Prof. Dr. Stefan C. Müller

Prof. Dr. Katharina Braun

Prof. Dr. Wolfgang Hanke

Eingereicht am: 20. Dezember 2001

Verteidigung am: 16. Mai 2002

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema:

Lang anhaltende Prozesse der retinalen Spreading Depression: Untersuchung des intrinsischen optischen Signals

selbständig verfaßt, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen von mir vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, daß ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 18. Dezember 2001

Y. Dahlem

Inhaltsverzeichnis

Einführung in das Thema	1
1 Einleitung	2
1.1 Geschichte der SD Entdeckung	2
1.2 Theoretische Aspekte	3
1.2.1 Erregbare Wellen	3
1.2.2 Erregbares Medium	4
1.2.3 Das 'Reaction-Diffusion' System	5
1.3 Allgemeine Eigenschaften der SD-Welle	6
1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD	7
1.5 Metabolische Änderungen in der Zelle während der SD-Ausbreitung . .	8
1.6 Das Intrinsische Optische Signal und SD	11
1.6.1 Physikalische und molekular Grundlagen der optischen Methode	11
1.6.2 Netzhaut des Huhns	12
1.6.3 Retinale spreading Depression	13
2 Material und Methoden	18
2.1 Versuchstiere	18
2.2 Präparation	18
2.3 Lösungen und applizierte Substanzen	19
2.3.1 Ringer Lösung	19
2.3.2 Pharmakologische Substanzen	20
2.4 Messaufbau	22
2.5 Protokolle der Experimente	24
2.6 Auswertung der Daten	25

2.6.1	Fourier transform filtering Technik	26
2.6.2	Parameter der ersten Phase	26
2.6.3	Parameter der zweiten Phase	27
2.6.4	Normierung der Messdaten	29
2.7	Schwierigkeiten während der IOS Messungen	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Einfluss der Kaliumionen auf die zweite Phase des IOS	32
3.1.1	Beschreibung der Experimente	33
3.1.2	Effekt höherer und niedrigerer K^+ Konzentrationen	33
3.1.3	Mechanische Stimulation mit niedriger und hoher Frequenz . . .	37
3.1.4	IOS der SD-Wellen in Anwesenheit von niedrigen K^+ und höher- en Mg^{2+} Konzentrationen	38
3.2	Einfluss des Dexamethason auf das IOS	41
3.2.1	Erste Phase	42
3.2.2	Zweite Phase	42
3.3	Einfluss des Nitroprussid auf das IOS	45
3.3.1	Erste Phase	46
3.3.2	Zweite Phase	46
3.3.3	Kaliumcyanid als Kontrolle	47
3.4	Einfluss des Trinitroglycerin auf das IOS	50
3.4.1	Einfluss auf das gesamte IOS	50
4	Diskussion	53
4.1	SD und Zelltod	53
4.2	Änderungen der $[K^+]_R$ beeinflussen den zellulären Energiebedarf während der SD	54
4.2.1	Mit Erhöhung der $[K^+]_R$ verschwindet die zweite Phase des IOS	55
4.2.2	Offene Frage	57
4.3	Mögliche Energiequellen während und nach der SD-Ausbreitung	58
4.3.1	Energiestoffwechsel der Gliazellen und Neuronen	59

4.3.2	Substanzen, die den Stoffwechsel beeinflussen, verändern auch das IOS	59
4.4	Stickstoffmonoxid und Spreading Depression	62
4.4.1	Funktionen des NO im ZNS	62
4.4.2	Abhängigkeit des IOS von NO	62
	Zusammenfassung und Ausblick	65
	Literaturverzeichnis	72
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74
	A Teile der IDL Programme	75
	B IOS und Substanz Wirkungen über die Zeit	80
	C Statistik	91

Einführung in das Thema

Unter Spreading Depression (SD) versteht man eine transiente Zelldepolarisation mit zeitweisem Funktionsverlust, die sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mm/min über das neuronale Gewebe ausbreitet. Während dieser Zeit wird jegliche neuronale Aktivität unterdrückt. Nach einiger Zeit kommt das Gewebe wieder in den physiologischen Zustand zurück.

Die pathophysiologischen Prozesse bei der SD hängen eng mit zwei bedeutenden neurologischen Erkrankungen zusammen: der Migräne und dem Schlaganfall. Darüber hinaus hat das Phänomen nicht nur Neurologen und Physiologen fasziniert, sondern auch Biophysiker, die in der SD ein Musterbeispiel für Selbstorganisation im Nervengewebe sehen.

In der Netzhaut ausgelöst ist die SD mit einem intrinsischen optischen Signal (IOS) verbunden, das es erlaubt die raumzeitliche Dynamik des Phänomens optisch aufzuzeichnen. Diese Methode ist quasi nicht-invasiv (sieht man von der Präparation der Netzhaut als Ganzes einmal ab) und erlaubt eine räumliche Auflösung, die bisher mit keiner anderen physiologischen Messmethode zu erreichen ist.

Welche Prozesse spiegelt das IOS, das während der SD-Ausbreitung zwei Phasen hat, wieder? Die Struktur des späteren IOS und ihre Variationen unter standardisierten Bedingungen und unter der Einwirkung verschiedener pharmakologischer Modulatoren steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Im ersten Kapitel wird in die Thematik um das Phänomen Spreading Depression eingeführt. Kapitel 2 stellt die experimentellen Methoden vor und benennt die gebrauchten Materialien. Im Kapitel 3 werden die erzielten Ergebnisse vorgestellt und anschließend im Kapitel 4 werden diese Ergebnisse und ihre Bedeutung diskutiert. Das letzte Kapitel 5 fasst abschließend die wichtigsten Aussagen zusammen.

Kapitel 1

Einleitung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist sehr komplex, mit vielen parallel laufenden Prozessen, die für die Durchführung zahlreicher bekannter Funktionen im Körper notwendig sind. Zusätzlich gibt es auch Phänomene, bei denen nicht genau klar ist welchen Zweck sie erfüllen. Ein solches Phänomen, das als Welle durch die graue Substanz des ZNS läuft und Spreading Depression genannt wird, wurde in dieser Arbeit untersucht.

1.1 Geschichte der SD Entdeckung

Die Spreading Depression (SD) wurde vor mehr als fünfzig Jahren von Aristides Leão entdeckt, einem brasilianischen Wissenschaftler, der die epileptische Aktivität im Kortex des Kaninchens untersuchte. Während dieser Experimente wurde die sich langsam ausbreitende Reduktion der Amplitude des Elektroenzephalogrammes (EEG) auf der kortikalen Oberfläche gefunden [Leã44b] [Leã44a]. Es sah so aus, als ob simultan alle kortikalen Antworten auf elektrische oder physiologische Stimuli verschwinden würden [Gra56]. Leão hat gezeigt, dass SD ein reproduzierbares Phänomenen ist und sich unter bestimmten Bedingungen gut analysieren lässt. SD kann nicht nur mit elektrischen Impulsen erzeugt werden, sondern auch mit mechanischer Stimulation und lokaler Anwendung KCl Lösung [LM45]. Unabhängig von Leão ist die Existenz der SD schon drei Jahre vor der eigentlichen Entdeckung des Phänomens von dem Physiologen K.S. Laszley vorausgesagt worden. Selbst unter Migräne-Attacken leidend, hat er längere Zeit die Migräne-Aura untersucht, um zu verstehen welche Prozesse ein denkbarer Grund

dafür sein könnten. Sein Vorschlag war eine Welle, die sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mm/min über den Kortex ausbreitet [Las41].

Im Säugetier kann die SD mit verschiedenen Stimuli ausgelöst werden. Deshalb ist es möglich, dass dieses Phänomen von anderen Forscher schon mehrere Male beobachtet wurde, aber als ein Artefakt aufgrund von Gewebe- oder Zellschäden gewertet wurde. Leão hat als Erster die (patho)physiologische Relevanz der SD-Welle erkannt und begonnen sie systematisch zu analysieren.

1.2 Theoretische Aspekte

Die Spreading Depression gehört zu der Gruppe von selbst-organisierten erregbaren Wellen¹, die in einem erregbaren Medium propagieren. Diese erregbaren Wellen können u.a. in chemischen Systemen (z.B. BZ-Reaktion [ZZ70], Oxidation von Kohlenstoffmonoxid auf PT(110) Oberfläche [Ert91]) beobachtet werden. Auch biologische Systeme haben die Möglichkeit, Wellen zu generieren (z.B. Ca^{2+} -Wellen in Oocyten oder in Neuronen, NADH- und Protonen Wellen in *Dictyostelium discoideum* [MM00]).

Die Organisation und die Ausbreitung solcher Wellen folgen bestimmten Prinzipien, die in diesem Teil genauer betrachtet werden.

1.2.1 Erregbare Wellen

Die erregbare Welle hat vier Phasen: Ruhe, Erregung, absolute² und relative³ refraktäre Periode. Die Existenz der refraktären Periode ist eine der Haupteigenschaften der erregbaren Wellen, weil während diese Zeit eine Erholung des Systems stattfindet. Elektromagnetische und akustische Wellen unterscheiden sich von erregbaren Wellen durch die Anwesenheit der Interferenz. Wenn zwei erregbare Wellen aufeinander treffen, ist die weitere Ausbreitung nicht mehr möglich, weil sich die Erregungsfronten zwischen zwei absolut refraktären Zonen befinden.

¹Wellen sind räumlich und zeitlich periodische Bewegungen, bei denen Energie und Impuls, aber keine Masse von einem Ort zu einem anderen übertragen wird [Tip94].

²Es ist nicht möglich eine Welle auszulösen.

³Um eine Welle auszulösen, braucht man einen stärkeren Stimulus.

1.2.2 Erregbares Medium

Eine erregbare Welle breitet sich in einem erregbaren Medium aus - ein System, das bestimmte Eigenschaften hat. So ein System muss:

- - **offen sein.** In einem offenen System finden Energie und Materie Zu- und Abnahme statt. Der stationäre Zustand eines solchen Systems hängt nicht von den Anfangsbedingungen, sondern von den individuellen Systemparametern ab. Diese Systeme können ein homöostatisches (selbstregulatives) Verhalten zeigen, d.h. sie streben nach einer Störung in den ursprünglich eingenommenen stabilen Zustand zurück [BG94].

- - **nicht-linear sein.** Die Eigenschaften so eines Systems sind:

- *Der Output ist nicht direkt proportional zum Input.*
- *Solche Systeme folgen nicht der Summationsregel.* Das bedeutet, dass die Summe des Inputs A und B nicht dem Ergebnis entspricht, das man erhält, wenn jeder von diesen Inputs individuell eingegeben und dann die Ergebnisse summiert werden.

$$\text{INPUT}(A) \implies \text{Result}_1$$

$$\text{INPUT}(B) \implies \text{Result}_2$$

$$\text{INPUT}(A)+\text{INPUT}(B) \neq \text{Result}_1+\text{Result}_2$$

Z.B. kann ein Neuron oder eine Glia Zelle keine SD-Welle generieren, aber die Wechselwirkungen von mehreren Zellen kreieren ein erregbares Medium in dem sich SD-Wellen ausbreiten können.

- *Solche Systeme haben mehrere stationäre Zustände.*

- - **fernab von thermodynamischem Gleichgewicht arbeiten.** Der Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts herrscht in einem System, in dem keine makroskopischen Prozesse mehr ablaufen, oder mit anderen Worten, in dem chemische, elektrische oder Temperaturgradienten ausgeglichen sind [BG94]. Thermodynamisches Gleichgewicht bedeutet für die Zelle den Tod. Zwischen Zuständen im thermodynamischen Gleichgewichts sind (idealisierte) reversible Änderun-

gen möglich, die sich so langsam (im strengen Sinn unendlich langsam) vollziehen, dass das System immer im Gleichgewicht bleibt, aber alle realen, natürlichen Prozesse sind zeitliche irreversible Prozesse, die mit einer Zunahme der Entropie⁴ verbunden sind.

- - **positiv rückgekoppelt sein.**

Es gibt nicht lineare Systeme mit höchst interessanten Eigenschaften. Diese sind in einem positiven Rückwirkungsprozess zu autokatalytischen Verhalten fähig, d. h. die Endprodukte dieser Prozesse sind in der Lage, ihre eigene Produktion zu katalysieren. Zyklisches Verhalten mit selbstregulativem Charakter wird durch nichtlineare negativ rückkoppelnde Systemeigenschaften erzeugt (Abb. 1.1). Tre-

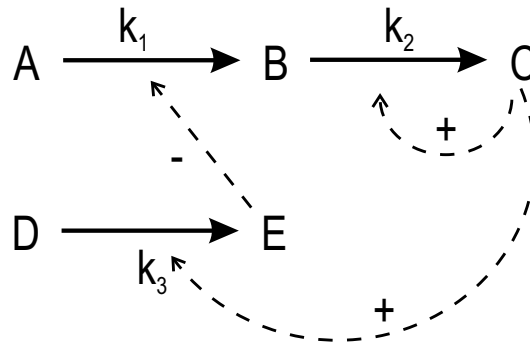


Abbildung 1.1: Positiver und negativer Rückwirkungsprozess [BG94].

ten autokatalytische, d. h. positiv rückkoppelnde Prozesse auf, so kann die Fähigkeit zur Selbstregulation verschwinden und von Anfangsbedingungen abhängige Periodizitäten erzeugt werden [BG94].

1.2.3 Das 'Reaction-Diffusion' System

Die Reaktionen aus Abb. 1.1 kann man für die Erklärung des Mechanismus des 'reaction-diffusion' Systems (zu denen auch die SD-Welle gehört) benutzen. Solche Reaktionen sind eine Kopplung zwischen autokatalytischen Reaktionen und Diffusion.

⁴Entropie ist eine Zustandsfunktion, welche während der Annäherung des abgeschlossenen Systems an den Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts in monotoner Weise zunimmt [BG94], oder ein Maß für die Irreversibilität der in ihnen ablaufenden Prozesse [mey83].

Zunächst ist das System in einem 'steady-state' Zustand, in dem die Aktivatorkonzentration (Substanz C) unter der Schwelle ist [MM00], dann treten Perturbationen auf und lösen die autokatalytische Reaktion auf, wobei das Endprodukt C ein Aktivator für seine eigene Synthese ist. Der nächste Schritt ist die Diffusion der Substanz C in die umliegende Fläche⁵, wo genau die gleiche Kette von Ereignissen abläuft. Als Konsequenz propagiert eine kreisförmige Wellenfront der chemischen Aktivität durch das System [PMZ98]. Die Substanz C aktiviert auch die Reaktion, in der der Inhibitor für die autokatalytische Prozesse synthetisiert wird (Substanz E). Diese Reaktion ist für die refraktäre Periode nach der Wellenausbreitung verantwortlich [MM00].

Genau diesen Punkt betrifft die Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Ziel ist es zu klären, welche biochemischen Reaktionen während der refraktären Phase (absolute und relative) nach der SD-Ausbreitung ablaufen.

1.3 Allgemeine Eigenschaften der SD-Welle

SD-Wellen können durch mechanische, elektrische, chemische und thermische Stimuli erzeugt werden. Zwischen den Bereichen des ZNS reduziert sich die Anfälligkeit für SD in folgender Reihenfolge: Hippokampus (besonderes CA 1 Region), Neokortex, subkortikale Nuclei, graue Substanz des Hirnstamms, Zerebellum [BBK84] und Rückenmark [CS90]. SD propagiert mit einer Geschwindigkeit von 1.5-7.5 mm/min durch die graue Substanz und stoppt an der Grenze zur weißen Substanz. SD propagierte auch, wenn Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin (TTX) blockiert wurden [STN75]. Je höher ein Tier in der phylogenetischen Scala ist, desto komplexer ist der Kortex und desto schwieriger wird es SD zu erzeugen. So wurde z.B. in Experimenten mit Kaninchen und Ratten beobachtet, dass SD dort leichter zu stimulieren war als in Experimenten mit Katzen und Affen [MG94]. Eine der Erklärungen ist, dass in diesem Fall die Menge der myelinisierten Fasern erhöht und die Dichte der neuronalen Membranen reduziert ist, weshalb der SD Prozess blockiert werden kann [BBK69].

⁵Im 3D Fall in den umliegenden Raum

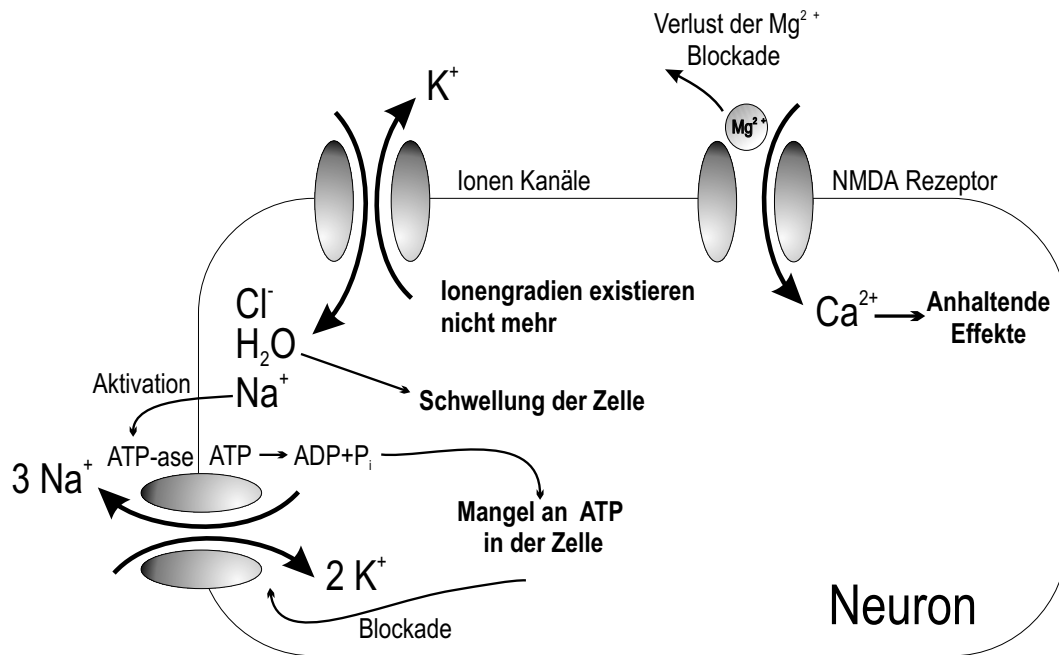


Abbildung 1.2: Ionenbewegung während der SD-Ausbreitung.

1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD

Während der SD-Ausbreitung sind Neuronen und Gliazellen teilweise depolarisiert. Am Anfang der Depolarisation sind sie aber noch aktiv und Aktionspotentiale sind registrierbar. Eine begleitende Umverteilung der Ionen zwischen extra- und intrazellulärem Raum wurde beobachtet. K^+ fließt aus, während Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Wasser in die Zellen strömen. Das Ergebnis ist eine Zellschwellung (Abb. 1.2).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der SD wurden seit der Entdeckung gut untersucht. Das elektrische Signal der SD hat nur eine Phase und ist am größten im Bereich der 'inneren plexiformen Schicht' (Abb. 1.7).

Am Anfang ändert sich das extrazelluläre Potential langsam und die maximale Depolarisation kommt erst nach 0.5-4 s zustande. Nach 1-2 Minuten werden die Zellen repolarisiert und dann auch einige Minuten hyperpolarisiert. Die Amplitude des Signals ist 15-35 mV, das ist viel größer als die Amplitude anderer extrazellulärer elektrischer Signale, die sehr selten mehr als 1 mV groß sind (Abb. 1.3).

Solche Potentialdifferenzen werden nur bei gleichzeitiger Depolarisation mehrerer (wenn nicht aller) Zellen um die Elektrode generiert.

In dieser Zeit sind die Neuronen nicht mehr erregbar. Das intrazelluläre Potential

ändert sich in entgegengesetzter Richtung zum extrazellulären. Es wurde auch gezeigt, dass solche Depolarisationen nicht nur in Neuronen statt finden. Änderungen des Membranpotentials der Gliazellen [STN75], [HMW74], [CH66] fallen mit dem extrazellulären SD Signal zusammen (Abb. 1.4).

1.5 Metabolische Änderungen in der Zelle während der SD-Ausbreitung

Was kann das Auftreten von SD *in vivo* stimulieren? Bis heute gibt es zwei Haupttheorien, die beide sagen, dass sich eine SD-Welle ausbreiten wird, wenn depolarisierende Substanzen aus Neuronen oder Glia Zellen in den extrazellulär Raum freigesetzt werden. Die zwei Kandidaten sind K^+ [Gra56] und Glutamat (Glu) [Har78].

Normalerweise ist die K^+ Konzentration im extrazellulären Raum 3-4 mM und in den Zellen ungefähr 140 mM. Nach starker Erregung oder unter Bedingungen, bei denen K^+ nicht schnell genug aus dem extrazellulär Raum transportiert werden kann, führt die Akkumulation von K^+ zur einer globalen Depolarisation, was für die Nachbarneuronen gefährlich ist. Dies erhöht die Permeabilität der Membranen und aktiviert ein ganze Folge von Ereignissen, die in Abbildung 1.2 zu sehen sind.

Eine andere Möglichkeit ist die Akkumulation von Glu im extrazellulären Raum während der SD-Ausbreitung. Glu wird aus den prae-synaptischen Vesikeln freigesetzt und von Glu-Transportern zurück in die Zellen (Neuron oder Glia) gepumpt (Abb. 1.5).

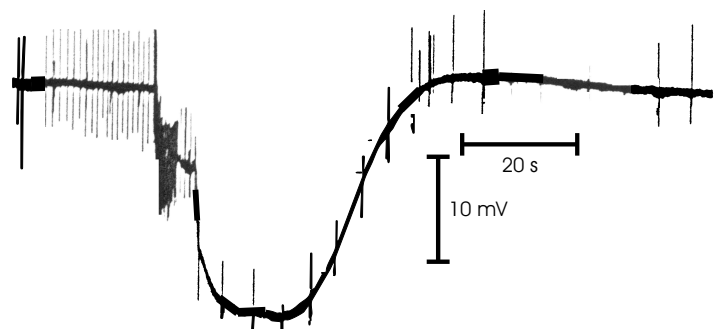


Abbildung 1.3: Extrazelluläre Ableitung während einer SD-Ausbreitung in der CA1 Region vom Hippocampus [SAC⁺91].

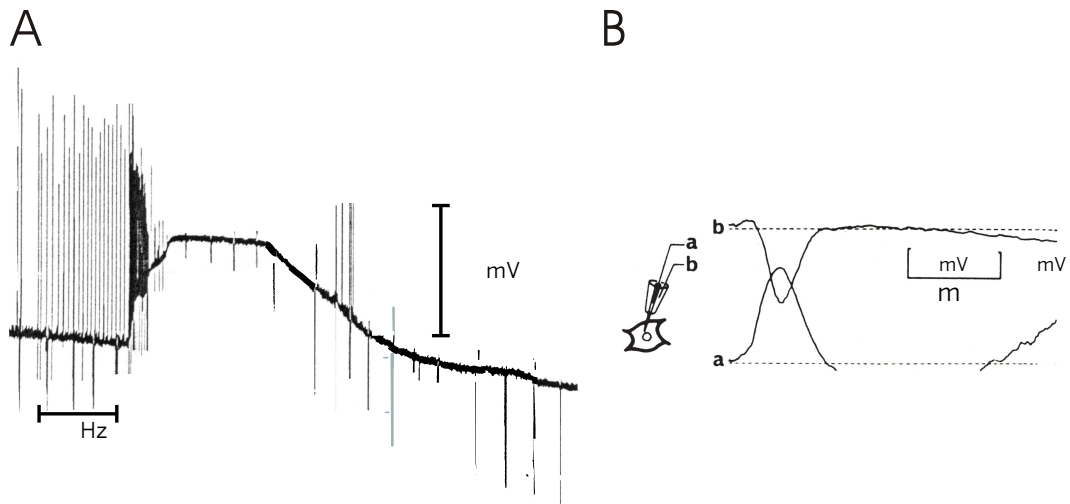


Abbildung 1.4: Intrazelluläre Ableitung während einer SD-Ausbreitung. **A.** Stimulation von Neuronen mit niedriger Frequenz (1 Hz) in der CA 1 Region vom Hippocampus [SAC⁺91]. **B.** Ableitung der intra-(a) und extrazellulären (b) Glia Potentiale während einer SD [STN75].

Durch die globale Depolarisation, die in den Zellen während der SD-Ausbreitung statt findet, werden die Na^+ und K^+ Gradienten reduziert und als Folge werden die Transportrate der Glu-Transporter der Neuronen und Glia Zellen kleiner. Glu wird zwischen den Synapsen akkumuliert und stört die Informationsverarbeitung im ZNS . Manche Autoren gehen sogar weiter und sagen, dass diese Glu-Transporter umgekehrt Glu aus der Zelle pumpen [ROA00].

Seit der SD Entdeckung stellen sich Wissenschaftler die Frage: Welche Faktoren bestimmen die Dauer der SD und existieren anhaltende Effekte nach der Wellenausbreitung? Wie man sieht, dauern die drastischen elektrophysiologischen Änderungen nur ein paar Minuten. Was passiert danach? Welche biochemischen Reaktionen können die SD-Welle aktivieren oder inhibieren?

Das Gehirn verbraucht während der SD-Ausbreitung etwa 10% der Blutglucose und etwa 50% des Blutsauerstoffs [UL88]. Es wurde gezeigt, dass die intramitochondriale Oxydation erhöht wird [RS73] und als Folge beträchtliche Mengen Lactat (Anstieg um 200% [GLLL94]) produziert werden [BBK74]. Die Konzentration energiereicher intrazellulärer und extrazellulärer Substrate verringert sich deutlich: ATP sinkt auf 62%, Phosphocreatin auf 24%, die interstitielle Glucosekonzentration auf etwa 50% [CPM85]. Es wird auch ein gleichzeitiger, auf 200-300% gesteigener Glucoseverbrauch

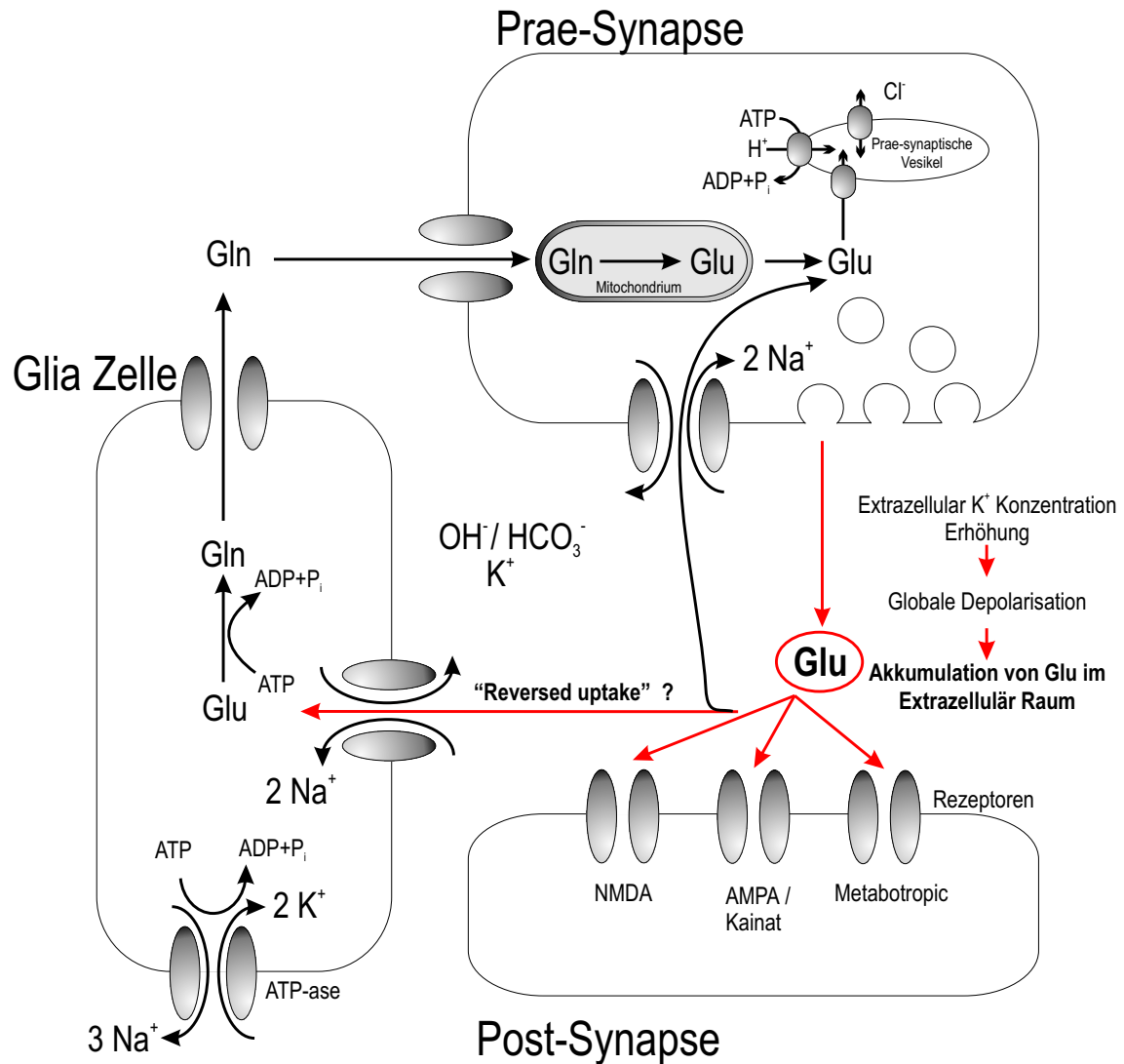


Abbildung 1.5: Bewegung von Glu zwischen Neuronen, Glia Zellen und extrazellulär Raum unter normalen Bedingungen und während der SD-Ausbreitung.

gemessen [HQ81], [NA86]. Es wurde ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um etwa 50% gezeigt [MW91].

Neuronales Cytoplasma und interstitielle Flüssigkeit sind deutlich sauer und das Cytoplasma der Gliazellen wird alkalisch [CK89]. Eine Vielfalt von Neurotransmittern (Glutamat [Gra56], Stickoxid [GKH92] und calcitonin gen-related peptide (CGRP) [WSPKes]) wird freigesetzt. Auch die Konzentration des *c-fos*, des nerve growth factor und des glial-derived fibrillary acidic protein (GFAP) ist erhöht.

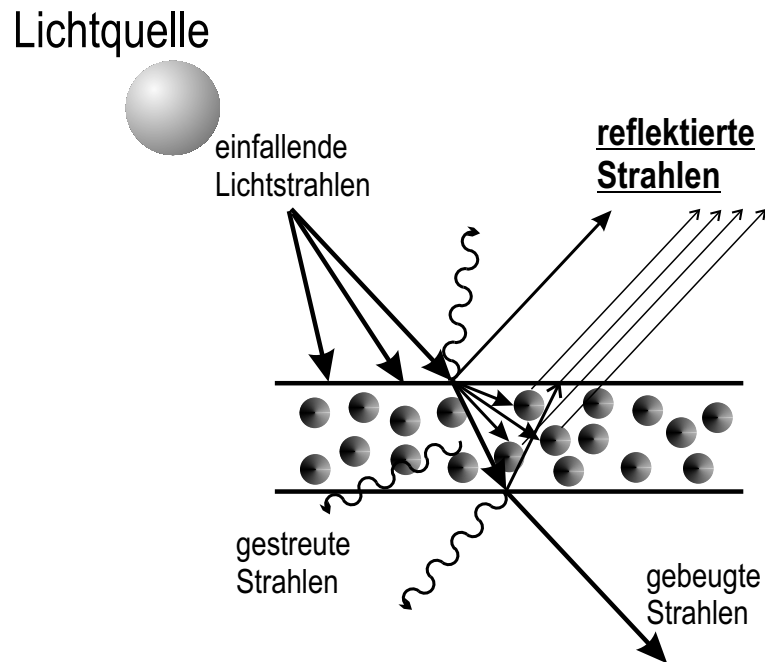


Abbildung 1.6: Physikalische Prinzipien der optischen Methode.

1.6 Das Intrinsische Optische Signal und SD

1.6.1 Physikalische und molekular Grundlagen der optischen Methode

Der experimentelle Teil dieser Arbeit beruht auf Messungen des intrinsischen optischen Signals. Deshalb werden die möglichen physikalischen und molekularen Mechanismen, die dafür verantwortlich sein können, in diesem Kapitel genauer beschrieben.

Das Licht aus der Lichtquelle fällt auf das Gewebe (Abb. 1.6). Dabei durchdringt ein Teil der Lichtstrahlen das Gewebe und wird *gebeugt*, ein anderer Teil wird *absorbiert*⁶, und ein weiterer Teil *gestreut*. Bei der Streuung werden die Lichtstrahlen in alle möglichen Richtungen *reflektiert*. Streuung beeinflusst die Reflektion und die Beugung in entgegengesetzte Richtungen. Je mehr das Medium streut, desto mehr Lichtstrahlen werden reflektiert und desto weniger gebeugt [AFST99].

Das intrinsische optische Signal (IOS) zeigt die Änderungen der reflektierten Lichtstrahlen, so dass kein exogenes Kontrastmittel benutzt werden muss [VC97]. Solch

⁶Das bedeutet, dass die Lichtstrahlen in eine andere Energieform umgewandelt werden. Normalerweise, ist es Fluoreszenz oder Wärme.

eine optische Registrierung ist in der Biologie eine nicht invasive und sehr wertvolle Methode, die abhängig von der Erregung des Gewebes ist. Sie kann *in vivo* und *in vitro* verwendet werden, um räumlich-zeitliche Änderungen im intakten Gewebe zu visualisieren.

Es gibt drei Hauptquellen, die das IOS beeinflussen können:

- Änderungen im Blutfluß und im Sauerstofftransport [GFLH88].
- Änderungen in Absorption oder Fluoreszenz der intrinsischen Chromophoren (Hämoglobin [Job77], Cytochrom [MSPR87] oder NADH [CW55]).
- Osmotische Änderungen im Volumen der Zellen (Schwellung oder Schrumpfung) [AFST99], Änderungen an Membranen während der Ausbreitung des Aktionspotentials [SLRB⁺91] und die morphologischen Änderungen während der Neurosekretion [SOB93].

Abhängig von den biochemischen Mechanismen, die in der Zelle ablaufen, können die optischen Signale nur Millisekunden (während Prozesse, die mit den Änderungen des Brechungsindex der Membrane verbunden sind) oder Sekunden bis Minuten (Änderungen des Zellvolumens, die den Brechungsindex des Zytoplasmas und die Streuung durch Makromoleküle und Organellen beeinflussen) dauern.

1.6.2 Netzhaut des Huhns

Wichtige Experimente mit der Netzhaut (Retina⁷) des Huhns wurden von Martins-Ferreira und Olivera de Castro [MFdC66] gemacht. Die Netzhaut ist ein Teil des Nervensystems und bietet mehrere Vorteile:

- aufgrund der inversen Lage der Lichtsinneszellen ist sie *hoch transparent*.
- *sie ist avaskulär*. Ein spezialisiertes Organ, das Pecten, das *in vivo* in den Glaskörper hineinragt, sorgt für den Austausch von Sauerstoff und Stoffwechselprodukten, die innerhalb der Retina nur durch Diffusion verteilt werden. Das erlaubt

⁷'Retina' ist ein Fachbegriff des Wortes 'Netzhaut' und wird auch in dieser Arbeit wie ein Synonym benutzt.

eine relativ einfache Versorgung der Retina *in vitro*. Deshalb können vaskuläre Effekte von vornherein ausgeschlossen werden.

- lässt sich *schnell und leicht präparieren*.
- Während der SD-Ausbreitung verändert sich das IOS stark, so dass es sogar mit bloßem Auge als milchige Wellenfront beobachtet werden kann [WH97].

Die Retina (Abb. 1.7) besteht aus sechs verschiedenen Neuronentypen (Ganglienzellen, Bipolarzellen, Sebstäbchen und -zapfen, Amakrinzellen und Horizontalzellen) und Müller Gliazellen. Auf der inneren Seite der Retina haben die Gliazellen Erweiterungen, die Endfüsse, die eine Basallamina, die 'inner limiting membrane (ILM)' bilden. Auf der Außenseite bilden die Müller Zellen Mikrovilli, die die Außensegmente der Rezeptoren umgeben. Eine sehr wichtige Eigenschaft der Retina ist, dass nur die Ganglienzellen Aktionspotentiale generieren können.

1.6.3 Retinale spreading Depression

Für die SD Erforschung wurden hauptsächlich der Kortex *in vivo* und der Hippocampus *in vitro* verwendet [SAC⁺91]. Seit mehr als 30 Jahren dient aber auch die Retina als Modell für solche Untersuchungen. Es wurde gezeigt, dass die SD in der Netzhaut im wesentlichen ähnliche Eigenschaften wie die kortikale SD hat: reversible negative langsame Potentialänderung mit einer ähnlichen Amplitude und Dauer, reversible Erhöhung der elektrischen Impedanz, die Existenz der refraktären Periode, die Abhängigkeit von K^+ und Mg^{2+} Konzentrationen im extrazellulär Raum und die Volumenänderungen während der Reaktion [MFdC66].

Um die Photorezeptoren zu erreichen müssen die Lichtstrahlen erst durch alle Zellschichten der Netzhaut. Deshalb ist die Retina in physiologischem Zustand völlig durchsichtig. SD breitet sich hier wie eine weiße Wellenfront auf dunklem Hintergrund⁸ aus. Die SD kann als kreisförmige Front propagieren, oder sogar eine Spirale bilden (Abb. 1.8). Unter normalen Bedingungen (siehe Methoden) hat das IOS der SD zwei Phasen: die erste hat eine größere Amplitude und dauert ca. 1 Minute, die zweite

⁸Diese Farbe bestimmt die Schichten der Pigmentepithelzellen, die sich unter den Photorezeptoren befinden.

hat eine etwas kleinere Amplitude, aber dafür dauert sie ungefähr 15 bis 25 Minuten (Abb. 1.9). Die erste Phase, die man mit einer Zellschwellung verbindet, hat auch ein elektrophysiologisches Signal (siehe Kapitel 1.4), während die zweite Phase mit elektrophysiologischen Methoden nicht messbar ist, daher gibt es bei den elektrophysiologischen Experimenten *in vivo* im Kortex oder Hippocampus keine Möglichkeit, die zweite Phase der SD zu untersuchen. Auch *in vitro*, z.B. am Hippocampus Modell, ist es nicht leicht diese Phase zu beobachten. In diesem Fall bräuchte man Farbstoffe, aber es ist nicht klar, welche Substanzen und Reaktionen während dieser Zeit eine wichtige Rolle spielen könnten. Die Retina ist bis heute das beste Modell, um die zweite Phase der SD zu untersuchen .

Welche Prozesse in dieser Zeit reflektiert werden ist nicht klar. Alle Ionengradienten sind bis zu Beginn der zweiten Phase wieder hergestellt, aber die Zellen müssen an einem Mangel an Energie leiden, weil sie viel davon für die ATPase Aktivität während der ersten Phase verbraucht haben. Die absolute gemessene refraktäre Periode dauert bei SD-Wellen ca. 2.5 Minuten. Das bedeutet, dass möglicherweise ein Teil von dieser Zeit zum Anfang der zweiten Phase gehört.

SD wird mit pathologischen Prozessen wie Zelltod während und nach einem Schlaganfall, Migräne-aura, Epilepsie und transienter globale Amnesie verbunden [dLH99].

Kann die SD-Welle den Tod der Zellen verursachen? Welchen Zweck könnte die SD unter normalen physiologischen Bedingungen erfüllen? Obwohl nach der SD-Ausbreitung keine Ionengradienten mehr existieren, schafft es das Gewebe zurück in den normalen Zustand zu kommen. Welche biochemische Prozesse führen dazu? Werden sie durch die zweite Phase des IOS reflektiert?

Zusammenfassung: SD ist eine Antwort des Gewebes, das in einem normalen oder pathologischen Zustand ist, auf einen pathologischen Impuls. Die zweite, nur mit optischen Methoden registrierbare Phase, sollte eine wichtige Rolle bei der Erholung des Gewebes nach der SD-Ausbreitung spielen. Die Prozesse, die in diese Zeit in der Zelle stattfinden, werden in dieser Arbeit untersucht.

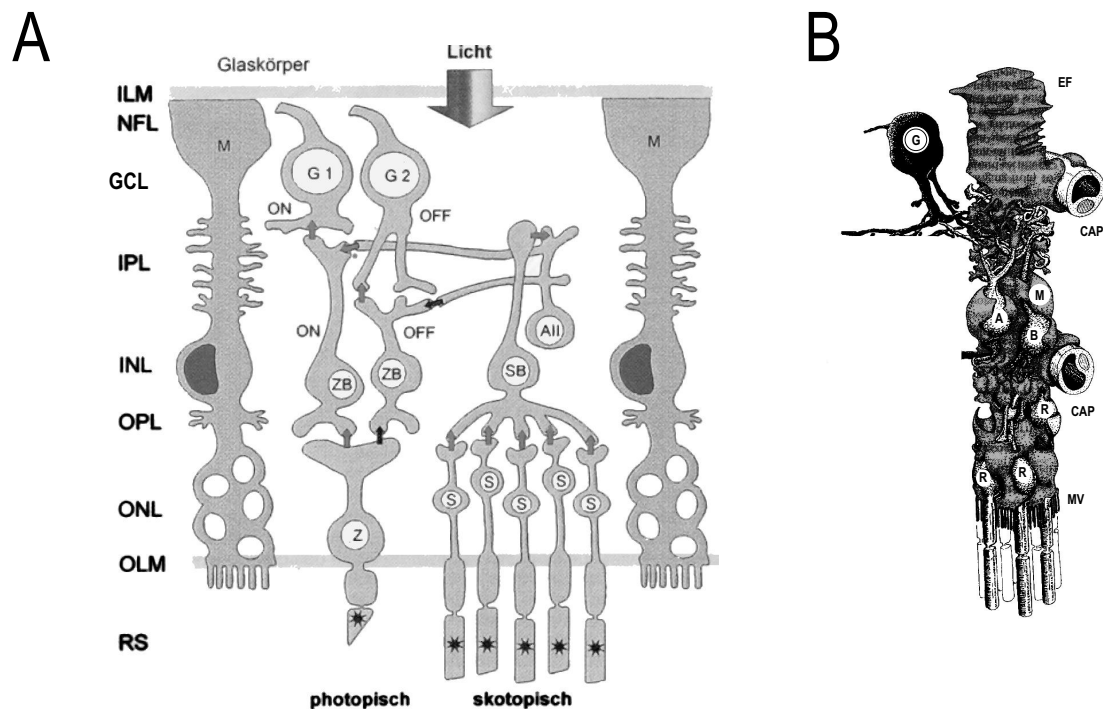
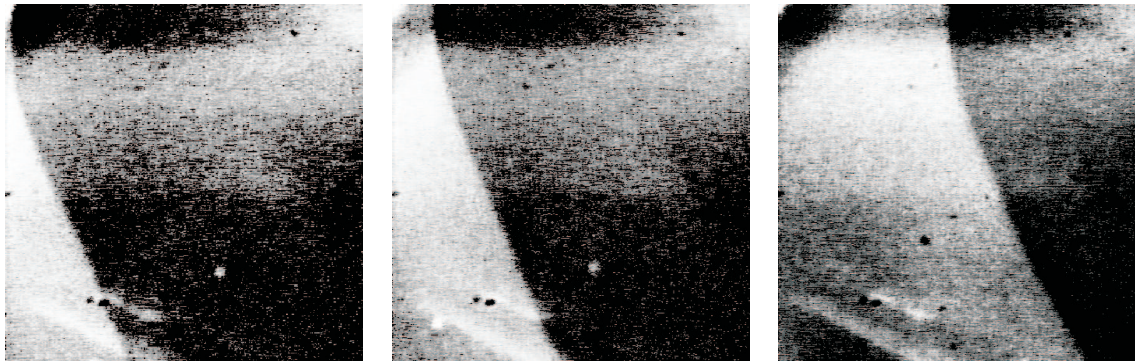


Abbildung 1.7: A - Schema der Säugetiernetzhaut. Licht gelangt durch die lichtbrechenden Medien des Auges auf die innere limitierende Membran (**ILM**) der Retina und muss alle Schichten derselben durchdringen, bevor es in den äußeren Segmenten (*) der Zapfen (**Z**) und Stäbchen (**S**) von den Photopigmenten absorbiert und in ein bioelektrisches Signal umgewandelt wird. In der Fovea von Menschen und Affen gehören zu jedem Zapfen zwei bipolare Zellen (**ZB**), von denen eine das Licht-an ('ON') Signal auf eine spezifische 'ON'-Ganglienzelle (**G1**), die andere das Licht-aus ('OFF') Signal auf eine 'OFF'-Ganglienzelle (**G2**) überträgt. Die geringen Lichtintensitäten beim Dämmerungssehen können nur von den Stäbchen detektiert werden. Die Signale vieler Stäbchen werden jeweils von einer Stäbchen bipolar Zelle (**SB**) gesammelt und von mehreren solche Zellen auf eine All-Amakrinzelle übertragen. Diese schaltet dann die Stäbchen Signale auf die beiden photopischen Übertragungskanäle (ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen) auf. **M** - Müller Zellen, **NFL** - Nervenfaserschicht, **GCL** - Ganglienzellschicht, **IPL** - innere plexiforme Schicht, **INL** - innere Körnerschicht, **ONL** - äußere Körnerschicht, **OLM** - äußere 'Grenzmembran', **RS** - Schicht der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren. B - Radial angeordnete Säule von Netzhautzellen. **R** - Photorezeptoren, **B** - Bipolarzelle, **A** - Amakrinzelle, **G** - Ganglienzelle, **M** - Müllerzelle, **CAP** - Kapillaren, **EF** - Endfüße der Müllerzelle, **MV** - Mikrovilli. Verändert nach [Rei99].

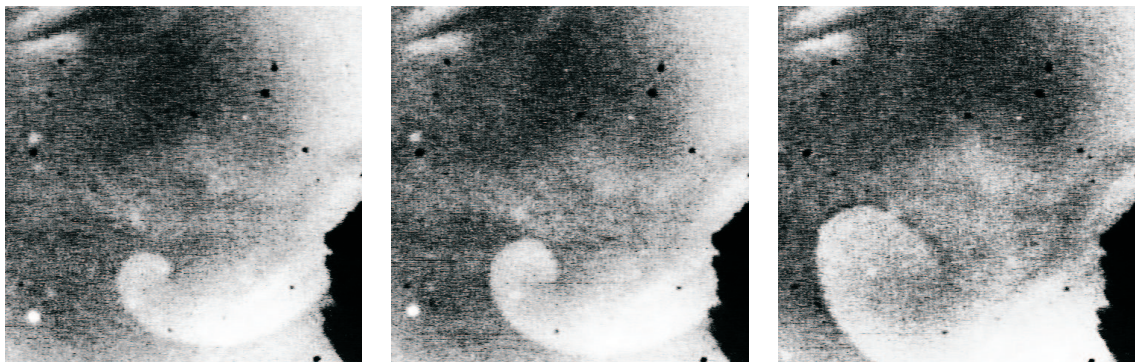


Spontane SD Welle, die vom Rand kommt

0 s

10 s

30 s

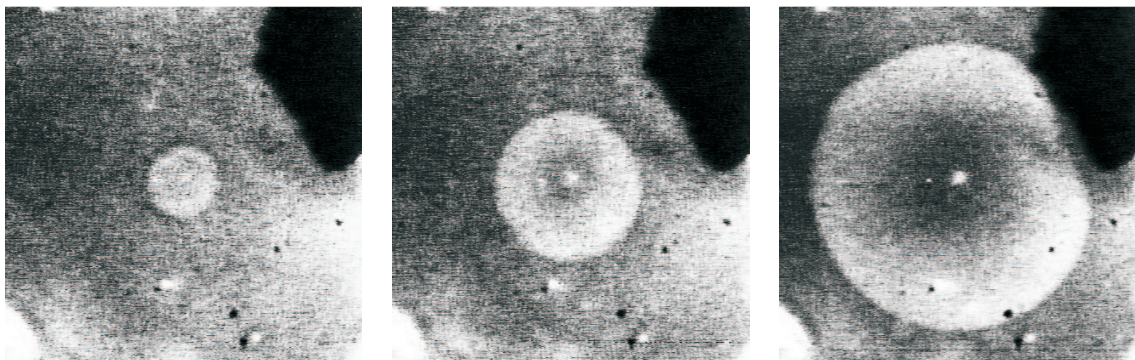


Spontane spiralförmige SD Welle

0 s

7 s

29 s



Mechanisch ausgelöste SD Welle

0 s

10 s

30 s

Abbildung 1.8: Die drei Videosequenzen zeigen das intrinsische optische Signal der drei SD Wellen, das man mit bloßem Auge beobachten kann zu verschiedenen Zeitpunkten. Man sieht nur die erste Phase des IOS, mit bloßem Auge ist die zweite Phase nicht erkennbar. Die Fläche eines jeden Bildes ist ungefähr 4 mm^2 .

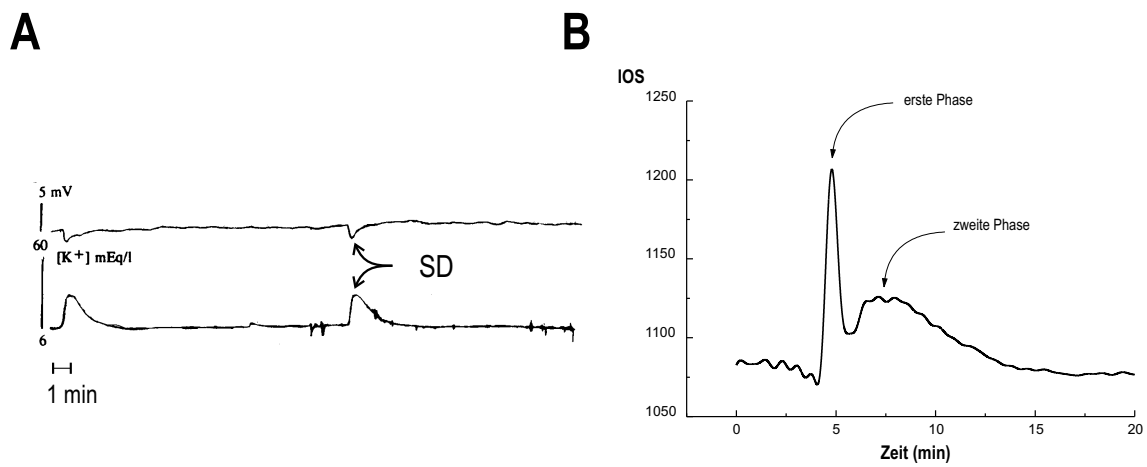


Abbildung 1.9: Elektrisches und optisches Signal während der SD-Ausbreitung. **A** zeigt das elektrische Signal während einer spontanen SD-Wellen Ausbreitung. Die Spur oben stellt die Änderungen des extrazellulären Potentials dar. Die untere Spur zeigt die extrazelluläre K^+ Aktivität [dLST⁺93]. **B** zeigt das optische Signal der retinalen SD Welle. Die erste und zweite Phase des Signals sind deutlich zu sehen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche dieser Arbeit wurden die Retinae von Haushühnern (Zuchtlinie Ross, Cobb und Senae) beiderlei Geschlechts im Alter von 6 bis 28 Tagen vom Institut für Neurobiologie (IFN) in Magdeburg und von der Hühnerbrüterei Looser GmbH in Dürnau verwendet. Die Küken wurden vom Tag des Schlupfes bis zum Versuchstag in der institutseigenen Tierhaltung in Magdeburg oder in Stuttgart gehalten.

2.2 Präparation

Die Tiere wurden dekapitiert und die ganzen Augen aus der Augenhöhle herauspräpariert. Dabei wurden mit einer an der Spitze abgerundeten Schere erst die Augenmuskulatur und dann der *Nervous opticus* durchtrennt. Das entnommene Auge wurde von anhaftendem Muskel- und Fettgewebe befreit, danach in vertikaler Lage mit leichtem Druck zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten und mit einem glatten Schnitt einer Skalpellklinge äquatorial in zwei Hälften geteilt. Der hintere Teil, der sogenannte *eye-cup*, wurde nach dem Entfernen des Glaskörpers mit einer Pinzette in vortemperiertem Ringer (28-30°C) überführt.

Die am hinteren Augenbecher anhaftende Retina ist in vitalem Zustand transparent. Daher erscheint der ganze eye-cup durch die darunterliegende Pigmentschicht schwarz. Eine Verschlechterung des physiologischen Zustandes der Retina ist leicht an einer

Trübung zu erkennen. Der eye-cup wurde dann mit handelsüblichem Kleber (Pattex, Sekundenkleber oder Roti-Coll 1, Carl Roth GmbH+Co) in einer Kunststoffpetrischale (Nuclon, 5 ml) fixiert. Diese wurde dann mit ebenfalls vortemperiertem Ringer sehr vorsichtig aufgefüllt, um ein Ablösen der Retina von der Pigmentschicht zu vermeiden. Diese Präparation ist für 6 bis 12 Stunden vital und wurde für alle in der Arbeit beschriebenen Versuche verwendet [HGWdL96].

2.3 Lösungen und applizierte Substanzen

2.3.1 Ringer Lösung

In allen Versuchen wurde die Retina mit einer modifizierten Standardringerlösung nach H. Martins-Ferreira perfundiert (Tab. 2.1). Alle verwendeten Substanzen besaßen den Reinheitsgrad p.a. und wurden von den Firmen *Merk*, *Fluka* oder *Sigma* bezogen.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Ringer Lösung.

<i>Substanz</i>	NaCl	KCl	MgSO ₄	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaH ₂ CO ₃	Glucose
<i>Konzentration, mM</i>	100	6	1	1	1	30	30

pH-Wert Einstellung

Experimente zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Ionen auf das IOS

Für diese Experimente (siehe Kap. 3.1) wurde der pH-Wert von 7.4 durch kontinuierliche Begasung der Ringer Lösung mit einem Carbogen (95 %O₂/ 5%CO₂) Gasgemisch konstant gehalten.

Pharmakologische Experimente

Während der Experimente mit pharmakologischen Substanzen wurde die Ringer Lösung mit 10 mM TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) gepuffert. Alle Substanzen außer

CaCl_2 wurden in Aqua bidest gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7.5 eingestellt, dann CaCl_2 zugegeben und die Lösung anschließend auf pH 7.4 eingestellt.

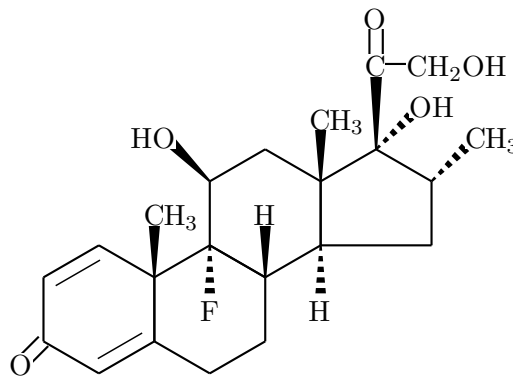
2.3.2 Pharmakologische Substanzen

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit wurden folgende Substanzen benutzt:

- **Dexamethason** (*9 α -Fluoro-16 α -methyl-prednisolon*)

Firma : Sigma

Chemische Formel: $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FO}_5$ mit *2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, wasserlöslich, $M_r=392.5$



Dexamethason

- **Dexamethason-21-phosphat Dinatriumsalz**

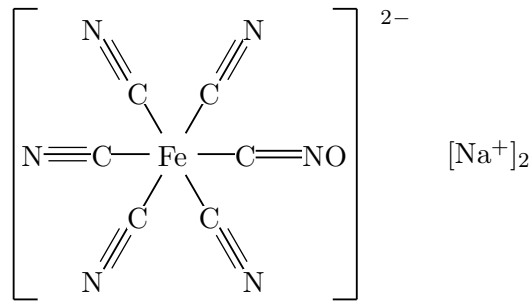
Firma : Fluka

Chemische Formel: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{FNa}_2\text{O}_8\text{P}$, wasserlöslich, $M_r=516.40$

- **Nitroprussid-Natrium-Dihydrat** (*Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)*)

Firma : Sigma

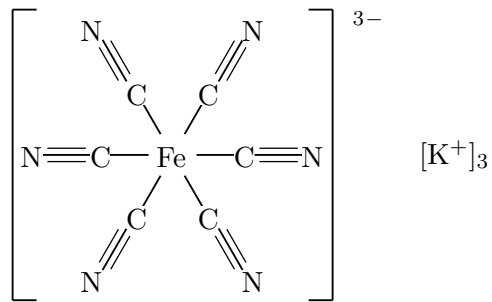
Chemische Formel: $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_r=298.0$



Nitroprussid-Natrium

- **Kaliumhexacyanoferrat(III)-Trihydrat**

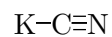
Firma : Merk

Chemische Formel: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mr}=383.29$ 

Kaliumhexacyanoferrat

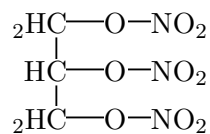
- **Kaliumcyanid**

Firma : Fluka

Chemische Formel: KCN , $\text{Mr}=65.12$ 

Kaliumcyanid

- **Glyceroltrinitrat**

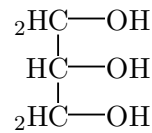
Firma : Merk, *Glyceroltrinitratlösung 1%*Chemische Formel: $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_9$, $\text{Mr}=227.09$ 

Glyceroltrinitrat

- **Glycerin**

Firma : Merk, *Glycerin 85%*

Chemische Formel: $C_3O_3H_8$, $Mr=92.00$



Glycerin

2.4 Messaufbau

Um das optische Signal der SD-Welle zu beobachten wurden zwei Messstände gebaut.

Ein Messstand wurde für die Experimente, die den K^+ Einfluss auf das optische Profil untersucht haben, benutzt. Das Signal wurde durch ein Mikroskop mit einem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung beobachtet, mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu) und einem Kamera-Kontroll Gerät auf den Videorekorder aufgenommen (S-VHS, Sony) und auf dem Videoband gespeichert (VHS, Sony) (Abb. 2.1).

Die auf Video gespeicherten Daten wurden von dem Videoband in ein Videoimaging-System eingespielt. Dieses System hatte einen Frame grabber (*Matrox Pulsar*). Alle Bildbearbeitungsoperationen wurden mit einer im Labor geschriebenen Bildverarbeitungssoftware durchgeführt. Mit dieser wurde der Mittelwert des Graulevels eines Retinabereiches von ca. $4.6 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2$ mit einer Frequenz von 1 Hz berechnet.

Der zweite Messstand war auf der Basis eines Leica M5 Binoculars aufgebaut und hat im Vergleich zum ersten Stand Vorteile. Anstelle eines der Okulare wurde eine Farbvideokamera angebaut, deren Signal auf einem Monitor (Panasonic) beobachtet wurde und auf einem Videorekorder (Panasonic) aufgezeichnet werden konnte. Am Bionocular war zusätzlich ein Fototubus mit C-Mount Adapter angebaut, an dem ein Photomultiplier (Hamamatsu) montiert war. Bei maximaler Vergrößerung (Standard-Messbedingung) des Objektivs betrug die Messfläche 1 mm^2 . Das Ausgangssignal des Photomultipliers wurde über einen Messverstärker auf ein Tiefpassfilter (Krohn-Hite) mit 10 Hz Grenzfrequenz (3 dB, 48 dB pro Oktave) gegeben. Anschließend konnte es auf einem Oszillographen beobachtet werden und wurde über einem A/D-Wandler

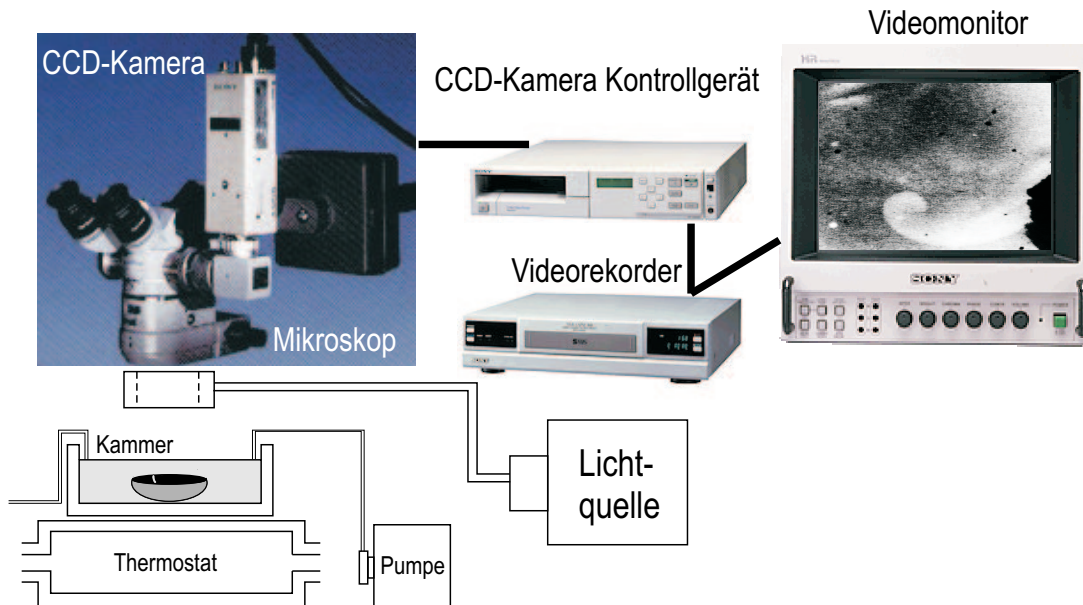


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Messanordnung für die optische Registrierung. Die Daten werden zur späteren Auswertung auf Videoband gespeichert.

(Spectra 812 PG) mit im Labor geschriebener Software mit 10 Hz digitalisiert und auf einem Standard PC gespeichert. Die eigentliche Messdatenauswertung wurde off-line vorgenommen und wird später beschrieben.

Unter dem Binocular war ein X/Y-Kreuztisch mit Motorantrieb und Joy-Stick Bedienung montiert, auf dem sich eine Heizfolie befand. Diese wurde durch ein entsprechendes Netzteil betrieben. Über der Heizfolie wurde in einem Halter ein Petrischälchen mit Überlauf befestigt, in dem sich die Retina befand. Die Temperatur der Badlösung konnte gemessen werden und wurde zwischen 28-30°C gehalten. Das Petrischälchen wurde mit einer zweikanaligen Peristaltik-Pumpe (getrennter Zu- und Ablauf) mit 2.5 ml/min perfundiert. Der pH-Wert in der Perfusionslösung wurde kontinuierlich gemessen. Die Beleuchtung der Retina erfolgte über ein Ringlicht mit Halogenkaltlichtquelle (150 Watt). Die SD-Wellen wurden durch vorsichtiges Berühren der Retina mit einer Wolfram-Elektrode (Spitzendurchmesser 3 μm) ausgelöst. Diese war mit einem Halter auf einem mechanischem Mikromanipulator montiert, der am Messtand befestigt war. Photos der verschiedenen Komponenten des Messtandes sind in Abbildung 2.2 zu sehen.

Die Vorteile dieses Standes sind:

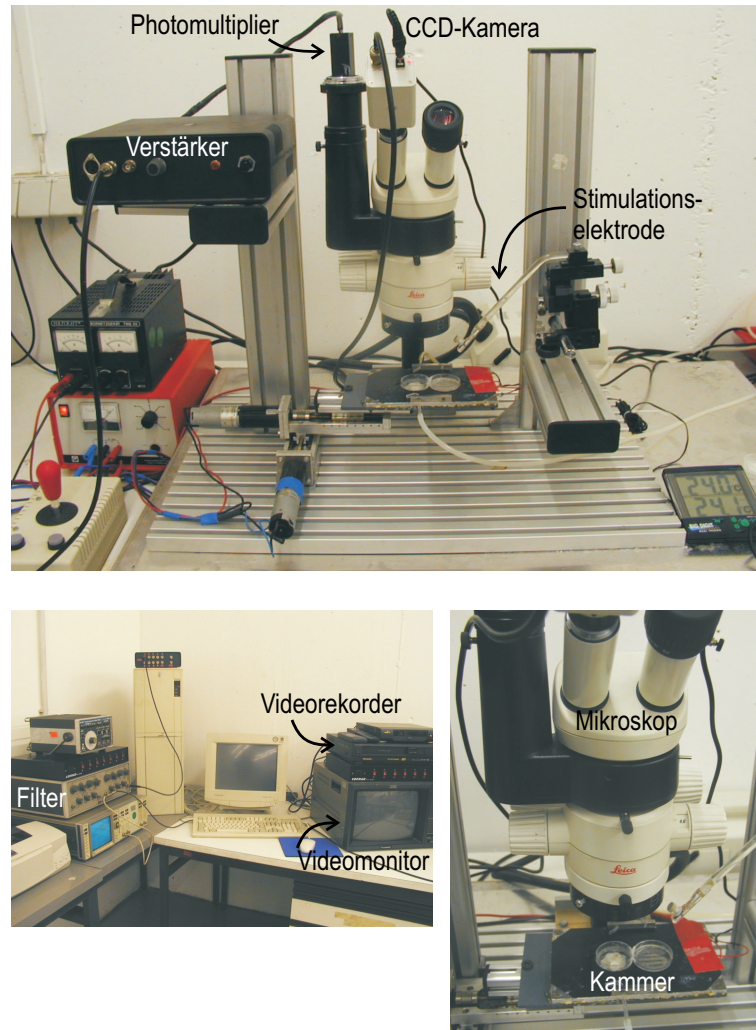


Abbildung 2.2: Darstellung der Messanordnung für die optischen Experimente.

- Um die Daten zu speichern braucht man keine Videobänder zu sammeln.
- Durch die Messanordnung von Photomultiplier mit Verstärker und Filter war das gemessene Signal fast frei von hochfrequenten Störungen, was für die ganze Datenverarbeitung sehr wichtig ist.

2.5 Protokolle der Experimente

Alle Experimentserien wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Dieses Protokoll bestimmte die Dauer des Experimentes, Anzahl der Kontrollmessungen und die Dauer der Registrierung der einzelnen Messungen (Abb. 2.3).

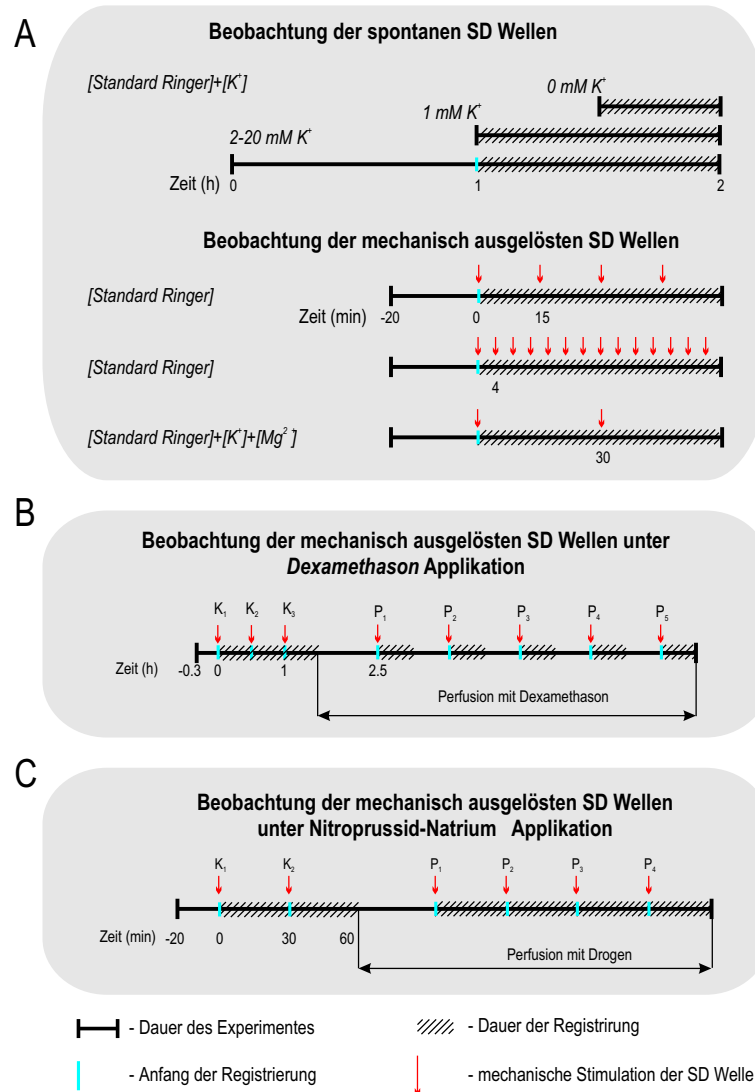


Abbildung 2.3: Das Protokoll für alle Experimente ist dargestellt. **A** - präsentiert die Protokolle der Experimente, während denen der K⁺ Einfluss auf das IOS untersucht wurde (Kap. 3.1). **B** - zeigt das Protokoll der Dexamethason Applikation (Kap. 3.2). **C** - zeigt das Anwendungsprotokoll für Nitroprussid-Natrium, Hexacyanoferrat und Kaliumcyanid (Kap. 3.3). [Standard Ringer]+[K⁺] - bedeutet, die Kaliumkonzentration wurde variiert. [Standard Ringer]+[K⁺]+[Mg²⁺] - bedeutet, Kalium- und Magnesiumkonzentrationen wurden variiert. Mit den Experimenten wurde jeweils erst nach einer für die Retina benötigten Regenerationszeit von ca. 20 Minuten begonnen. K - Kontrollparameter der SD-Welle. P - Parameter der SD-Welle während der Perfusion mit Drogen.

2.6 Auswertung der Daten

Um Änderungen während der Ausbreitung der SD-Welle zu sehen, wurde das IOS analysiert. Für jedes Profil wurden die folgenden Parameter ausgewertet: Amplitude,

Dauer, *maximale* Steigung der Front und des Abfalls der ersten Phase und Amplitude, Dauer, Steigung der Front und des Abfalls der zweiten Phase des IOS.

2.6.1 Fourier transform filtering Technik

Mit Hilfe der *fast Fourier transform filtering Technik*¹ (FFT) wurden die hochfrequenten Störungen des IOS reduziert. Für diese und alle folgenden mathematischen Prozeduren wurde die Interactive Data Language (IDL, 5.3 für Windows) benutzt.

Alle Grenzfrequenzen kann man in Tabelle 2.2 sehen.

2.6.2 Parameter der ersten Phase

Der nächste Schritt war, den maximalen Wert des IOS der ersten Phase und seine Position zu finden. Die zwei minimalen Werte der Front und des Abfalls und ihre Positionen wurden benutzt, um die Grundlinie und die Dauer der ersten Phase zu bestimmen.

Abhängig von dem experimentellen Protokoll wurde diese Linie als Mittelwert der 50 Werte (N) (Experimente, die in Kap. 3.1 beschrieben wurden) oder als Mittelwert der 1800 Werte vor dem minimalen Wert der Front des IOS der ersten Phase errechnet.

Diese Anzahl N=50 bei der Aufnahmefrequenz von 1 Hz entspricht 50 s des Experimentes. Dieser Wert wurde genommen, weil während dieser Experimente die Frequenz der spontanen SD-Wellen sehr hoch war und dadurch mit größerem N der Mittelwert teilweise das IOS der vorhergehenden Welle miteinschließen würde.

Die Anzahl N=1800 bei der Aufnahme mit 10 Hz Frequenz entspricht 3 Minuten des Experimentes. In diesem Fall wurden SD-Wellen mechanisch ausgelöst, was die Kontrolle der räumlich-zeitlichen Distanz zwischen SD-Wellen bedeutet.

¹Die diskrete Fourier Umwandlung, $F(u)$, von N-Elementen, eine ein-dimensionale Funktion, $f(x)$, ist definiert als:

$$F(u) = \frac{1}{N} \sum_{x=0}^{N-1} f(x) e^{[-j2\pi ux/N]}$$

Die umgekehrte Fourier Umwandlung (Richtung > 0) ist definiert als:

$$F(u) = \frac{1}{N} \sum_{u=0}^{N-1} f(x) e^{[j2\pi ux/N]}$$

Tabelle 2.2: Die Grenzfrequenzen des FFT-Filters

<i>Experimente mit:</i>	<i>Grenzfrequenz (Hz)</i>	
	<i>der ersten Phase</i>	<i>der zweiten Phase</i>
Kalium (helle SD-Wellen)	0.02	0.0067
Kalium (dunkle SD-Wellen)	0.17	0.022
Nitroprussid-Natrium Kaliumhexacyanoferrat Kaliumcyanid Trinitroglycerin	0.022	0.0056
Glycerin	0.02	0.0078

Die Amplitude der ersten Phase wurde als Differenz zwischen maximalem Wert des IOS der ersten Phase und der Grundlinie errechnet.

Die Dauer der ersten Phase wurde als Differenz zwischen den zwei minimalen Werten der Front und des Abfalls des IOS der ersten Phase ausgewertet.

Die *maximale* Steigung der Front des IOS der ersten Phase wurde für alle Experimente errechnet, aber die maximale Steigung des Abfalls wurde *nicht* für das IOS der im Kapitel 3.1 beschriebenen Experimente ausgewertet².

2.6.3 Parameter der zweiten Phase

Für die Auswertung der Parameter der zweiten Phase wurde ein FFT-Filter mit niedrigeren Grenzfrequenzen verwendet. Zuerst wurde die Gerade durch die zwei minimalen Werte der ersten Phase angepasst. Mit Hilfe dieser Prozedur wird die erste Phase des

²Nach der FFT-Filterung hatte das IOS immer noch Störungen, die die Auswertung dieses Parameters unmöglich gemacht haben.

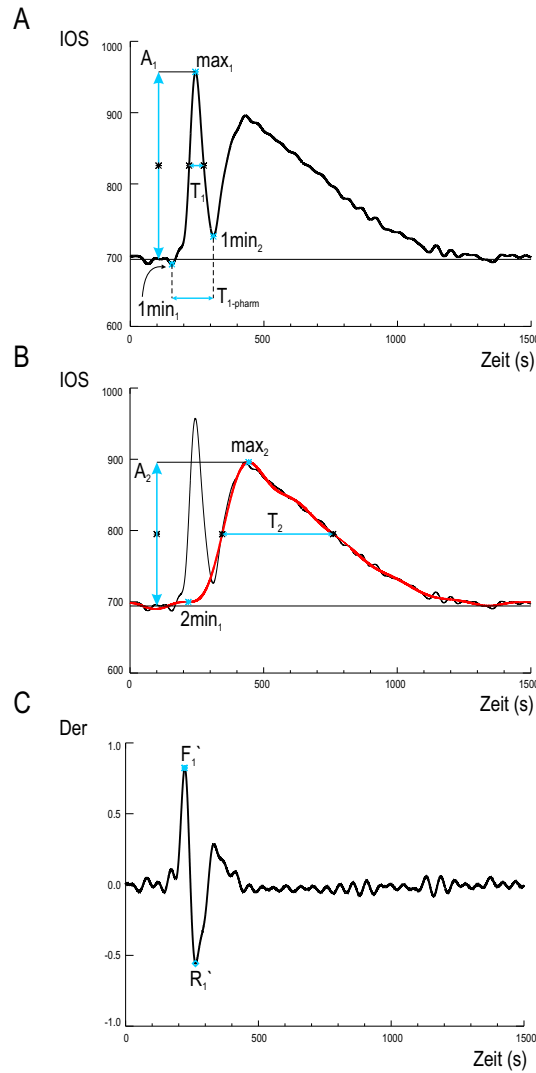


Abbildung 2.4: Hier ist die Auswertung des IOS dargestellt. A - ist die Analyse der Parameter der ersten Phase. Der maximale Wert (max_1) und die zwei minimalen Werte ($1min_1$, $1min_2$) des IOS wurden für die Bestimmung der Dauer (T_1 , Kap. 3.1; $T_{1-pharm}$, ab Kap. 3.2) und der Amplitude (A_1) benutzt. B - ist die Analyse der Parameter der zweiten Phase. max_2 ist der maximale und $2min_1$ ist der minimale Wert der zweiten Phase. A_2 - ist die Amplitude, T_2 - ist die Dauer. C - ist die Kalkulation der maximalen Steigung der Front (F_1') und des Abfalls (R_1') der ersten Phase des IOS.

IOS ausgefiltert. Für dieses neue IOS Profil wurde dann das oben erwähnte FFT-Filter verwendet (siehe Tab. 2.2).

Ähnlich der ersten Phase wurde für die zweite Phase ebenso ein maximaler Wert des IOS gefunden. Weil die zweite langsamer als die erste Phase ist, war es hier nur

möglich einen minimalen Wert des Signals zu bestimmen.

Die Amplitude der zweiten Phase wurde als Differenz zwischen maximalem Wert und der Grundlinie errechnet.

Die Dauer der zweiten Phase wurde als die Breite des IOS auf der Höhe, die der Hälfte der Amplitude der zweiten Phase entspricht, errechnet.

Die Steigung der Front und des Abfalls der zweiten Phase wurden anders als für die erste Phase errechnet. Das Signal ist sehr langsam, was bedeutet, dass die *maximalen* Steigungen der zweiten Phase nicht dem Signal selbst, sondern den *Störungen* des Signals entsprechen würden. Deshalb ist eine andere Methode benutzt worden. Erst wurde durch jeweils 600 Punkte (was einer Minute des Experimentes entspricht) des Signals der zweiten Phase eine Gerade angepasst. Wie bekannt ist, kann jede Gerade durch die Gleichung

$$y=a_1x+a_0$$

bestimmt werden, in der a_1 und a_0 die Koeffizienten dieser Geraden sind und a_1 der Steigung der Geraden entspricht. Um die Fehler niedriger zu machen wurden diese Geraden so angepasst, dass sie sich halb überlappten.

$$\text{von } N_0 \text{ bis } N_{600-1} : y_1=a_{11}x+a_{10}$$

$$\text{von } N_{300-1} \text{ bis } N_{900-1} : y_2=a_{21}x+a_{20}$$

...

$$\text{von } N_j \text{ bis } N_{j+600} : y_{(i)}=a_{(i)1}x+a_{(i)0}$$

Jetzt wurden die maximalen und minimalen Koeffizienten ($a_{(i)1}$) der Geraden, die den Steigungen der Front (positive Koeffizient) und des Abfalls (negative Koeffizient) des IOS der zweiten Phase entsprechen, gefunden.

Die gesamte Auswertung des IOS Signals ist auf Abbildung 2.4 zu sehen.

2.6.4 Normierung der Messdaten

Alle Werte der Experimente wurden auf einen Mittelwert der Kontrollmessungen normiert.

1. Der Mittelwert aller Kontrollmessungen ($\overline{K}$) wurde als

$$\overline{K} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N K_i$$

berechnet. N ist die Anzahl der Kontrollmessungen.

2. Alle in den Experimenten ermittelten Parameter wurden auf diesen Kontrollmittelwert ($\overline{K}$) normiert (Abb. 2.3).

$$\overline{P}_i = \frac{P_i}{\overline{K}}$$

2.7 Schwierigkeiten während der IOS Messungen

Während der Aufnahme des IOS müssen alle Parameter des Messstandes genau kontrolliert werden, weil Instabilitäten der Geräte zu großen Störungen im IOS führen können, die die Auswertung des IOS nahezu unmöglich machen.

- *Stabilität der Lichtquelle.* Das IOS ist sehr empfindlich gegenüber kleinsten Oszillationen, die die Lichtquelle während des Experiments generieren kann. Auf der Abbildung 2.5 A ist ein klassisches IOS, das durch Instabilitäten der Lichtquelle gestört wurde, präsentiert. Solche Störungen mit niedriger Frequenz können mit dem FFT-Filter nicht eliminiert werden, deshalb können solche Signale nicht weiter bearbeitet werden.
- *Konstante und stabile Funktion der Pumpe.* Die Retina befindet sich in einer ständig perfundierten Kammer, und Änderungen der Höhe des Flüssigkeitspiegels beeinflussen das IOS genau so stark wie eine instabile Lichtquelle (Abb. 2.5 B).
- *Stabile Retina.* Es wird es weiterhin diskutiert, dass unter bestimmten Bedingungen bei sehr hohen Frequenzen spontane SD-Wellen entstehen können [MFNN00]. Wenn die zeitliche Distanz zwischen zwei aufeinander folgenden Wellen weniger als zehn Minuten beträgt, wird die nachkommende Welle das IOS der vorhergehende Welle beeinflussen. In diesem Fall kann das IOS nicht weiter analysiert werden (Abb. 3.3 D).

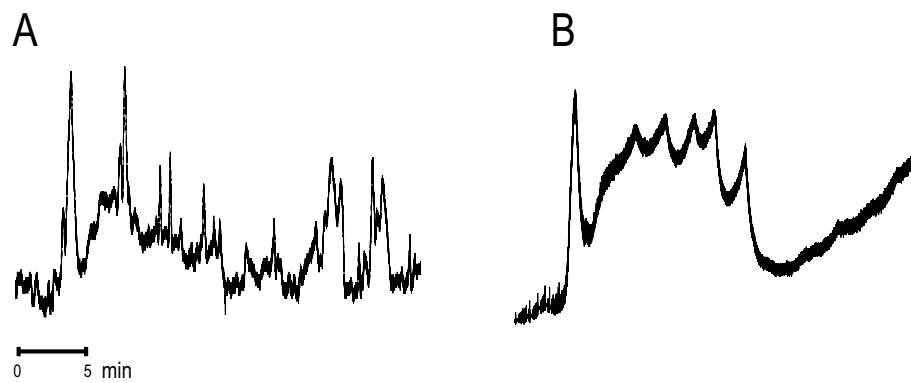


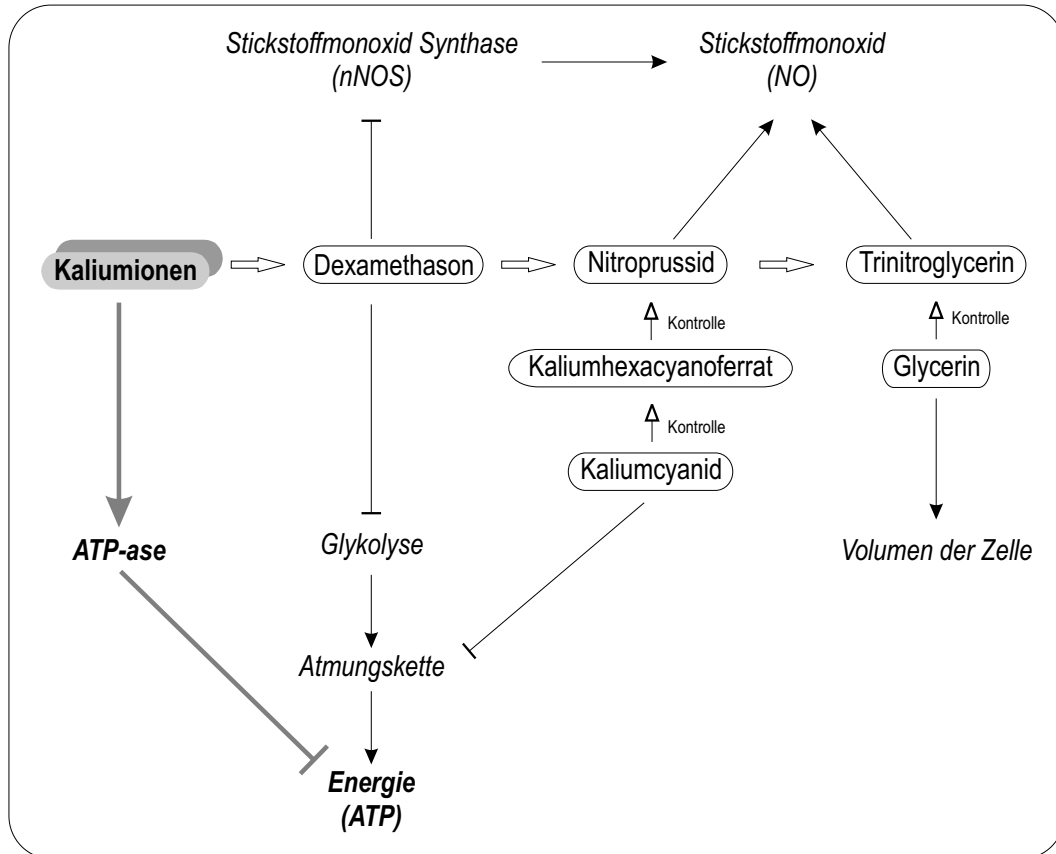
Abbildung 2.5: Hier sind zwei optische Profile von SD-Wellen, die Störungen auf Grund einer instabilen Lichtquelle (A) und einer instabilen Funktion der Peristaltikpumpe (B) haben, präsentiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Einfluss der Kaliumionen auf die zweite Phase des IOS

Das folgende Schema dient als Wegweiser durch das gesamte Kapitel. Zur Orientierung sind die für das jeweilige Unterkapitel wichtigen Elemente grau unterlegt.



3.1.1 Beschreibung der Experimente

Kaliumionen (K^+) spielen eine wichtige Rolle während der Ausbreitung der SD-Welle. K^+ depolarisiert die Membranen, das führt zur Öffnung von Ionenkanälen, verändert die verschiedenen Ionengradienten und als Folge davon erhöht sich die ATPase Aktivität (Abb. 1.2). In diesem Teil der Arbeit wird untersucht, welchen Effekt Kaliumionen auf das gesamte IOS der SD-Welle haben.

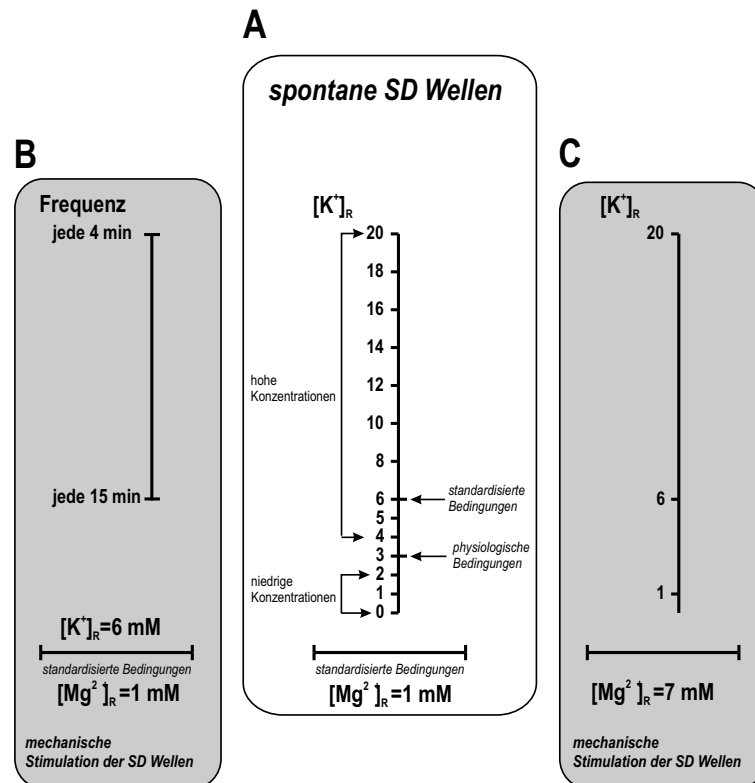


Abbildung 3.1: Die Schemata der drei Serien der Experimente, während derer die Beeinflussung der Kaliumionen auf das IOS der SD-Welle untersucht werden. **A** zeigt die Bedingungen, während denen die spontane SD Ausbreitung beobachtet wurde. **B** ist ein Schema der Kontrollexperimente mit niedriger und hoher Frequenz der SD Wellen nach mechanischer Stimulation. **C** ist ein Schema der Kontrollexperimente in der Anwesenheit von hohen $[Mg^{2+}]_R$. SD Wellen wurden mechanisch ausgelöst.

3.1.2 Effekt höherer und niedrigerer K^+ Konzentrationen

Der variierte Parameter ist die K^+ Konzentration in der Ringer Lösung ($[K^+]_R$) und folglich im extrazellulären Raum (Abb. 3.1 A).

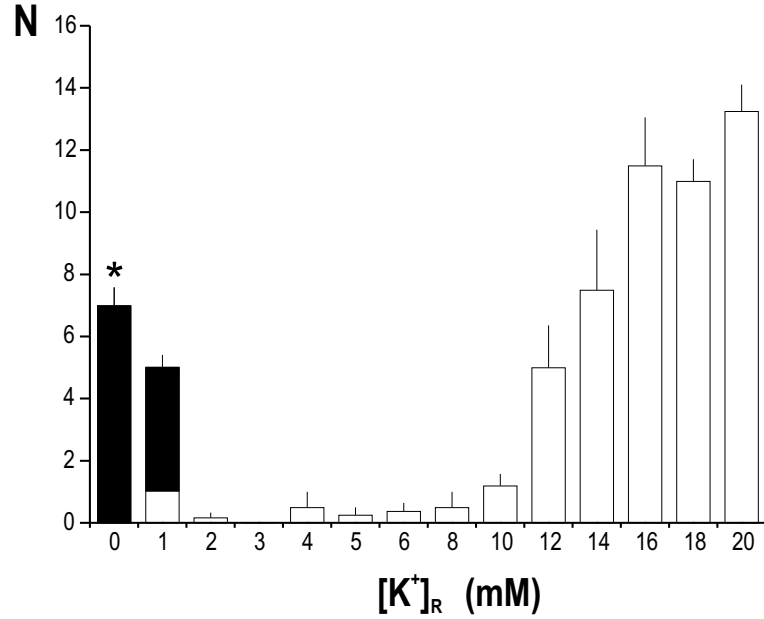


Abbildung 3.2: Die Anzahl der spontanen SD-Wellen als Funktion von $[K^+]_R$. N bezeichnet die Gesamtzahl der SD-Wellen, die während einer Stunde vorgekommen sind. Die schwarzen Balken im Graphen (0 und 1 mM $[K^+]_R$) kennzeichnen die Anzahl der Wellen mit dunkler Front. (* - die Anzahl der Wellen in Abwesenheit von K^+ konnte nur 30 Minuten gemessen werden. Deshalb sind die Daten mit dem Faktor zwei multipliziert worden. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM.)

Unphysiologische $[K^+]_R$ führt zur spontanen Entwicklung von SD-Wellen.

Unter physiologischen Bedingungen (3 mM [Han78]) wurde die Erscheinung spontaner SD-Wellen nicht beobachtet.

Eine Erhöhung (von 4 bis 20 mM) oder eine Reduzierung (von 2 bis 0 mM) von $[K^+]_R$ führt zur Entstehung spontaner SD-Wellen. Fast alle dieser Wellen propagieren vom äußeren Rand der Retina. Je weiter der $[K^+]_R$ Level vom physiologischen Zustand entfernt ist, desto mehr spontane SD-Wellen werden in definierten Zeitabständen beobachtet (Abb. 3.2).

SD-Wellen mit dunkler Front breiten sich in Anwesenheit von niedriger $[K^+]_R$ aus.

Wenn $[K^+]_R$ zwischen 2 und 20 mM variiert wird, ist das IOS als eine milchige sich fortpflanzende Wellenfront zu beobachten (Abb. 3.3 A). Wird $[K^+]_R$ weiter bis 1 mM reduziert, hat die erste spontane SD-Welle ebenso eine milchige Front, doch die Rück-

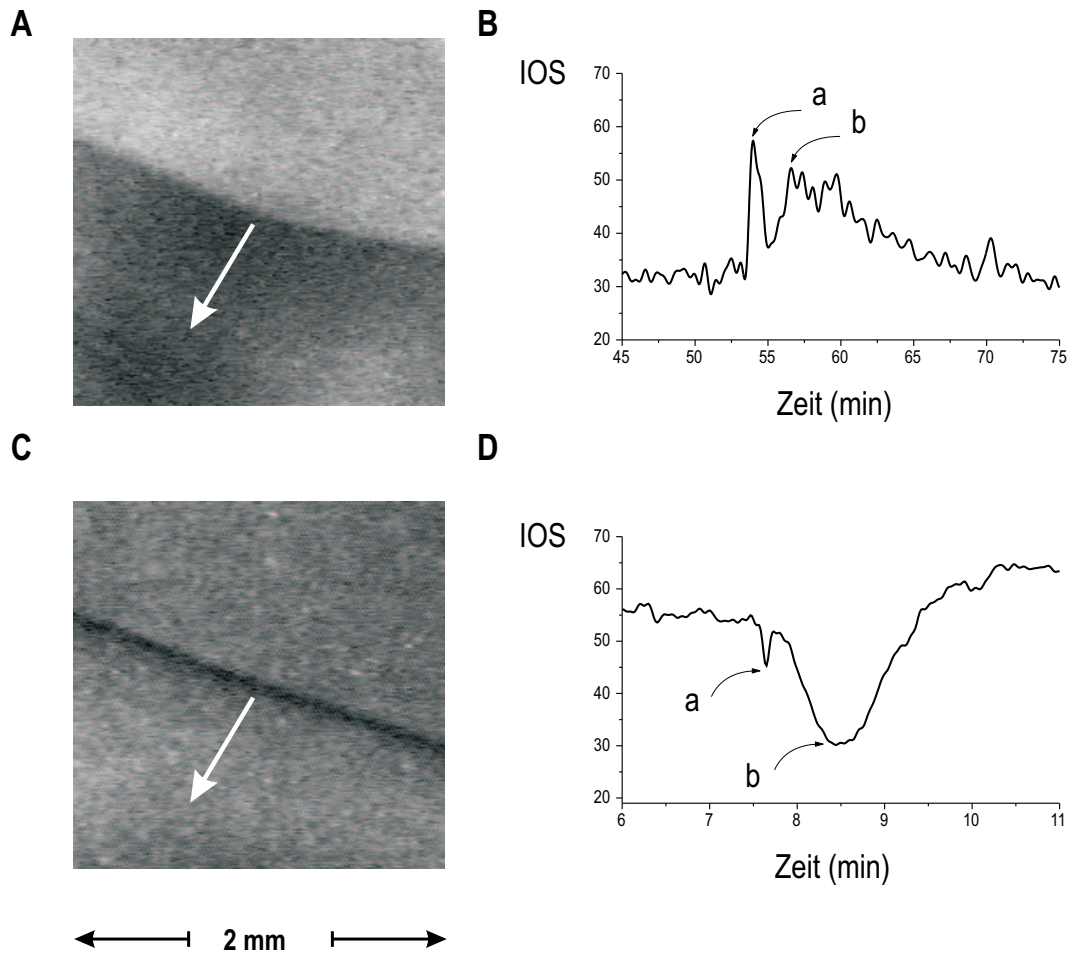


Abbildung 3.3: Verschiedene Typen spontaner SD-Wellen. **A** zeigt das Bild einer weißen Wellenfront (6 mM $[K^+]_R$) und **B** das dazugehörige entsprechende optische Profil über der Zeit. **C** ist das Bild einer SD-Welle mit dunkler Front (0 mM $[K^+]_R$) und **D** das entsprechende optische Profil. **a** - die erste Phase, **b** - die zweite Phase des IOS. Die weißen Pfeile zeigen die Richtung der Wellenausbreitung.

front dieser Welle erholt sich nicht mehr bis zu einem normalen Grauwertlevel (siehe Kap.3.1.4) und alle folgenden Wellen haben eine dunkle Front, die sich auf einem hellen Hintergrund ausbreitet (Abb. 3.3 C). In Abwesenheit von $[K^+]_R$ propagieren SD-Wellen von Anfang an mit einer dunklen Front.

Das IOS der Wellen mit dunkler und heller Front hat zwei Phasen.

Unter standardisierten Bedingungen ($[K^+]_R=6$ mM) besteht das IOS aus zwei verschiedenen Phasen: eine erste kurz-anhaltende (ca. 52 ± 6.7 s) und eine zweite lang-anhaltende (ca. 5.9 ± 0.8 min) Phase (Abb. 3.3 B). In Gegenwart von niedriger K^+

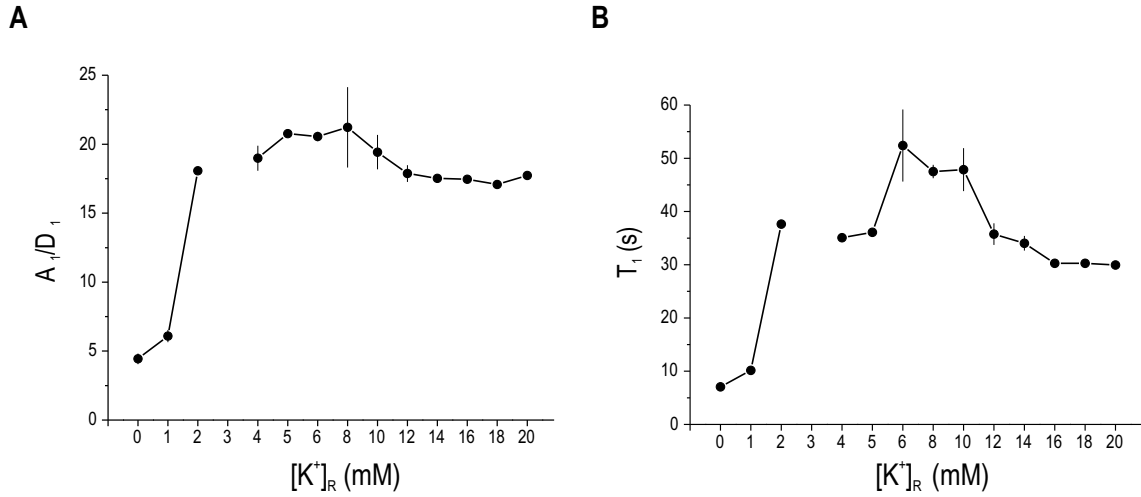


Abbildung 3.4: Parameter des IOS der ersten Phase als Funktion von $[K^+]_R$. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. A_1 die Amplitude, T_1 die Dauer, D_1 die maximale Steigerung der führenden Front des IOS. Um die Amplitude zu normalisieren wurde das Verhältnis A_1/D_1 berechnet.

(0, 1 mM) hat das IOS ein invertiertes Profil aber immer noch mit zwei verschiedenen Phasen: die kurz-anhaltende (ca. 10.2 ± 0.7 s) und die lang-anhaltende (ca. 1.5 ± 0.2 min) Phase (Abb. 3.3 D).

Abhängigkeit der ersten Phase des IOS von $[K^+]_R$.

Die Dauer und die skalierte Amplitude der ersten Phase ist nur wenig von K^+ abhängig, so lang die Experimente in dem Bereich 2 bis 20 mM $[K^+]_R$ gemacht werden (Wellen mit heller Front) (Abb. 3.3 A, B).

Dunkle SD-Wellen ($[K^+]_R = 1$ mM) haben sowohl eine um das ca. 5.15-fache reduzierte Dauer als auch um das ca. 3.38-fache reduzierte skalierte Amplitude bezogen auf standardisierte Wellen mit 6 mM $[K^+]_R$ in Kontrollexperimenten (Abb. 3.4 A, B).

Abhängigkeit der zweiten Phase des IOS von $[K^+]_R$.

Die zweite Phase des IOS hängt von der $[K^+]_R$ ab. Bei 2 mM $[K^+]_R$ wird die maximale Dauer und die maximale Amplitude beobachtet. Erhöhung der $[K^+]_R$ reduziert das Verhältnis der Amplituden A_2/A_1 bis auf ein Minimum, das bei 12 mM $[K^+]_R$ erreicht wird. Bei 14 mM $[K^+]_R$ war nur in einem Fall (n=4) die zweite Phase des IOS zu

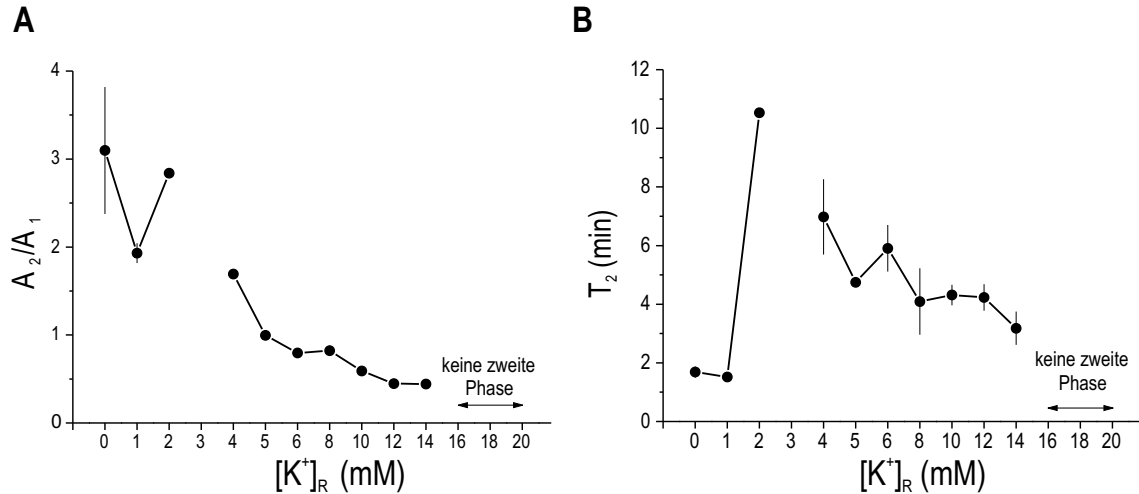


Abbildung 3.5: Die zweite Phase des IOS als Funktion von $[K^+]_R$. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. A_2 - die Amplitude, T_2 - die Dauer. Weil die Amplitude der ersten Phase (A_1) sich in Gegenwart von verschiedener K^+ Konzentrationen nicht verändert, ist der Abfall von dem Verhältnis A_2/A_1 ein Ergebnis der A_2 Reduktion. Hat die $[K^+]_R$ den Wert von 14 mM überstiegen, ist die zweite Phase des IOS nicht mehr erkennbar.

beobachten. Bei $[K^+]_R$ über diesem 14 mM Level ist keine zweite Phase mehr erkennbar. Das IOS der Wellen mit der dunklen Front hat dagegen immer noch eine zweite Phase, aber diese ändert sich wenig, wenn die $[K^+]_R \leq 1$ mM ist (Abb. 3.5 A, B).

3.1.3 Mechanische Stimulation mit niedriger und hoher Frequenz

Um zu kontrollieren ob die zweite Phase des IOS als Folge der Verkürzung der räumlichen Distanz aufeinander folgender Wellen verschwindet [BDdL⁺97], wurden Experimente mit mechanischer Stimulation nach jeweils 15 oder 4 Minuten gemacht. Diese Frequenzen imitieren die Frequenzen der spontanen SD-Wellen Erscheinung in Gegenwart von 6 mM bzw. 20 mM $[K^+]_R$ (Abb. 3.1 B). Obwohl die höhere Frequenz die Amplitude und die Dauer der zweiten Phase beeinflussen konnten, war die Größenordnung des Effektes nicht vergleichbar mit dem, der während der Experimente mit höherem $[K^+]_R$ beobachtet wurde (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Der Vergleich der Eigenschaften des IOS bei mechanisch angeregten und spontanen SD-Wellen. *Reiz* zeigt, wann mechanisch stimuliert wurde um die SD-Welle aufzulösen, wobei mechanisch angeregte mit (+) und spontane SD-Wellen mit (-) gekennzeichnet ist. *Zeitabstand* - der Zeitabstand zwischen den SD-Wellen. A_2/A_1 - die Verhältniszahl der ersten und der zweiten Phase. T_2 - die Dauer der zweiten Phase. Die Stimulation mit höherer Frequenz unter normalen Bedingungen führt nicht zum Verschwinden der gesamten zweiten Phase.

<i>Reiz</i>	$[K^+]_R, mM$	<i>Zeitabstand, min</i>	A_2/A_1	T_2, min
-	6	16.25	0.79 ± 0.05	5.9 ± 0.08
+	6	14.86 ± 0.16	0.73 ± 0.08	4.62 ± 0.38
-	20	4.42 ± 0.25	—	—
+	6	4.00 ± 0.04	0.53 ± 0.04	2.14 ± 0.07

3.1.4 IOS der SD-Wellen in Anwesenheit von niedrigen K^+ und höheren Mg^{2+} Konzentrationen

Es ist bekannt, dass eine höhere Mg^{2+} Konzentration in der Ringer Lösung ($[Mg^{2+}]_R$), die Erscheinung der spontanen SD-Wellen unterdrücken kann [SAC⁺91]. Das Ziel dieser Experimente (Abb. 3.1 C) war:

- die spontanen Wellen zu unterdrücken,
- SD mechanisch auszulösen,
- die räumliche Distanz zwischen den Wellen zu kontrollieren,
- das ganze IOS unabhängig von spontanen Wellen in Anwesenheit von niedriger (1 mM), standardmäßig (6 mM) und hoher (20 mM) $[K^+]_R$ zu beobachten.

Die zeitliche Distanz zwischen den Wellen beeinflusst das IOS und die Lebensdauer der Retina

Die niedrige $[K^+]_R$ (0-1 mM) erleichtert die Erscheinung spontaner SD-Wellen (5 ± 1 Minuten). In diesem Fall ist die zeitliche Distanz zwischen den SD-Wellen nicht ausreichend für die Regeneration des Gewebes, weil die nächste kommende Welle sich innerhalb der zweiten Phase des IOS der vorhergehenden Welle ausbreitet. Solche Wellen haben eine dunkle Front und ein entsprechend invertiertes IOS (Abb. 3.6 A). Unter diesen Bedingungen überlebt das Gewebe nur zwischen 30-60 Minuten.

Wenn SD-Wellen mit mechanischer Stimulation in Anwesenheit von 1 mM $[K^+]_R$ und 7 mM $[Mg^{2+}]_R$ alle 30 Minuten ausgelöst werden (dieser Zeitabstand ist größer als die Dauer der zweiten Phase), ist das IOS der folgenden Wellen nicht mehr invertiert und die Retina überlebt mehr als 2 Stunden.

Wenn die Frequenz der SD-Wellen kontrolliert wird, hängt die zweite Phase des IOS auch von der $[K^+]_R$ ab. Je höher die $[K^+]_R$ ist, desto geringer ist die Amplitude und die Dauer der zweiten Phase (Abb. 3.6 B, C). Während der Experimente mit 20 mM $[K^+]_R$ und 7 mM $[Mg^{2+}]_R$ ist eine zweite Phase des IOS auch nicht mehr erkennbar (Abb. 3.6 D).

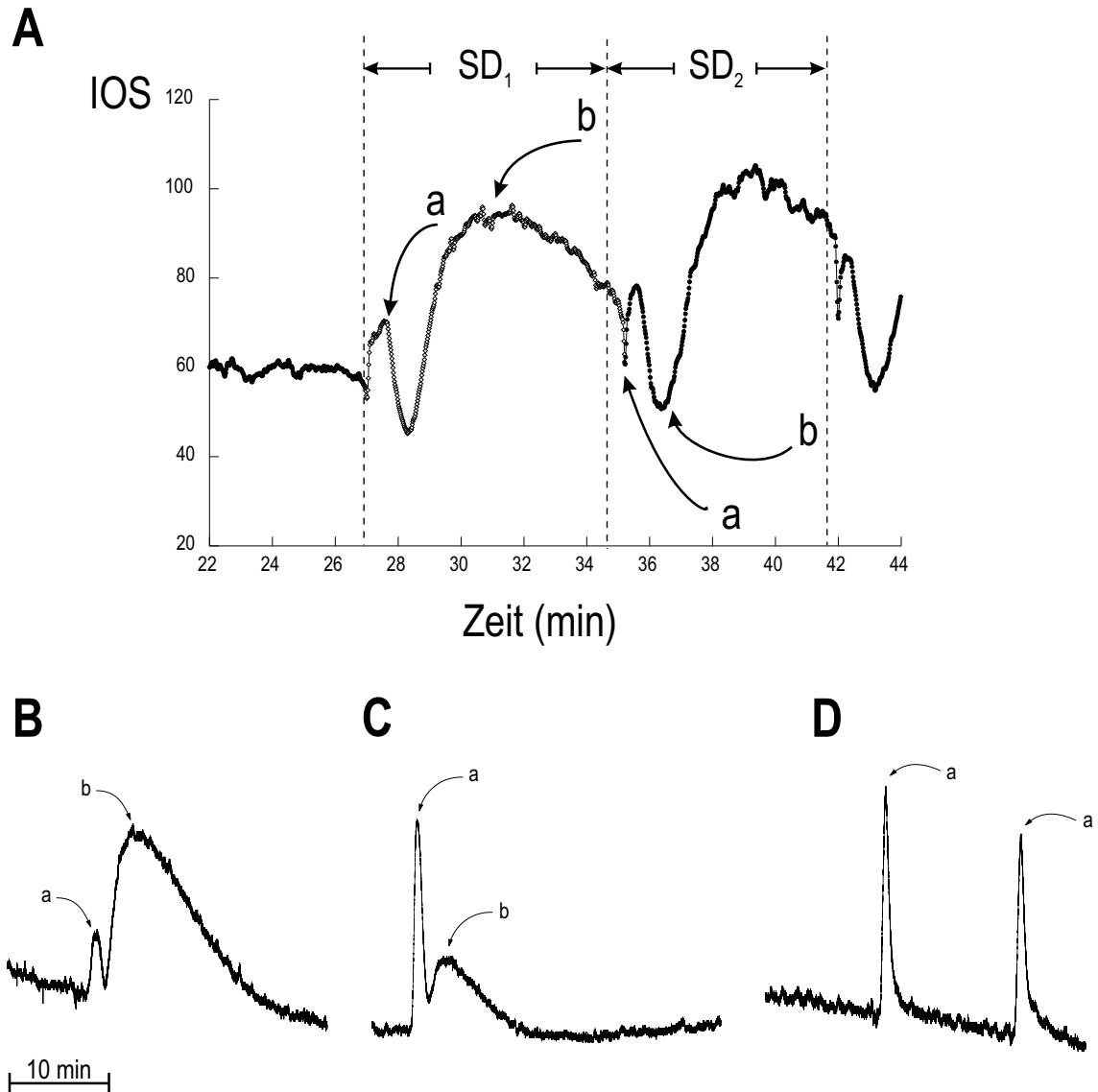
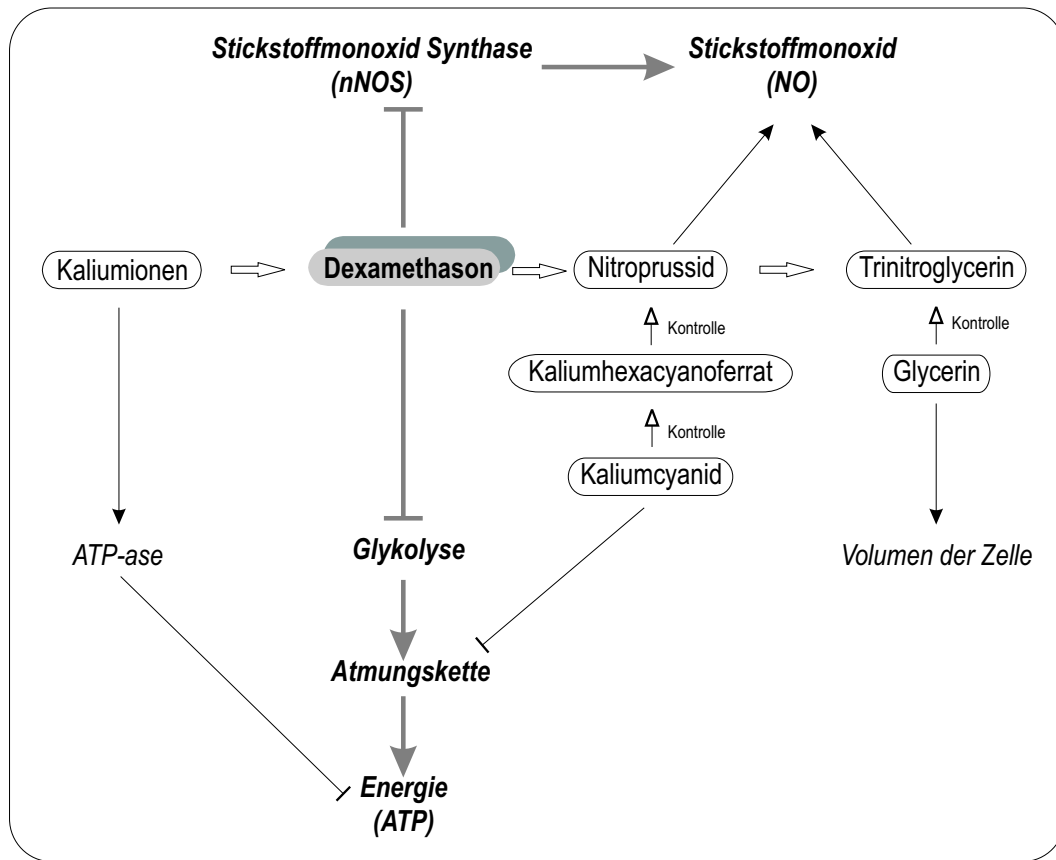


Abbildung 3.6: **A** - Das IOS zweier spontan aufeinander kommenden Wellen in Anwesenheit von 1 mM $[K^+]_R$ und 1 mM $[Mg^{2+}]_R$. SD_1 - ist das IOS einer spontanen SD mit heller Wellenfront. SD_2 - ist das IOS einer spontanen SD mit dunkler Wellenfront. **B** - Das IOS der mechanisch stimulierten SD-Welle in Anwesenheit von niedriger $[K^+]_R$ (1 mM) und hoher $[Mg^{2+}]_R$ (7 mM). **C** - Das IOS der mechanisch stimulierten SD-Welle unter standardisierten Bedingungen (6 mM $[K^+]_R$ und 1 mM $[Mg^{2+}]_R$). **D** - Das IOS zweier mechanisch stimulierter SD Wellen in Anwesenheit von hoher $[K^+]_R$ (20 mM) und hoher $[Mg^{2+}]_R$ (7 mM). **a** - die erste Phase, **b** - die zweite Phase.

3.2 Einfluss des Dexamethason auf das IOS



Die Experimente mit Kaliumionen haben gezeigt, dass die metabolischen Prozesse (z.B. Glukolyse), während denen Energie aufgebaut (ATP) wird, eine wichtige Rolle in der Gewebeerholung nach der SD-Ausbreitung spielen können.

Dexamethason, ein synthetisches Steroid, wurde als ein Inhibitor dieses Pfades gewählt. Diese Substanz diffundiert durch die Membran in die Zelle und interagiert mit intrazellulären Rezeptoren. Das Ergebnis ist ein Steroid-Rezeptor-Komplex, der mit der DNA interagiert und die Gentranskription modifiziert [FHRS96]: Daraus folgt:

- eine Reduzierung der Aufnahme und der Nutzung der Glukose in der Zelle,
- eine Blockierung der Induktion der *Stickstoffmonooxid Synthase (NOS)* (siehe Kap. 4.4),
- nicht spezifische Änderungen des Stoffwechsels der Proteine: die Erhöhung des Katabolismus und die Reduzierung des Anabolismus.

3.2.1 Erste Phase

Die *Amplitude* (A_1) und die *Steigung* (F'_1) der Wellenfront reduzieren sich (A_1 um ca. 60% und F'_1 um ca. 59%) und zeigen eine monotone Konzentrationsabhängigkeit von Dexamethason (Abb. 3.7 A, C).

Die *Dauer* (T_1) reduziert sich relativ unspezifisch zwischen einem Konzentrationsbereich von 0.1 mM und 3 mM Dexamethason um ca. 22%. Dabei zeigt dieser Parameter einen sehr kurzen signifikanten bi-phasischen Effekt¹ nach einer Stunde (150 min des Experimentes) Perfusion mit Dexamethason: 0.1 mM reduziert die T_1 stärker als 3 mM Dexamethason (Abb. 3.7 B).

Die *Steigung des Abfalls* (R'_1) zeigt eine Reduzierung um ca. 52%, diese ist nicht monoton. Der Effekt wurde nur in Anwesenheit von 3 mM Dexamethason beobachtet (Abb. 3.7 D).

3.2.2 Zweite Phase

Die *Amplitude* (A_2) und die *Steigung der Wellenfront* (F'_2) reduzieren sich um ca. 70% und 78% und zeigen eine monotone Konzentrationsabhängigkeit von Dexamethason.

Die *Dauer* (T_2) wird von 0.1 mM und 1 mM Dexamethason nicht beeinflusst. Ein signifikanter Effekt zeigt sich erst bei 3 mM. Die zweite Phase des IOS dauert in diesem Fall fast 2.24 Mal länger.

Die *Steigung des Abfalls* (R'_2) zeigt mit R'_1 ein ähnliches Verhalten: 0.1 mM und 1 mM Konzentrationen beeinflussen die R'_2 nicht, aber 3 mM reduziert R'_2 fast um 76%.

Die Parameter des statistischen Signifikanztestes sind in der Tabelle 3.2 präsentiert.

Tabelle 3.2: Statistische Signifikanz für die Experimente mit Dexamethason

Test	Gruppen	A_1	A_2	T_1	T_2	F'_1	F'_2	R'_1	R'_2
ANOVA	[Kontrolle]	<0.001	0.0018	0.0149	<0.001	<0.001	0.0014	0.002	<0.001
	[Dexamethason]	***	**	*	***	***	**	**	***

¹Die niedrigeren Konzentrationen haben einen größeren Einfluss auf das Signal als die höheren.

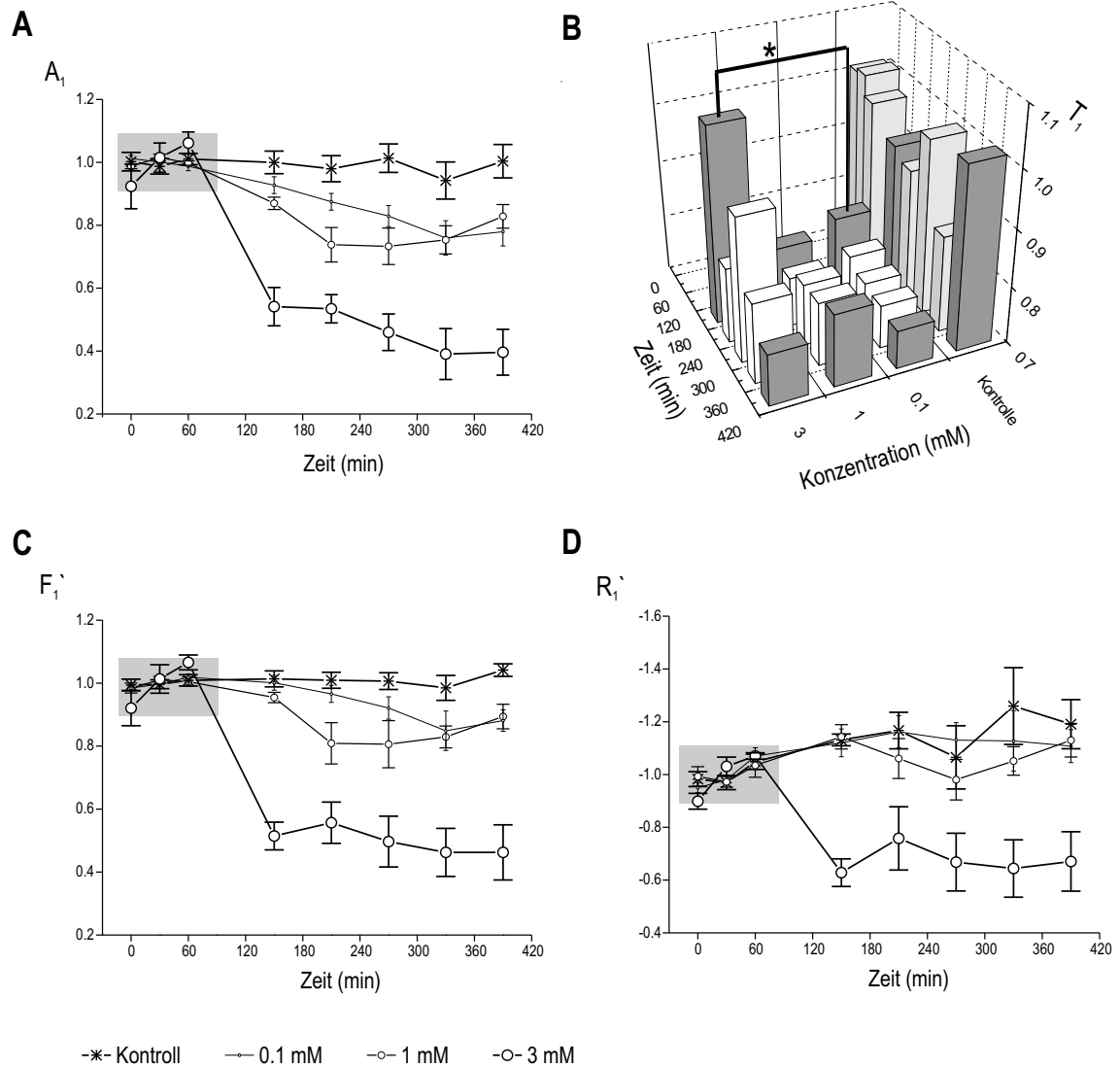


Abbildung 3.7: Parameter des IOS der *ersten Phase* in Anwesenheit von Dexamethason in der Ringer Lösung. Die *ersten drei Messpunkte* in jeder Serie der Experimente sind die Kontrollen ohne Dexamethason (das zeigt das graue Quadrat). Die Aufnahme des IOS wurde nach *60 min Perfusion* mit Dexamethason gemacht. In diesen Experimenten wurden *0.1, 1 und 3 mM* Konzentrationen des Dexamethason genommen. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. **A** - ist die Änderung der Amplitude (A_1). **B** - ist die 3D Präsentation der Änderung der Dauer (T_1). Zwischen den Messwerten der Dauer wurde nach einer Stunde Perfusion von 0.1 mM und 3 mM Dexamethason ein kurzer biphasischer Effekt von zwei konkurrierenden Mechanismen beobachtet (* - $p < 0.05$). **C** - ist die maximale Steigung der Wellenfront (F_1'). **D** - ist die maximale Steigung des Abfalls (R_1').

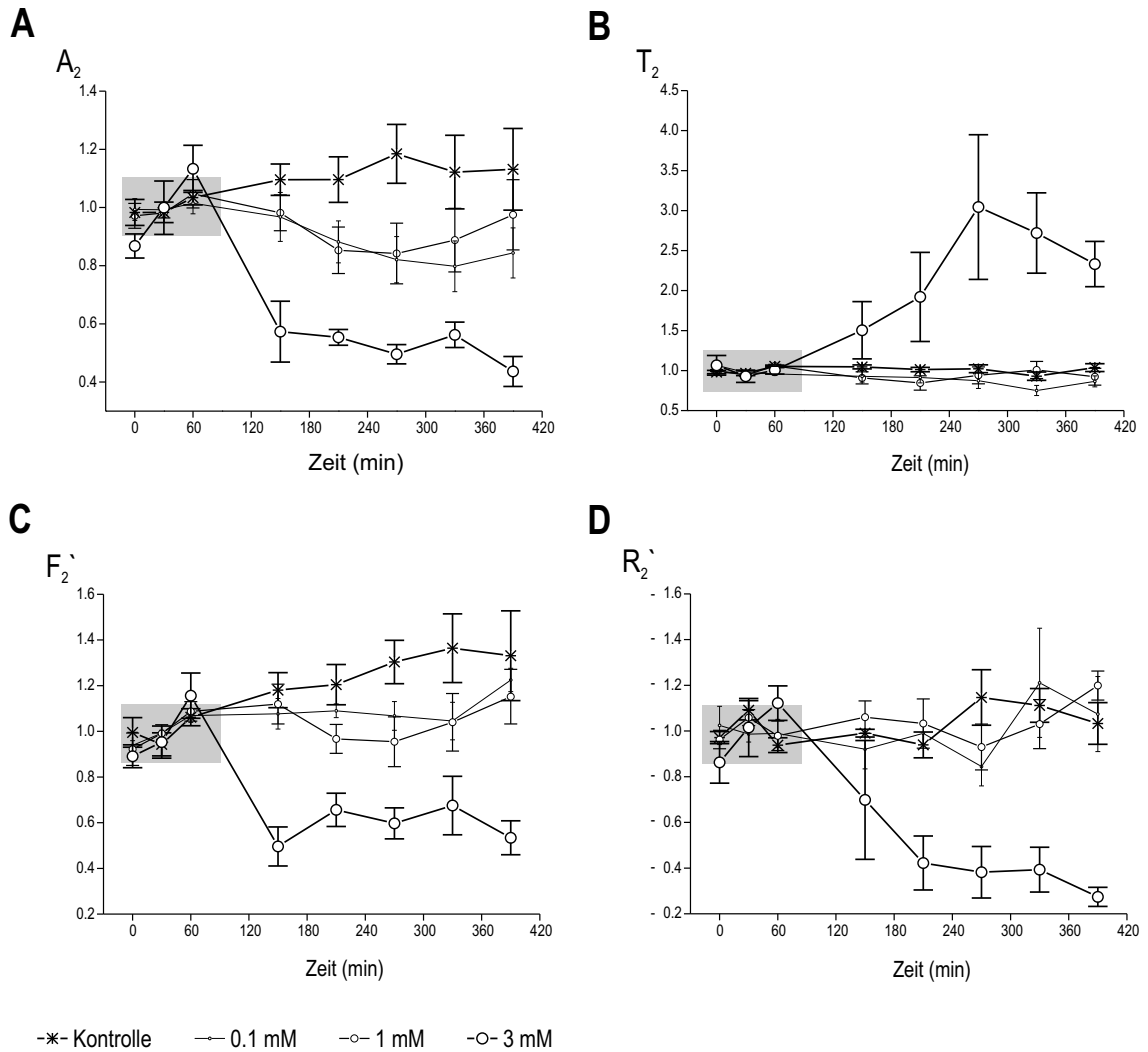
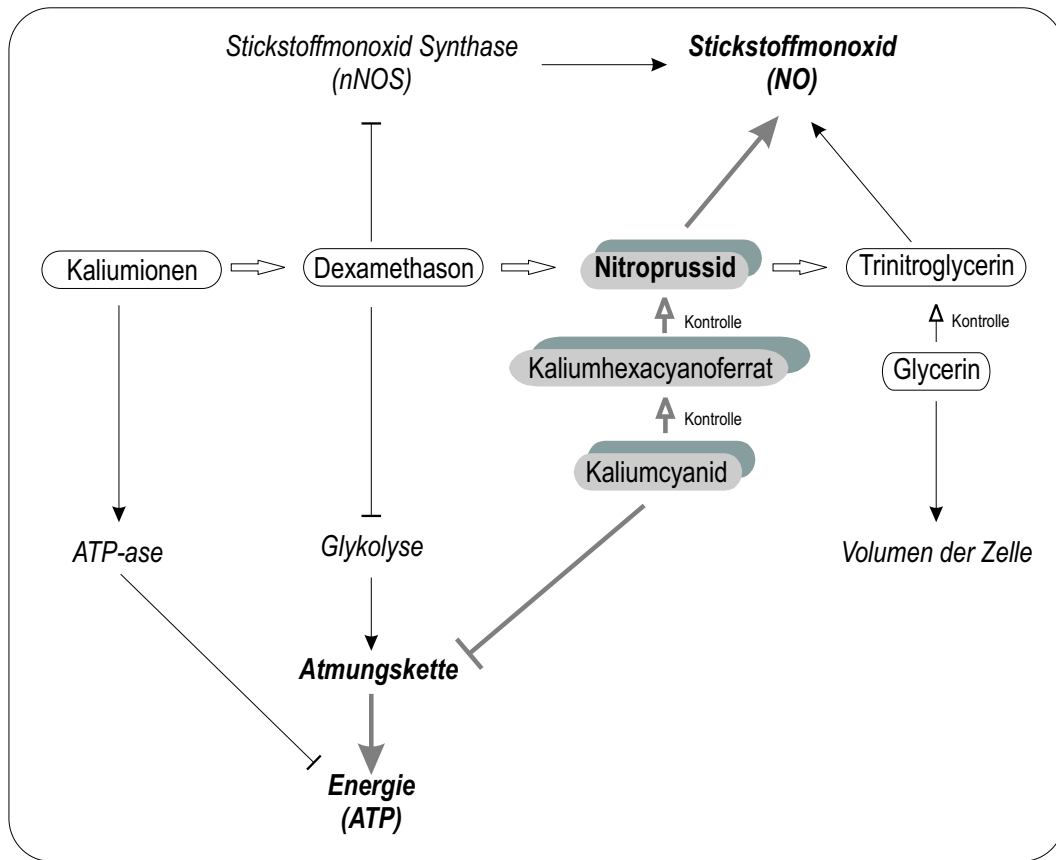


Abbildung 3.8: Parameter des IOS der *zweiten Phase* in Anwesenheit von Dexamethason in der Ringer Lösung. Die *ersten drei Messpunkte* in jeder Serie der Experimente sind die Kontrollen ohne Dexamethason (das zeigt das grauer Quadrat). Die Aufnahme des IOS wurde nach *60 min Perfusion* mit Dexamethason gemacht. In diesen Experimenten wurden *0.1, 1 und 3 mM* Konzentrationen des Dexamethason genommen. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. **A** - zeigt die Änderung der Amplitude (A_2). **B** - ist die Änderung der Dauer (T_2). **C** - ist die maximale Steigung der Wellenfront (F_2'). **D** - ist die maximale Steigung des Abfalls (R_2').

3.3 Einfluss des Nitroprussid auf das IOS



Dexamethason blockiert die Glykolyse unspezifisch. Es blockiert außerdem die *Stickstoffmonoxid Synthase* und als Folge reduziert sich die *NO* Konzentration in der Zelle. Das kann mehrere Prozesse beeinflussen, weil *NO* die Reaktionen, bei denen der *second messenger cGMP* synthetisiert wird, beeinflussen kann (siehe Abb. 4.3).

Deshalb kann man aus den bisherigen während der Experimente mit Dexamethason erhaltenen Ergebnisse nicht vorhersagen, welche der Effekte wirklich durch die Blockierung der Glykolyse beeinflusst wurden.

Um die Wirkung des *Stickstoffmonoxides* auf das IOS zu untersuchen, wurde als NO-Donor Nitroprussid-Natrium (siehe Kap. 2.3.2) verwendet.

Während der Dissoziation von Nitroprussid-Natrium entsteht im extrazellulär Raum *NO* und *Hexacyanoferrat*. *Hexacyanoferrat* kann selbst auch dissoziieren, in diesem Fall werden *cyanid* Ionen freigesetzt (siehe Kap. 2.3.2). Deshalb sind *Kaliumhexacyanoferrat* und *Kaliumcyanid* als Kontrolle für die Experimente mit *Nitroprussid-Natrium* verwendet worden.

Auf der Abbildung 3.9 sind die Änderungen aller Parameter des IOS nach der Drogenperfusion präsentiert. Die zeitliche Abhängigkeit der Substanzwirkung an allen IOS Parametern während dieser Experimente ist im Anhang B präsentiert.

3.3.1 Erste Phase

Die erste Phase des IOS wird stark von der NO Erhöhung beeinflusst. Die niedrigste verwendete Konzentration des Nitroprussid-Natrium (0.01 mM) reduziert die Amplitude (A_1) um ca. 45%, die *maximale* Steigung der Front (F'_1) um ca. 52% und die *maximale* Steigung des Abfalls (R'_1) um ca. 54%. Die Dauer der ersten Phase (T_1) ist unabhängig von der Konzentration des Nitroprussid-Natrium. Ein signifikanter Effekt wurde erst in Anwesenheit von 0.1 mM beobachtet.

Die höheren Konzentrationen des Nitroprussid-Natrium hatten zwar eine Wirkung auf das optische Profil, aber die Kontrollexperimente mit Kaliumhexacyanoferrat und Kaliumcyanid zeigen, dass diese Drogen ähnlich wie Nitroprussid auf das IOS wirken. Deshalb kann man sagen, dass die beobachteten Änderungen kein NO Effekt sind.

Parameter A_1 , F'_1 und R'_1 zeigen eine Tendenz zu einem bi-phasischen Effekt zwischen 0.1, 0.25 und 1 mM Nitroprussid-Natrium.

3.3.2 Zweite Phase

Die Parameter der zweiten Phase zeigen ein ähnliches Verhalten wie bei der ersten Phase in Anwesenheit von höheren NO-Konzentrationen in der Zelle. Die Amplitude (A_2) ist um ca. 77% und die Steigung der Front (F'_2) um ca. 95% reduziert. Die Dauer (T_2) ist unabhängig von allen drei benutzten Drogen, obwohl die Steigung des Abfalls (R'_2) in Anwesenheit von 0.01 mM Nitroprussid-Natrium um ca. 45% reduziert ist und verglichen zur Kontrolle eine signifikante Differenz zeigt. Ein Unterschied zwischen 0.01 mM Nitroprussid-Natrium und Kaliumhexacyanoferrat existiert nicht. Deshalb kann die R'_2 Reduzierung nicht durch die NO Erhöhung erklärt werden, sondern durch die Gegenwart der Hexacyanoferrat Ionen.

Die Parameter A_2 und R'_2 zeigen einen signifikanten bi-phasischen Effekt zwischen 0.1, 0.25 und 1 mM Nitroprussid-Natrium. F'_2 zeigt keine signifikante Differenz zwischen diesen Gruppen.

3.3.3 Kaliumcyanid als Kontrolle

Kaliumcyanid wurde als die Kontrolle für Nitroprussid-Natrium genommen. Darüber hinaus ist die Wirkung der *Cyanid* Ionen auf das IOS an sich sehr interessant zu untersuchen. CN^- blockiert sehr spezifisch die ATP-Synthese durch die Blockierung des Elektronentransferes zwischen *Cytochromoxidase* und O_2 in den Mitochondrien.

Es ist merkwürdig, dass *KCN* eine Wirkung nur auf zwei Parameter der ersten Phase hat. In Anwesenheit von 1 mM *KCN* ist die Dauer der ersten Phase (T_1) um 63% länger und die *maximale* Steigung des Abfalls um 44% reduziert. Kleinere Konzentrationen haben keinen Effekt auf das IOS der SD-Welle.

Der Einfluss des Kaliumcyanid auf das IOS der zweiten Phase ist nicht so ausgeprägt verglichen mit dem Effekt der ersten Phase. Nach 2 Stunden *KCN* Perfusion wurde keine statistisch signifikante Differenz in den IOS Parametern gefunden. Während des Experimentes im Zeitintervall zwischen 0.5 und 1.5 Stunden Perfusion erhöht sich die Amplitude fast um 34%. Die Dauer erhöht sich während dieser Zeit, aber ein signifikante Effekt (um 52%) wird erst nach 1,5 Stunden Cyanid Perfusion erreicht (siehe Anhang B).

In der Tabelle 3.3 sind die Parameter des Signifikanztestes präsentiert. Die Anzahl der Experimente ist, abhängig von der Gruppe, zwischen 4 und 6.

Tabelle 3.3: Statistische Signifikanz für die Experimente mit Nitroprussid-Natrium, Kaliumhexacyanoferrat und Kaliumcyanid

<i>Test</i>	<i>[Gruppen: mM]</i>	A_1	T_1	F'_1	R'_1	A_2	T_2	F'_2	R'_2
t-test	[Kontrolle]	0.023	> 0.05	0.0127	0.0085	0.0032	> 0.05	0.001	0.011
	[Nitroprussid: 0.01]	*		*	**	**		***	*
t-test	[Nitroprussid: 0.01]	0.0036	> 0.05	0.0012	0.0028	0.0103	> 0.05	0.0084	> 0.05
	[Hexacyanoferrat: 0.01]	**		**	**	*		**	
ANOVA	[Kontrolle]	> 0.05	0.001	> 0.05	0.0014	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
	[KCN: 0.01; 0.1; 1]		***		**				
t-test	[Kontrolle]	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	0.046	0.0028	> 0.05	> 0.05
	[KCN: 1 , nach 1h]					*	**		
ANOVA	[Nitroprussid:	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	0.0097	> 0.05	> 0.05	0.0257
	0.1; 0.25; 1]					**			*

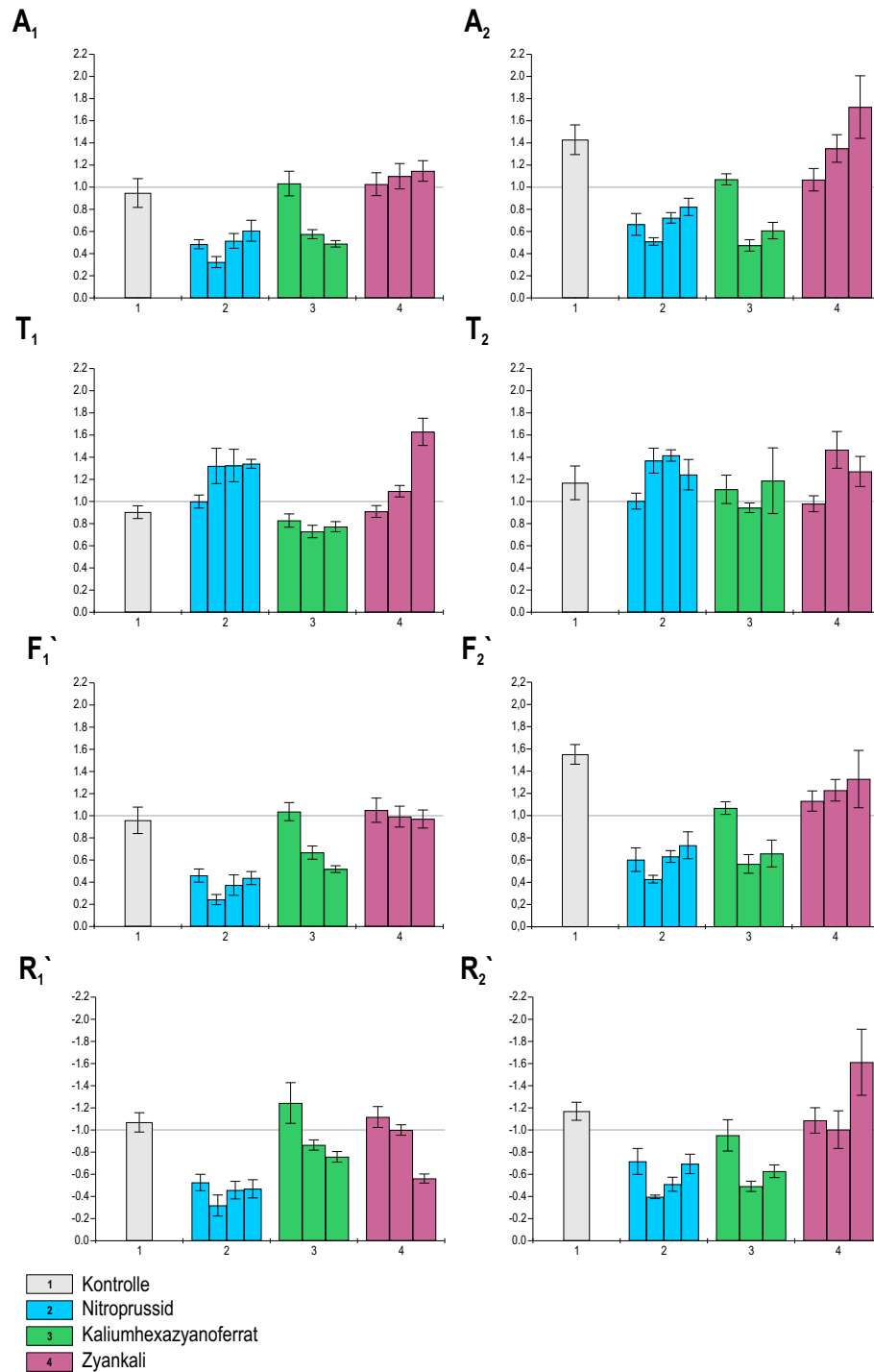
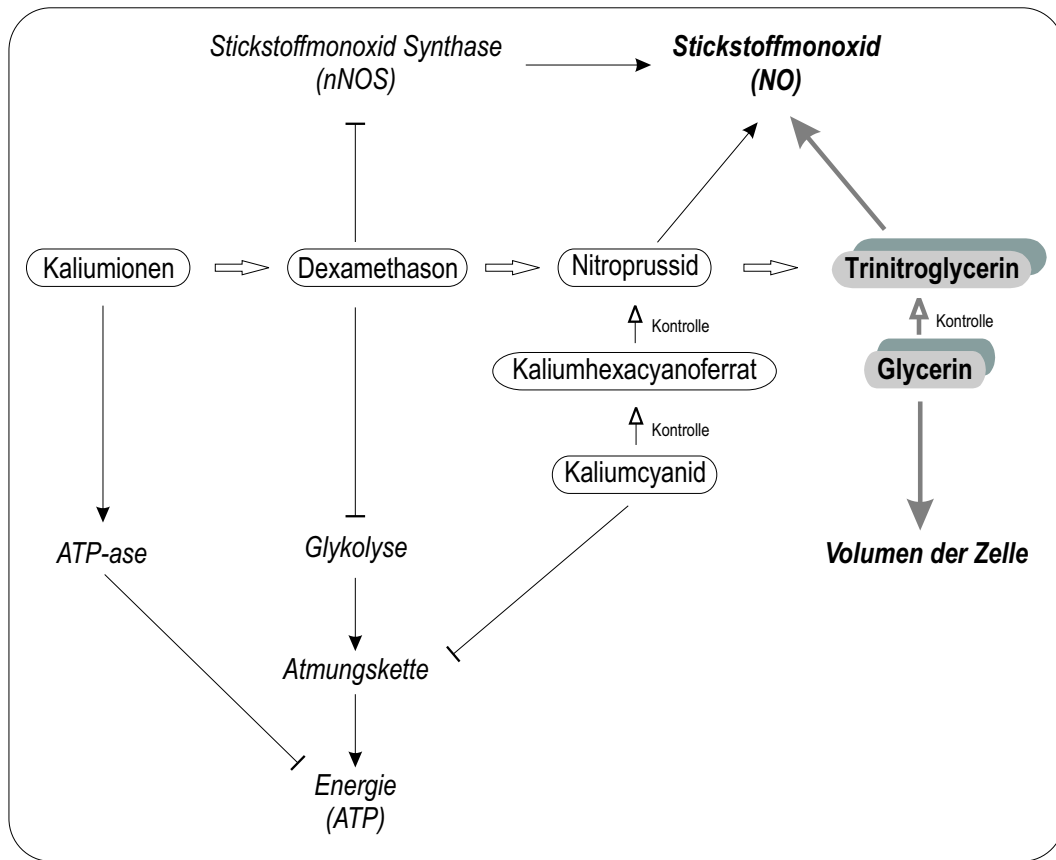


Abbildung 3.9: Parameter des IOS nach 2.5 Stunden Drogenperfusion sind dargestellt. Folgende Konzentrationen wurden genommen: *Nitroprussid-Natrium* - 0.01, 0.1, 0.25, 1 mM, *Kaliumhexacyanoferat*, *Kaliumcyanid* - 0.01, 0.1, 1mM. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. A_1 - Amplitude der ersten Phase, A_2 - Amplitude der zweiten Phase, T_1 - Dauer der ersten Phase, T_2 - Dauer der zweiten Phase, F'_1 - maximale Steigung der Front der ersten Phase, F'_2 - Steigung der Front der zweiten Phase, R'_1 - maximale Steigung des Abfalls der ersten Phase, R'_2 - Steigung des Abfalls der zweiten Phase.

3.4 Einfluss des Trinitroglycerin auf das IOS



Trinitroglycerin (siehe Kap. 2.3.2) ist ebenfalls ein *Stickstoffmonooxid Donor* und verglichen mit *Nitroprussid-Natrium* spezifischer. *Trinitroglycerin* Lösung hat aber zwei Nachteile:

- es ist schlecht wasserlöslich,
- es ist eine Alkohollösung (evtl. kann Alkohol selbst das IOS beeinflussen [UdLH95]).

3.4.1 Einfluss auf das gesamte IOS

Trinitroglycerin hat einen Einfluss auf die erste und zweite Phase des IOS. Es ist interessant, dass weder die Dauer der ersten (T_1) noch die Dauer der zweiten (T_2) Phase beeinflusst werden (siehe Abb. 3.10).

Die Amplitude (A_1), die *maximale* Steigung (F'_1) der Front und des Abfalls (R'_1) der ersten Phase sind um ca. 26% reduziert.

Die Amplitude (A_2) und die Steigung (F'_2) der Front der zweiten Phase sind um ca. 70% reduziert. Die Steigung des Abfalls der zweiten Phase (R'_2) ist um ca. 30% reduziert.

Nach der Dissoziation des Trinitroglycerin entsteht im extrazellulär Raum Glycerin. Glycerin ist osmotisch aktiv, und dadurch kann es das Volumen der Zellen beeinflussen, aber in der verwendeten Konzentrationen hat es keinen Einfluss auf das IOS. Effekte treten erst nach Perfusion mit mehr als 10-fach größeren Glycerinkonzentrationen auf, die aber nicht physiologisch sind und deshalb hier nicht präsentiert wurden.

In der Tabelle 3.4 sind die Parameter des Signifikanztestes präsentiert. Die Anzahl der Experimente ist, abhängig von der Gruppe, zwischen 4 und 6. Die zeitliche Abhängigkeit der Substanzwirkung an allen IOS Parametern während dieser Experimente ist im Anhang B präsentiert.

Tabelle 3.4: Statistische Signifikanz für die Experimente mit Trinitroglycerin

<i>Test</i>	<i>Gruppen</i>	A_1	A_2	T_1	T_2	F'_1	F'_2	R'_1	R'_2
t-Test	[Kontrolle][Trinitro- glycerin 200 μ M]	0.0473 *	0.0022 **	> 0.05	> 0.05	0.0439 *	0.0002 ***	0.0174 *	0.0409 *

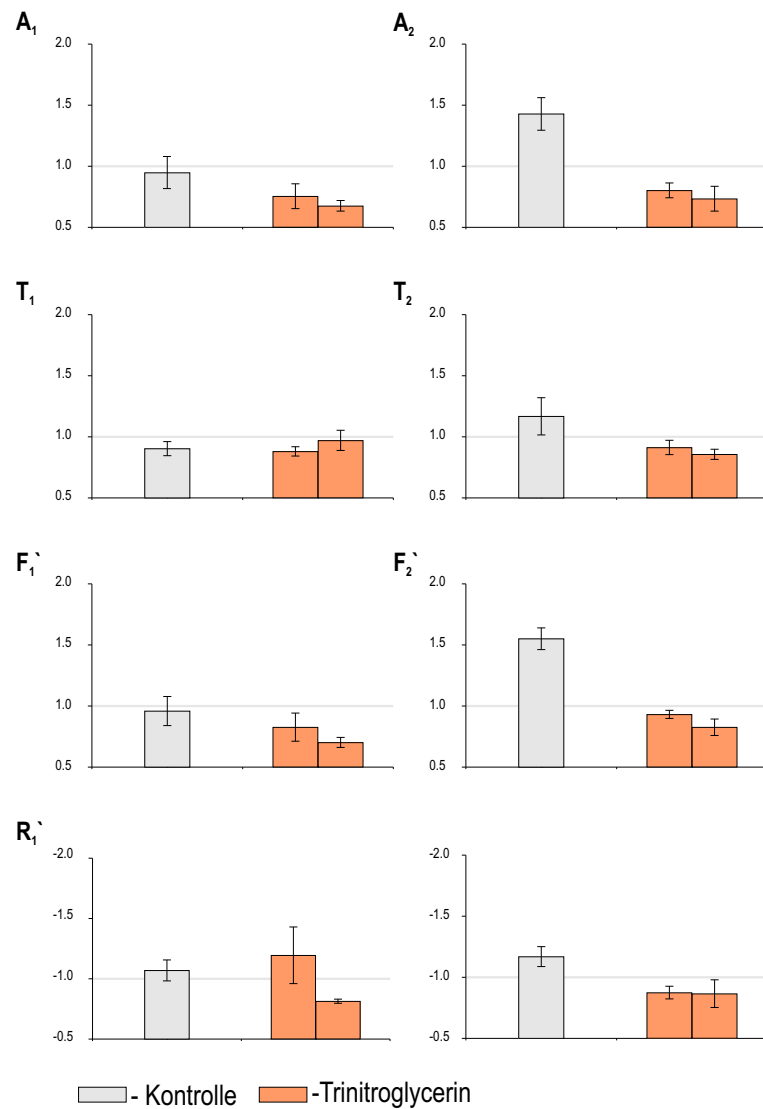


Abbildung 3.10: Die Parameter des IOS nach 2.5 Stunden Perfusion mit Trinitroglycerin sind dargestellt. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 32 μ M und 200 μ M. Darstellung der Messpunkte $\pm$ SEM. A_1 - Amplitude der ersten Phase, A_2 - Amplitude der zweiten Phase, T_1 - Dauer der ersten Phase, T_2 - Dauer der zweiten Phase, F_1' - maximale Steigung der Front der ersten Phase, F_2' - Steigung der Front der zweiten Phase, R_1' - maximale Steigung des Abfalls der ersten Phase, R_2' - Steigung des Abfalls der zweiten Phase.

Kapitel 4

Diskussion

Spreading Depression ist ein Phänomen, das als Antwort des neuronalen Gewebes auf einen pathologischen Stimulus betrachtet werden kann. Das bedeutet, dass diese Welle im Gewebe sowohl durch externe, als auch durch interne pathophysiologische Störungen auftreten kann.

SD-Wellen haben neben anderen Begleiterscheinungen besonderes in retinalem Gewebe ein ausgeprägtes IOS, welches die Eigenschaften und Veränderungen des Gewebes widerspiegelt. Das optische Signal einer SD-Welle hat zwei Phasen: eine erste (frühere), kurz anhaltende und eine zweite (spätere), lang anhaltende Phase. Die während der ersten Phase statt findenden Prozesse sind relativ genau untersucht und u.a. mit elektrophysiologischen Änderungen in den Zellen verbunden [SAC⁺91]. Das *Ziel dieser Arbeit* war die Prozesse während der zweiten Phase der SD-Welle zu untersuchen. Als Werkzeug für diese Untersuchung wurde das intrinsische optische Signal genommen, weil diese Phase der SD-Welle nicht mit elektrophysiologischer Registrierung messbar ist. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die das optische Profil einer SD-Welle vollständig charakterisiert.

4.1 SD und Zelltod

In der Literatur wurde schon länger diskutiert ob die SD-Welle Zelltod verursachen kann [OA98], [NH88]. Solche Fakten wie die Freisetzung des Glutamates und die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, die während der SD-Ausbreitung stattfin-

den, sprechen dafür [RDR99]. Auch wenn spontane Läsionen in der Retina erscheinen, wurde SD als vom Rand der Läsion propagierende Wellenfront beobachtet [dLH99].

Hohe Frequenz und hohe Anzahl spontaner SD-Wellen verursachen keine Läsionen (siehe Kap. 3.1.4). Erst wenn der Zeitabstand zwischen den zwei SD-Wellen kürzer als die Dauer der zweiten Phase der vorhergehenden Welle ist, führt dies nach einiger Zeit zum Zelltod.

Das bedeutet, dass während der zweiten Phase des IOS die Prozesse ablaufen, die für das Überleben des neuronalen Gewebes notwendig sind.

Die SD-Welle wurde vor mehr als 50 Jahren entdeckt, aber bis jetzt gibt es keine Erklärung, welche Prozesse während der zweiten Phase des IOS aktiviert werden und wie sie das IOS der Retina beeinflussen können. Die Theorie, die weiter unten dargestellt wird, schlägt mindestens einen Mechanismus, der während der zweiten Phase des IOS stattfindet, vor.

4.2 Änderungen der $[K^+]_R$ beeinflussen den zellulären Energiebedarf während der SD

Welche Reaktionen können so eine wichtige Rolle während der zweiten Phase des IOS spielen, dass sie sogar die Lebensdauer des neuronalen Gewebes beeinflussen können? Es wurde schon gezeigt, dass die SD-Welle keine irreversiblen Störungen verursacht, wenn der Metabolismus der Zellen nicht gefährdet ist, das findet z.B. während der Migräne-Aura statt [OA98]. Die Situation kann aber gefährlich werden, wenn die Welle sich in einem Gewebe ausbreitet, das unter anoxischen oder ischemischen Bedingungen leidet.

Um die *Hauptthese*, die hier überprüft wird, zu formulieren, muss man wiederholen:

- Am Anfang der SD-Welle sind Neuronen und Glia Zellen teilweise depolarisiert.
- Während der Depolarisation wurde eine Umverteilung der Ionen beobachtet.
- Die Aktivität der ATPase ist erhöht.

- Das elektrische Signal der Welle hat nur eine Phase und der maximaler Wert des elektrischen Signals ist synchron mit der maximalen Steigung des optischen Profils der ersten Phase.
- Am Anfang der zweiten Phase des optischen Signals sind alle Ionen Gradienten wiederhergestellt.

Die Haupthypothese dieser Arbeit lautet: Nach Ausbreitung der SD-Welle haben die Zellen des neuronalen Gewebes einen Energiemangel, weil die Energie für die Wiederherstellung der Ionengradienten verbraucht wird. Deshalb spiegelt die zweite Phase des optischen Profils die metabolischen Reaktionen, die die Zellen (Glia und/oder Neuronen) mit fehlender Energie versorgen, wieder.

4.2.1 Mit Erhöhung der $[K^+]_R$ verschwindet die zweite Phase des IOS

Im Kapitel 3.1 sind die Experimente, bei denen die $[K^+]_R$ erhöht, bzw. reduziert wird, beschrieben. Dabei wurden die spontanen SD-Wellen und deren optische Profile systematisch bei jeder $[K^+]_R$ charakterisiert. Ein überraschendes Ergebnis war, dass je höher K^+ im extrazellulär Raum ist, desto kleiner wird die Amplitude und desto kürzer die Dauer der zweiten Phase. Ab $[K^+]_R=14$ mM ist bei den SD-Wellen keine zweite Phase mehr zu beobachten. Im Gegensatz zur zweiten Phase ist die erste Phase des IOS unabhängig von der $[K^+]_R$. Das IOS während der SD-Wellen Ausbreitung spiegelt hauptsächlich Volumenänderungen der Zellen wieder. Bis jetzt sind keine weiteren physiologischen Prozesse, die das IOS so lang verändern können, bekannt (siehe Kap. 1.6). Daraus folgt, dass die Volumenänderungen (welche genau ist nicht bekannt) während der zweiten Phase abhängig von der $[K^+]_R$ sind. Weiter wird die Frage beantwortet, was können die höheren $[K^+]_o$ während einer SD-Ausbreitung bewirken?

Erhöhung der $[K^+]_R$ reduziert die Treibkraft für K^+ .

Die physiologische K^+ Konzentration im extrazellulären Raum ($[K^+]_o$) ist zwischen 3-5 mM und im intrazellulären Raum ($[K^+]_i$) ca. 140 mM [Han77], [Han78], [LN73].

Die Erhöhung der $[K^+]_R$ reduziert die Treibkraft für K^+ . Für idealisierte Bedingungen kann man das mit der Nernst-Gleichung¹ zeigen:

$$E_{[K^+ - low]} = \frac{58 \text{ mV}}{1} \log \frac{[1]_o}{[140]_i} = -124.48 \text{ mV};$$

$$E_{[K^+ - high]} = \frac{58 \text{ mV}}{1} \log \frac{[20]_o}{[140]_i} = -49.02 \text{ mV};$$

in der $[1]_o$ und $[20]_o$ ist die experimentelle $[K^+]_R$ und $[140]_i$ ist die K^+ Konzentration im intrazellulären Raum.

Funktionen der ATPasen während der ersten Phase des IOS

Am Anfang der ersten Phase des IOS findet die Umverteilung der Ionen statt. Dieser Prozess ist auch mit elektrischen Messungen bestätigt [dLH97]. K^+ fließt raus Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Wasser fließen in die Zellen hinein [SAC⁺91]. Am Ende der ersten Phase des IOS sind alle Ionengradienten wiederhergestellt [dLST⁺93]. Daraus folgt eine Aktivierung der ATPase, um die Ionengradienten in einen physiologischen Zustand zu bringen. Für diese Arbeit verbrauchen ATPasen Energie (ATP).

Mögliche Mechanismen für die Wiederherstellung des K^+ Gradienten

Bei der SD-Ausbreitung (während der ersten Phase) wird die $[K^+]_o$ bis 40-50 mM erhöht [STN75]. Deshalb müssen Mechanismen, die K^+ aus dem extrazellulären Raum entfernen, aktiviert werden. Bis heute sind drei solcher Hauptmechanismen gefunden:

- Diffusion,
- Aktive Aufnahme durch Neuronen und Gliazellen (ATPase),

¹Die Nernst-Gleichung rechnet das Gleichgewichtspotential für jedes Ion. Die allgemeine Formel ist: $E_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_i}{[X]_o}$, in der R - die Gaskonstante, T - die Temperatur (Kelvingrad), z - die Valenz, F - die Faradaykonstante ist und $[X]_i$ und $[X]_o$ die Konzentrationen der Ionen im extra- und intrazellulären Raum sind. Bei einer Temperatur von 25°C ist $\frac{RT}{F} = 25 \text{ mV}$ und mit der Verarbeitungskonstante, die zwischen $\log$ und $\ln$ gleich 2.3 ist, kann die Nernst-Gleichung auch als $E_X = \frac{58 \text{ mV}}{z} \log \frac{[X]_i}{[X]_o}$ geschrieben werden.

- Passive Aufnahme durch Gliazellen [KR95].

Die Geschwindigkeit mit der das K^+ aus dem extrazellulären Raum entfernt wird, ist schneller, als das nur mit Diffusion erreicht werden könnte. Wenn die $[K^+]_o$ höher als ca. 10 mM (ceiling level) ist, spielt der aktive up-take durch ATPasen keine Rolle mehr, aber der passive up-take durch Glia Zellen (spatial buffering) [XS00]. Während der Experimente kann die $[K^+]_o$ nicht niedriger als die $[K^+]_R$ sein. Wenn die $[K^+]_R$ größer als 10 mM ist, wird deshalb K^+ hauptsächlich durch den passiven up-take der Glia von den Zellen aufgenommen. Das bedeutet auch, dass unter solchen Bedingungen weder Neuronen noch Gliazellen zusätzlichen Energiebedarf haben. Für die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Gradienten in Gegenwart von $[K^+]_R < 10$ mM wird K^+ durch aktiven up-take in die Zellen (Neuronen und Glia) zurück gepumpt, was auch eine Erhöhung der ATPase Aktivität und des Energiebedarfs bedeutet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die zweite Phase des IOS den Level der ATPasen Aktivität und des ATP-Spiegels während der SD-Ausbreitung reflektiert. Bei höheren $[K^+]_R$ wird K^+ mit Hilfe des spatial buffering in die Gliazellen transportiert. Bei niedrigen $[K^+]_R$ wird die Treibkraft für K^+ erhöht und die Zellen stellen nur durch ATPase Aktivität den K^+ Gradient wieder her.

4.2.2 Offene Frage

Die im Kapitel 3.1.2 beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Depolarisation, die durch eine Erhöhung der $[K^+]_R$ erreicht wurde und die Hyperpolarisation, die durch Reduzierung der $[K^+]_R$ erreicht wurde, die Frequenz der spontanen SD-Wellen erhöhen. Es ist bekannt, dass Depolarisationsagentien wie z.B. Kalium [SAC⁺91] und Glutamat [Par98] SD-Wellen auslösen, aber warum die Hyperpolarisation der Membranen einen ähnlichen Effekt hat, ist noch nicht klar und muss weiter untersucht werden.

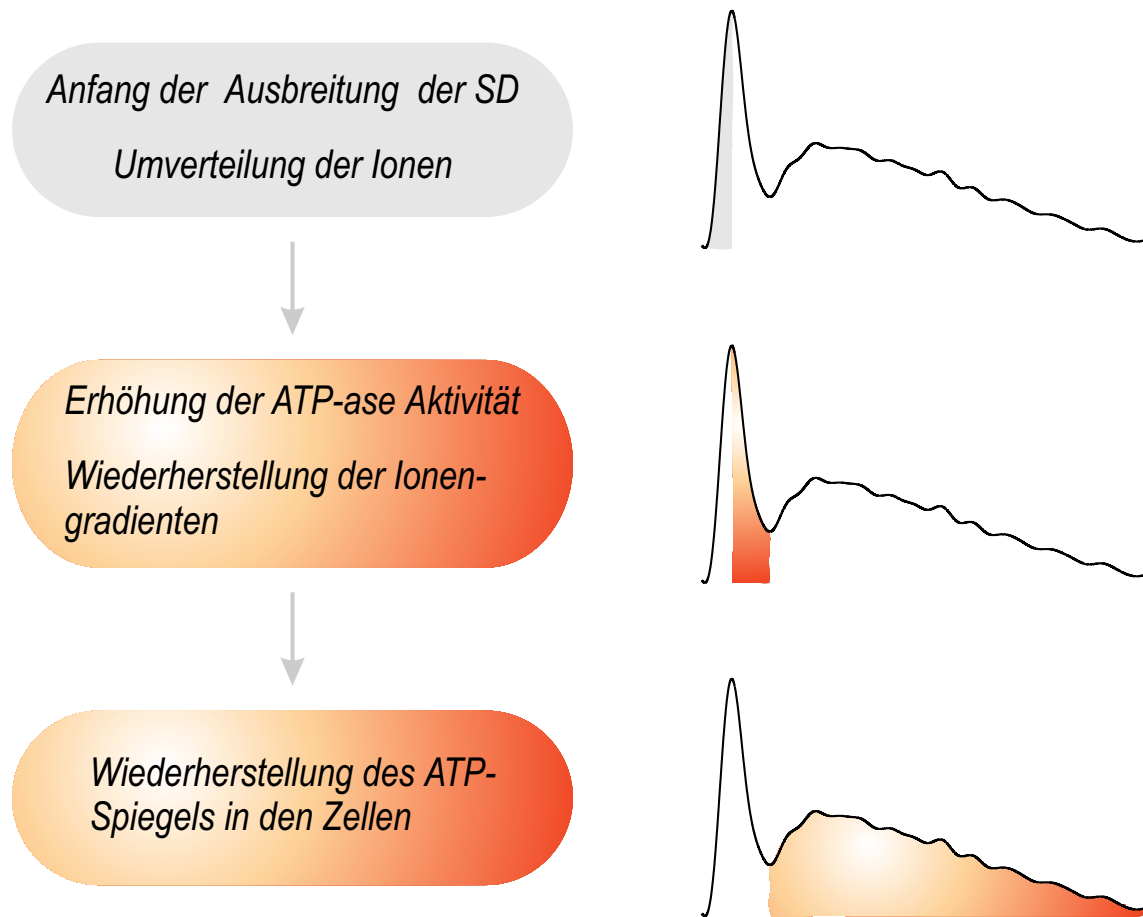


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der elektrophysiologischen und metabolischen Prozesses während der SD-Ausbreitung im IOS.

4.3 Mögliche Energiequellen während und nach der SD-Ausbreitung

Wie oben diskutiert führt eine Umverteilung der Ionen zu erhöhter ATPase Aktivität, die die Na^+/K^+ Gradienten während der ersten Phase des IOS wiederherstellt. Der Level dieser Aktivität (oder die Menge der verbrauchten Energie) während der ersten Phase beeinflusst die Größe der zweiten Phase des IOS. Daraus folgt, dass während der zweiten Phase des IOS die metabolischen Prozesse, die die Zellen mit Energie versorgen, ablaufen (siehe Abb. 4.1). Welche Reaktionen können während und nach der SD-Ausbreitung in den Zellen (Neuronen und Glia) diese Funktion erfüllen?

Der Energiestoffwechsel der Netzhaut ist dem des Gehirns in vielen Punkten außerordentlich ähnlich, z.B die fast absolute Glukoseabhängigkeit [Rei99]. Allgemein pro-

duzieren folgende biochemische Pfade im Gehirn energiereiche Moleküle (ATP, GTP, NADH): Glykolyse (Abbau von Glukose/Glykogen zu Pyruvat), Cytratzyklus und oxidative Phosphorylierung (Abbau von Pyruvat/Laktat zu CO_2 und H_2O).

4.3.1 Energiestoffwechsel der Gliazellen und Neuronen

Um die Ergebnisse weiter zu erklären, werden die Besonderheiten des Energiestoffwechsels der Neuronen und Glia Zellen kurz erklärt.

- **Müller Zellen**² gewinnen ihre Energie fast ausschließlich über die Glykolyse. Sie besitzen nur relativ wenige Mitochondrien, deren Enzyme für die oxidative Phosphorylierung notwendig sind. Selbst bei ausreichendem Sauerstoffangebot ist ihr oxidativer Stoffwechselanteil gering. Das hat zur Folge, dass Müllerzellen einen relativ hohen Glukosebedarf haben. Die Glykolyse ist aber nicht effizient, es werden nur zwei Mol ATP pro ein Mol Glukose produziert. Andererseits sind die Müllerzellen unabhängig von der Sauerstoffversorgung [Rei99].
- **Neuronen** sind auf einen funktionierenden Cytratzyklus angewiesen. Sie gewinnen Pyruvat nicht oder nicht hauptsächlich durch eigene Glykolyse, dieser Bedarf wird durch Müllerzellen gedeckt. Diese produzieren in ihrem glykolytischen Stoffwechsel reichlich Laktat, das in den extrazellulären Raum freigesetzt, dort von Neuronen aufgenommen und in Pyruvat umgewandelt wird. Dieser oxidative Pfad ist viel effizienter als die Glykolyse und produziert 34 Mol ATP pro ein Mol Laktat (siehe Abb. 4.2) [Rei99].

4.3.2 Substanzen, die den Stoffwechsel beeinflussen, verändern auch das IOS

Dexamethason

Dexamethasone blockiert den ersten Schritt im Energiestoffwechsel, den Glukosetransport in die Zelle und reduziert außerdem den NO-Spiegel in der Zelle.

²Das sind die retinalen Gliazellen

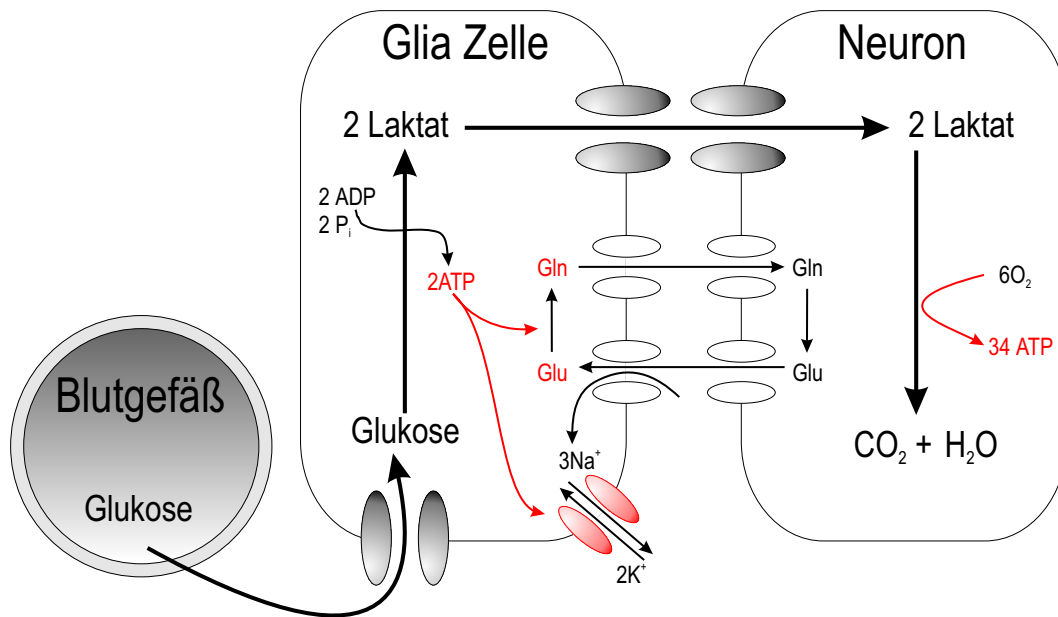


Abbildung 4.2: Darstellung des Mechanismus, durch den der Energiestoffwechsel und die synaptische Aktivität der Neuronen mit den Müller Zellen gekoppelt ist. Glukose wird aus den Blutgefäßen in die Gliazellen transportiert und zu Pyruvat abgebaut. Dabei entstehen zwei Mol ATP. Ein Mol ATP wird für die in den Gliazellen stattfindende Umwandlung von Glutamat (*Glu*) in Glutamin (*Gln*) benutzt. Glutamat wird mit drei Mol Na⁺ in die Zelle co-transportiert. Das verbleibende ein Mol ATP wird deshalb für die ATPase Arbeit, die drei Mol Na⁺ raus aus der Zelle und zwei Mol K⁺ in die Zelle pumpt, benötigt [SHR01].

Zusammenfassung der Ergebnisse (siehe Kap.3.2 und Kap. 3.3): Die Analyse der optischen Profile der SD-Wellen hat gezeigt, dass Dexamethason alle Parameter des IOS verändert, aber nur zwei davon (T_1 und T_2) werden nicht durch Nitroprussid und die entsprechenden Kontrollen (Kaliumhexacyanoferrat und Kaliumcyanid) beeinflusst. Daraus folgt, dass die Dauer der ersten Phase und die Dauer der zweiten Phase vom Glukosetransport abhängig sind.

Mit der Hypothese, dass während der zweiten Phase der Energiestoffwechsel aktiviert wird, kann die Verlängerung der zweiten Phase unter Dexamethason Applikation erklärt werden. Nach der Blockierung des Glukosetransports brauchen die Gliazellen und/oder Neuronen längere Zeit um den Mangel an ATP in den Zellen zu decken, weil die Glukose das einzige energieliefernde Substrat im Gehirn ist. Ein überraschendes Ergebnis war die Glukoseabhängigkeit der Dauer der ersten Phase (T_1 wird kürzer).

Es ist möglich, dass mit der Blockierung des Glukosetransports in die Zelle die Osmolarität reduziert wird. Daraus folgt, dass das Wasser in den extrazellulären Raum fließt und die Zellen schrumpfen. Diese Schlussfolgerung muss aber noch überprüft werden, weil es nicht auszuschließen ist, dass Dexamethason noch einen unbekannten Effekt auf den Stoffwechsel hat.

Kaliumcyanid

Kaliumcyanid blockiert sehr spezifisch die ATP-Synthese durch die Blockierung des Elektronentransfers zwischen *Cytochromoxidase* und O_2 in den Mitochondrien. Es beeinflusst das IOS der SD-Welle durch Verlängerung der Dauer und Reduzierung der maximalen Steigung des Abfalls der ersten Phase. Insgesamt wird die erste Phase des IOS dadurch langsamer. Folglich verändert KCN den späteren Teil der ersten Phase, in der die erhöhte ATPase Aktivität erwartet wurde. Daraus folgt:

1. Die erste Phase ist ATP-abhängig.
2. Dieser ATP-Bedarf besteht während des späteren Teils der ersten Phase.
3. ATP wird von ATPase benutzt, die die Ionengradienten während dieser Zeit wiederherstellen.
4. An diesem Prozess sind die Neuronen beteiligt, weil die durch KCN blockierten biochemischen Reaktionen hauptsächlich in den Neuronen statt finden.

Die zweite Phase des IOS wird durch KCN auch langsamer. Die Dauer wird länger und die Amplitude größer. Das bedeutet, dass für diese Phase eine normal funktionierende oxidative Phosphorylierung wichtig ist.

Es muss aber betont werden, dass die Effekte, die KCN während der SD-Welle verursacht, nicht so groß waren wie erwartet, möglicherweise weil die Glykolyse an sich auch eine wichtige Rolle spielt.

4.4 Stickstoffmonoxid und Spreading Depression

4.4.1 Funktionen des NO im ZNS

NO ist ein kurzlebiger (ca. 3-4 s) Mediator u.a. im ZNS. Dieses Gas aktiviert in Neuronen die lösliche Guanylylcyclase, und es führt zur cGMP Produktion. cGMP hat drei mögliche Ziele: Proteinkinasen, die phosphoryliert oder dephosphoryliert werden, Phosphodiesterasen, Enzyme, die die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide katalysieren und Ionenkanäle [Vin94]. Folglich beeinflusst NO auch die $[Ca^{2+}]_i$. Diese 'physiologische' Kontrolle findet bei niedrigen (ca. 0.1 μ M) NO Konzentrationen statt [RDR99].

NO in höheren Konzentrationen (1-10 μ M) reagiert mit Superoxid Anionen (O_2^-) und dabei entstehen Peroxynitrit Anionen ($ONOO^-$). Diese reagieren mit verschiedenen zellulären Molekülen, einschließlich Membranlipiden, Proteinen und DNA. Diese Prozesse finden während neuronaler Excitotoxizität statt [RDR99].

4.4.2 Abhängigkeit des IOS von NO

Insgesamt drei pharmakologische Substanzen, die während der SD-Ausbreitung verwendet wurden, um den Stoffwechsel zu beeinflussen, ändern die NO Konzentration in den Zellen. Dexamethason blockiert die Stickstoffmonoxide Synthase (NOS), und als Folge reduziert sich die NO Menge im intrazellulären Raum (siehe Abb. 4.3). Nitroprussid-Natrium und Trinitroglycerin sind NO-Donoren und erhöhen die NO Konzentration in den Zellen. Nachfolgend werden die Effekte der höheren bzw. niedrigen NO Konzentrationen auf das IOS zusammengefasst.

Mit der in dieser Arbeit entwickelte Methode, die das IOS Signal vollständig charakterisiert, lässt sich genau bestimmen, auf welchen Teil vom IOS das NO einen Effekt hat.

Höhere NO Konzentrationen, die während Nitroprussid-Natrium und Trinitroglycerin Applikation erhalten wurden, beeinflussen beide Phasen des IOS durch Reduzierung der Amplitude, der maximalen Steigung der Front und der Steigung des Abfalls. Die Dauer der ersten und der zweiten Phasen wird nicht beeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass diese Parameter NO unabhängig sind. Es muss betont werden, dass die höheren Konzentrationen (ab 0.1 mM) der Nitroprussid-Natrium nicht nur durch NO

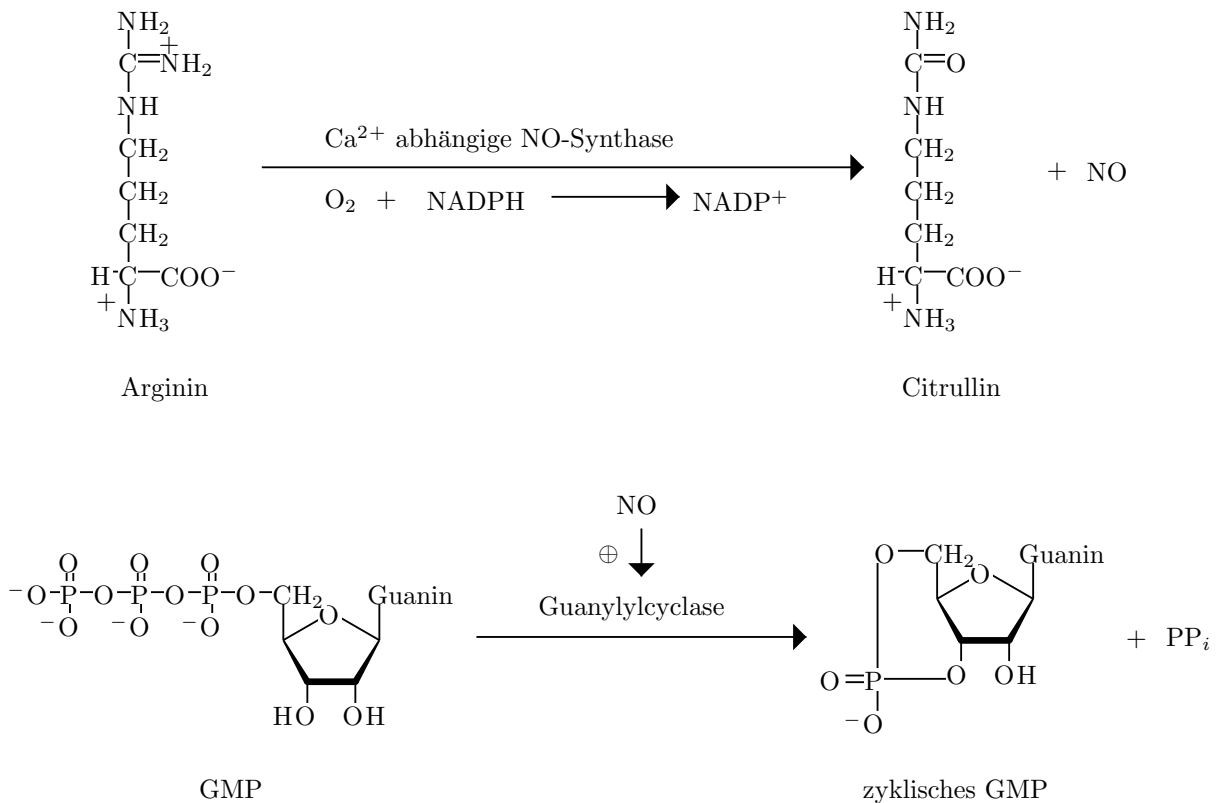


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des NO-Einflusses auf die Guanylylcyclase. NO wird aus molekularem Sauerstoff und dem Guanidin-Stickstoff von Arginin synthetisiert. NO aktiviert das cytosolische Enzym Guanylylcyclase, das die Bildung des second messengers cGMP katalysiert [NC01].

Anwesenheit, sondern auch durch Hexacyanoferrat Ionen das IOS beeinflussen.

Welche Effekte **niedrige NO Konzentrationen** auf das IOS haben ist schwieriger festzustellen. Wie oben diskutiert inhibiert Dexamethason die NOS und hat außerdem einen Effekt auf den Glukosetransport. Dexamethason beeinflusst alle Parameter des IOS. Die Amplitude, die maximale Steigung der Front und die Steigung des Abfalls der ersten und zweiten Phase der SD-Welle wurden reduziert. Die Dauer der ersten Phase wurde reduziert und die Dauer der zweiten Phase wurde verlängert. Deshalb ist anzunehmen, dass die Änderungen der Dauer durch die Blockierung des Glukosetransports und nicht durch die NO Reduktion erfolgt.

Aus den Ergebnissen folgt, dass eine Erhöhung und eine Erniedrigung der NO Konzentrationen einen ähnlichen Effekt auf das IOS haben. Diese Interpretation ist nicht vollständig, weil die Blockierung des Glukosetransports mögliche Effekte der höheren

NO Konzentrationen überdecken könnte.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeit der SD-Wellen bei Erhöhung der NO Konzentration reduziert wird, und die Applikation von cGMP Derivaten einen ähnlichen Effekt hat [UdLH95]. Das bedeutet, dass mindestens ein Teil des NO-Effektes durch die Änderungen des cGMP-Spiegels verursacht wurde, was auch durch andere Autoren bestätigt wurde [GLLL94], [May93]. Auf der anderen Seite sind die hier verwendeten NO-Konzentrationen viel höher als unter normalen physiologischen Bedingungen. Es kann auch sein, dass die eingesetzten Konzentrationen der Ringer Lösung nicht identisch sind mit den Konzentrationen im extrazellulären Raum der Retina, da die innere limitierende Membran eine Diffusionsbarriere darstellt (siehe Kap. 1.6.3) [WdL96]. In jedem Fall sind die hier verwendeten NO Konzentrationen sehr hoch und entsprechen eher den Konzentrationen, die vergleichbar mit denen während Situationen der Excitotoxizität sind.

Zusammenfassung und Ausblick

Das Nervensystem kontrolliert die physiologischen Funktionen des Körpers. Es beeinflusst die ablaufenden Prozesse, was als Antwort auf veränderte interne oder externe Bedingungen gesehen werden kann. Diese Information wird durch modulierte neuronale Aktivität weiter geleitet. Spreading Depression ist ein Wellen Phänomen, das diese neuronale Aktivität komplett unterdrückt.

Nach allen bis heute bekannten Fakten ist die SD-Welle eine Antwort des Nervensystems auf einen pathologischen Stimulus. Das bedeutet, dass sich während der Präparation von Nervengewebe für *in vivo* oder *in vitro* Experimente, operativen Eingriffen und neurologischen Operationen SD-Wellen ausbreiten können. Die genaue Untersuchung der Mechanismen der SD-Welle kann sehr hilfreich für die Behandlung von Patienten mit Migräne-Aura, Epilepsie, transienter globaler Amnesie oder nach Schlaganfall sein.

SD kann mit elektrischen und optischen Methoden beobachtet werden. Die optische Registrierung zeigt zwei Phasen des Signals. Die erste Phase des optischen Profils ist mit dem elektrischen Signal synchron und wird mit der Umverteilung der Ionen und zellulärer Schwellung verbunden. Welche Prozesse während der zweiten Phase des optischen Profils statt finden war bis jetzt eine offene Frage.

In dieser Arbeit wird untersucht welche Prozesse während der zweiten Phase des IOS ablaufen und welche Rolle diese Prozesse spielen. Mit Hilfe einer in dieser Arbeit entwickelten Methode wurde das IOS der SD-Welle systematisch unter standardisierten Bedingungen und unter Applikation der den Stoffwechsel veränderten Substanzen analysiert. Nach allen Experimenten wurde die Hypothese formuliert, dass die zweite Phase des IOS die metabolischen Prozesse, die die Zellen mit Energie versorgen, reflektiert. Es muss betont werden, dass die hier verwendete Methode nur das IOS analysiert. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen müssten auch weitere Methoden (z.B. Mikrodialysesonden) verwendet werden, die die Metaboliten direkt vor, während und nach der SD-Ausbreitung bestimmen können.

Literaturverzeichnis

- [AFST99] P. G. Aitken, D. Fayuk, G. G. Somjen, and D. A. Turner. Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods*, 18:91–103, 1999.
- [BBK69] J. Bureš, O. Burešlová, and Křivánek. *The mechanism of applications of Leão's Spreading depression of electroencephalographic activity*. Academic Press, New York, 1969.
- [BBK74] J. Bureš, O. Burešlova, and J. Křivanek. *The mechanism and application of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity*. Academia, Prague, 1974.
- [BBK84] J. Bureš, O. Burešova, and J. Křivánek. The meaning and significance of leão's spreading depression. *An. Acad. brasil. Cienc.*, 56:386–400, 1984.
- [BDdL⁺97] S. Brand, M. A. Dahlem, V. M. Fernandes de Lima, S. C. Müller, and W. Hanke. Dispersion relation of spreading depression waves in the chicken retina. *Int. J. Bifurc. Chaos*, 7:1359–1365, 1997.
- [BG94] J. Breckow and R. Greinert. *Biophysik. Eine Einführung*. Walter de Gruyter. Berlin. New York, 1994.
- [CH66] H. Collewyn and A. Van Harreveld. Membrane potential of cerebral cortical cells during spreading depression and asphyxia. *Exp. Neurol.*, 15:425–436, 1966.
- [CK89] M. Chesler and R. P. Kraig. Intracellular pH transients of mammalian astrocytes. *J. Neurosci.*, 9:2011–2019, 1989.

- [CPM85] L. Csiba, W. Paschen, and G. Mies. Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain. *Brain Res.*, 336:167–170, 1985.
- [CS90] G. Czéh and G. G. Somjen. Hypoxic failure of synaptic transmission in the isolated spinal cord, and the effects of divalent cations. *Brain Res.*, 527:224–233, 1990.
- [CW55] B. Chance and G. R. Willams. A method for the localization of sites from oxidative phosphorylation. *Nature*, 176:250–254, 1955.
- [dLH97] V. M. Fernandes de Lima and W. Hanke. Excitation waves in central grey matter: the retinal spreading depression. *Prog. Retinal Eye Res.*, 16:657–690, 1997.
- [dLH99] V. M. Fernades de Lima and M. Goldemann and W. Hanke. *The retinal spreading depression*. Shaker Verlag, Aachen, 1999.
- [dLST⁺93] V. M. Fernades de Lima, D. Scheller, F. Tegtmeier, W. Hanke, and W. R. Schlue. Self-sustained spreading depressions in the chicken retina and short-term neuronal-glial interactions within the gray matter neuropil. *Brain Res.*, 614:45–51, 1993.
- [Ert91] G. Ertl. Oscillatory kinetics and spatio-temporal self-organization in reactions at solid surfaces. *Science*, 254:1750–1755, 1991.
- [FHRS96] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, and K. Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum, 1996.
- [GFLH88] A. Grinvald, R. D. Frostig, E. E. Lieke, and R. Hildesheim. Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.*, 68:1285–1366, 1988.
- [GKH92] P. J. Goasdby, H. Kaube, and K. L. Hoskin. Nitric oxide couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res.*, 595:167–170, 1992.
- [GLLL94] L. M. Gault, C. W. Lin, J. LaManna, and D. Lust. Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression. *Brain Res.*, 641:176–180, 1994.

- [Gra56] B. Grafstein. Mechanism of cortical spreading depression. *J. Neurophysiol.*, 19:154–171, 1956.
- [Han77] A. J. Hansen. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta. Physiol. Scand.*, 99:412–420, 1977.
- [Han78] A. J. Hansen. The extracellular potassium concentration in the brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta. Physiol. Scand.*, 102:324–329, 1978.
- [Har78] A. Van Harreveld. Two mechanisms of spreading depression in chicken retina. *J. Neurobiol.*, 9:419–431, 1978.
- [HGWdL96] W. Hanke, M. Goldermann, M. Wiedemann, and V. M. Fernandes de Lima. Video image microscopy of excitation waves in the retina. *Microsc. Anal.*, 9:23–25, 1996.
- [HMW74] H. Higashida, G. Mitarai, and S. Watanabe. A comparative study of membrane potential changes in neurons and neuroglial cells during spreading depression in rabbit. *Brain Res.*, 65:411–425, 1974.
- [HQ81] A. Gjedde A. J. Hansen and B. Quistorff. Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem.*, 37:807–812, 1981.
- [Job77] F. F. Jobsis. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, 198:1264–1267, 1977.
- [KR95] H. Ketteman and B. R. Ransom. *Neuroglia*. New York:Oxford, 1995.
- [Las41] K. Lashley. Patterns of cerebral integration indicated by scotomas of migraine. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 46:331, 1941.
- [Leã44a] A.A.P. Leão. Pial circulation and spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, 7:391–396, 1944.
- [Leã44b] A.A.P. Leão. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, 7:359–390, 1944.

- [LM45] A.A.P. Leão and R.S. Morrison. Propagation of spreading cortical depression. *J. Neurophysiol.*, 8:33–45, 1945.
- [LN73] H. D. Lux and E. Neher. The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Exp. Brain Res.*, 17:190–205, 1973.
- [May93] B. Mayer. Molecular characteristics and enzymology of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in CNS. *Sem. Neuroscie.*, 5:197–205, 1993.
- [mey83] *Meyers grosses Taschenlexikon*, volume 6. Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, 1983.
- [MFdC66] H. Martins-Ferreira and O. G. de Castro. Light-scattering changes accompanying spreading depression in isolated retina. *J. Neurophysiol.*, 29, 1966.
- [MFNN00] H. Martins-Ferreira, M Nedergaard, and C. Nicholson. Perspectives on spreading depression. *Brain Res. Rev.*, 32:215–234, 2000.
- [MG94] R. S. McLachlan and J. P. Girvin. Spreading depression of leão in rodent and human cortex. *Brain Res.*, 666:133–136, 1994.
- [MM00] T. Mair and S. C. Müller. Propagating waves of biological activity. *Recent Res. Devel. Biophys. Chem.*, 1:105–121, 2000.
- [MSPR87] J. C. La Manna, T. J. Sick, S. M. Pikarsky, and M. Rosenthal. Detection of an oxidizable fraction of cytochrome oxidase in intact rat brain. *Am. J. Physiol.*, 253:C477–C483I, 1987.
- [MW91] A. Mayevsky and H. R. Weiss. Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11, 1991.
- [NA86] M. Nedergaard and J. Astrup. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and $[14c]2$ -deoxyglucose phosphorylation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 6:607–615, 1986.

- [NC01] D. Nelson and M. Cox. *Lehninger Biochemie*. Springer, 2001.
- [NH88] M. Nedergaard and A. J. Hansen. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res.*, 449:395–398, 1988.
- [OA98] A. S. Obeidat and R. D. Andrew. Spreading depression determines acute cellular damage in the hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation. *Eur. J. Neuroscie.*, 10:3451–3461, 1998.
- [Par98] A. A. Parsons. Recent advances in mechanisms of spreading depression. *Curr. Opin. Neurolog.*, 11:227–231, 1998.
- [PMZ98] J. Parisi, S. C. Müller, and W. Zimmermann. *A perspective look at non-linear media. From physics to biology and social science.*, chapter Path optimization in chemical and biological systems on the basis of excitation waves., pages 179–191. Springer, 1998.
- [RDR99] H. P. Rang, M. M. Dale, and J. M. Ritter. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 1999.
- [Rei99] A. Reichenbach. *Neuroglia-das andere zellulär Element im Nervensystem: die Müllersche Gliazelle*. SMV, 1999.
- [ROA00] D. J. Rossl, T. Oshima, and D. Attwell. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403:316–321, 2000.
- [RS73] M. Rosenthal and G. Somjen. Spreading depression, sustained potential shifts, and metabolic activity of cerebral cortex of cats. *J. Neurophysiol.*, 36:739–749, 1973.
- [SAC⁺91] G.G. Somjen, P.G. Aitken, G.L. Czéh, O. Herreras, J. Jing, and J. N. Young. Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70:s248–s254, 1991.
- [SHR01] R. G. Schulman, F. Hyder, and D. L. Rothman. Cerebral energetics and the glycogen shunt: Neurochemical basis of functional imaging. *PNAS*, 98:6417–6422, 2001.

- [SLRB⁺91] R. A. Stepnoski, A. Laporta, F. Raccaia-Behling, G. E. Slusher, and D. Kleinfeld. Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:9382–9386, 1991.
- [SOB93] B. M. Salzberg, A. L. Obaid, and F. Bezanilla. Microsecond response of a voltage-sensitive merocyanine dye: Fast voltage-clamp measurements on squid giant axon. *Jap. J. Physiol.*, 43:S37–S41, 1993.
- [STN75] E. Sugaya, M. Tokato, and Y. Noda. Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *J. Neurophysiol.*, 38:822–841, 1975.
- [Tip94] P. A. Tipler. *Physik*. Spektrum, 1994.
- [UdLH95] H. J. Ulmer, V. M. Fernandes de Lima, and W. Hanke. Effekt of nitric oxide on the retinal spreading depression. *Brain Res.*, 691:239–242, 1995.
- [UL88] M. Ueki and F. Linn. Functional activation of cerebral blood flow and metabolism before and after global ischemia of rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 8:486–494, 1988.
- [VC97] A. Villringer and B. Chance. Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *TINS*, 20:435–442, 1997.
- [Vin94] S. R. Vincent. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42:129–160, 1994.
- [WdL96] M. Wiedemann and V. M. Fernandes de Lima. Effects of antimigraine drugs on retinal spreading depression. *Naunyn-Schiedeberg's Arc. Pharmacol.*, 353:552–556, 1996.
- [WH97] M. Wiedemann and W. Hanke. The chicken retina as an experimental model for investigation of central nervous system. *Neurosci. Lett.*, 232:99–102, 1997.

- [WSPKes] M. Wahl, L. Schilling, A. A. Parsons, and A. Kaumann. Involvement of calcitonin gen-related peptide (CGRP) and nitric oxide in the pial artery dilation elicited by cortical spreading depression. *1994*, 637:204–210, Brain Res.
- [XS00] Z. Q. Xiong and J. L. Stringer. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in dentate gyros. *J. Neurophysiol.*, 83(3):1443–51, 2000.
- [ZZ70] A. N. Zaikin and A. M. Zhabotinsky. Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system. *Nature*, 225:535–537, 1970.

Danksagung

Viele Leute und Institutionen haben mir geholfen diese Arbeit zu erstellen. Katharina Braun möchte ich für das Labor, das sie uns zu Verfügung gestellt hat, für die theoretischen und experimentellen Kenntnisse in der Neurobiologie, die sie immer gerne geteilt hat und für die Zeit, die sie sich immer genommen hat um Fragen zu beantworten, danken. Stefan Müller gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit und seine Bereitschaft mir die notwendige Freiheit für die Forschung zu gewähren, für das Wissen in Physik und Mathematik, das er mir beigebracht hat und für seine Kritik, die sehr hilfreich war und diese Arbeit positiv beeinflusst hat. Wolfgang Hanke bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit die pharmakologischen Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu können, seinen Optimismus und sein Talent, immer und in jeder Situation eine richtige Lösung zu finden, für die vielen Diskussionen und wunderbaren Ideen und für die glückliche Atmosphäre, die Wolfgang in seiner Arbeitsgruppe kreiert hat. Meike Wiedemann möchte ich danken für die Hilfsbereitschaft mit ihrem Wissen über SD und für die Korrekturen, die während des Zusammenschreibens dieser Arbeit gemacht wurden. Mark Weimer hat mir beigebracht, wie man die Fakten richtig analysieren soll, dass sogar die Antwort auf kleine Fragen zu sehr wichtigen Ergebnissen führen kann. Bernd Schmidt und Klaus Meissner sei für die Administration der Rechner und die ständige Rettung der Daten gedankt. Martin Böckmann hat mich während der ersten Schritte in der IDL-Programmierung unterstützt. Edeltraud Gerbershagen hat immer bei der Vorbereitung der Experimente geholfen. Uli Storb hat meine Verständnisprobleme der statistischen Tests gelöst. Bei Thomas Maier, Marcus Hauser will ich mich für die interessanten Diskussionen bedanken. Dipl.-Lehrerin Karin Kliese möchte ich danken für die Deutschkenntnisse, die sie mir beigebracht hat.

Ich will meinem Mann, Markus Dahlem, danken. Markus hat mir gezeigt, dass die Wissenschaft eine Kunst ist, bei der man unabhängig von Enttäuschungen, jeden Tag durch all die Sachen, die man lernen oder entdecken kann, inspiriert wird. Zum Schluss ist es mir eine besondere Freude meiner Familie Alla Ismailova und Alexandr Ismailov, Ulla und Werner Dahlem und Maria Mischneva für die liebevolle Unterstützung zu danken.

Personalien

Name: Yuliya Dahlem, geb. Ismailova
Geburtstag: 10. Oktober 1974
Geburtsort: Dnepropetrovsk
Nationalität: ukrainisch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung und Tätigkeiten

Mai 91 Hochschulreife, Dnepropetrovsk, Ukraine
WS'91-SS'96 Studium der Biochemie an der Staatsuniversität, Dnepropetrovsk, Ukraine
Juli 96 Diplom in Biochemie und Lehreberechtigung für Biologie
Aug. 96 - Mai 97 Promotionsstudium an der Fakultät für Biochemie an der Staatsuniversität, Dnepropetrovsk
Juni 97-Dez. 98 Wissenschaftliche Tätigkeit am Leibniz-Institut für Neurobiologie in der Forschergruppe von Dr. U. Frey
seit Jan. 99 Promotionsstudentin an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg, am Institut für experimentelle Physik, Abteilung Biophysik bei Prof. Dr. S.C.Müller
Jan. 01-Okt.01 Mehrere Forschungsaufenthalte an der Universität Hohenheim am Institut für Physiologie, Abteilung Membranphysiologie bei Prof. Dr. W. Hanke

Anhang A

Teile der IDL Programme

Es wird die schematische Darstellung der Auswertung des IOS einer SD-Welle präsentiert.
Genaue Erklärung siehe im Kapitel 2.6.

Die folgenden Namen der Variablen wurden in den Programmen benutzt:

- [array[1,*]] - originale experimentelle Daten
- [rueck] - gefilterte Daten

Erste Phase des IOS

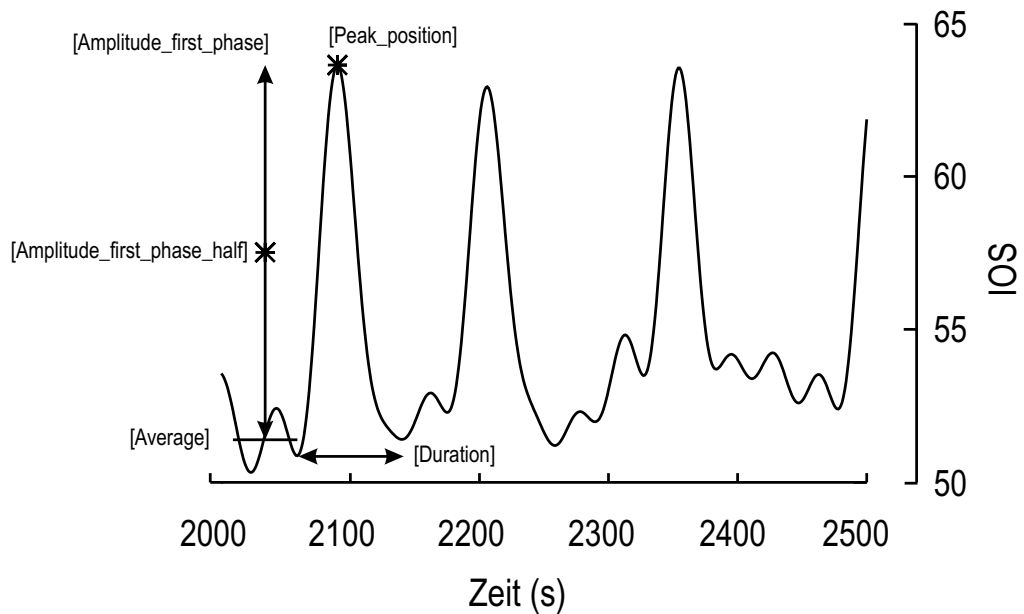
- [peak_position] - maximaler Wert
- [min_before_max] - erster minimaler Wert
- [min_after_max] - zweiter minimaler Wert
- [average] - Grundlinie des IOS
- [duration] - Dauer
- [amplitude_first_phase] - Amplitude
- [amplitude_first_phase_half] - halbe Amplitude
- [derivative] - maximale Steigung

Zweite Phase des IOS

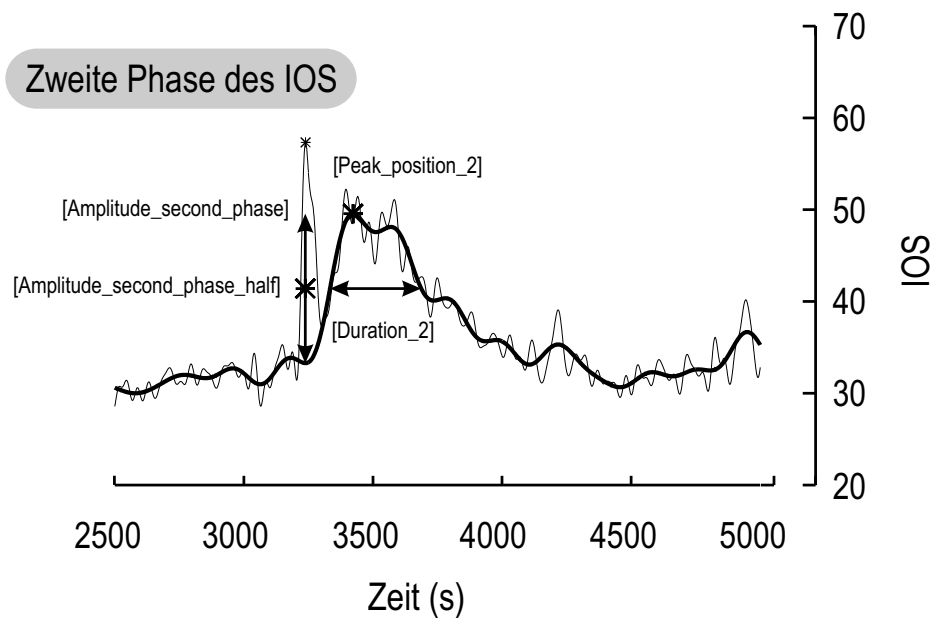
- [peak_position_2] - maximaler Wert des IOS
- [min_before_max_2] - erster minimaler Wert
- [min_after_max] - zweiter minimaler Wert

- [duration_2] - Dauer
- [amplitude_second_phase] - Amplitude
- [amplitude_second_phase_half] - halbe Amplitude

Erste Phase des IOS



Zweite Phase des IOS



Teile der geschriebene Programmen für die Datenauswertung

- *FFT-Filter*

```
result=FFT (array[1,*], -1)
```

N=40

gefiltert =result

gefiltert[N:B-1-N]=0

rueck=FFT(gefiltert, 1)

rueck=FLOAT(rueck)

- *Suchen nach dem maximalen Wert der ersten Phase und seiner Position*

peak_position=**WHERE** (shift (rueck,-1) **LE** rueck **AND** \$

rueck **GT** shift (rueck,1) **AND** \$

rueck **GT** baseline_array, number_peaks)

- *Suchen nach den zwei minimalen Werten der ersten Phase und ihrer Positionen*

min_position=**WHERE**(shift(rueck,-1) **GE** rueck **AND** \$

rueck **LT** shift (rueck,1), number_min)

min_before_max=FLTARR(number_peaks)

min_after_max=FLTARR(number_peaks) min_after_max_index=-1L

FOR num=0, number_peaks-1 DO BEGIN

FOR l=0,number_min-1 **DO BEGIN**

IF min_position(l) **LT** peak_position(num) **THEN BEGIN**

 min_before_max(num)= min_position(l)

 min_after_max_index=l

ENDIF

ENDFOR

min_after_max(num) = min_position(min_after_max_index+1)

ENDFOR

- *Grundlinie des IOS*

average=**MEAN** (rueck [0 : min_before_max])

- *Berechnung der Dauer der ersten Phase*

duration=(min_after_max-min_before_max)/10

- *Berechnung der Dauer der zweiten Phase*

```

four_near_val_front = FLTARR(4,number_peeks)

FOR l= 0, number_peeks-1 DO BEGIN

    found_4_values='NO'

    internal_counter=0

    WHILE (found_4_values NE 'YES') DO BEGIN

        IF rueck_2(min_before_max_2[l]+internal_counter) GT $
            (half_amplitude_2(l)+ average) THEN BEGIN

            four_near_val_front[0:3,l]=[min_before_max_2[l]+$
                internal_counter-2, $
                min_before_max_2[l]+internal_counter-1, $
                min_before_max_2[l]+internal_counter , $
                min_before_max_2[l]+internal_counter+1 ]

            found_4_values='YES'

        ENDIF

        internal_counter=internal_counter+1

    ENDWHILE

ENDFOR

...

coefficients_front[*]=POLY_FIT (four_near_val_front[*], $
rueck_2[four_near_val_front[*]], 1, /DOUBLE)

x1_pos_half_duration = ( (half_amplitude_2+average) - coefficients_front[0] ) $
/ coefficients_front[1]

...

duration_2=(x2_pos_half_duration-x1_pos_half_duration)/10

```

- *Berechnung der Steigungen der ersten Phase*

```

derivative=DERIV(rueck)

derivative_max_position = WHERE ((shift (derivative,-1) LE derivative)$
AND (shift(derivative, 1) LT derivative ) AND $

```

```
derivative GT lead_baseline , number_derivative_max )  
result_max=MAX( derivative(derivative_max_position), k_max )
```

Anhang B

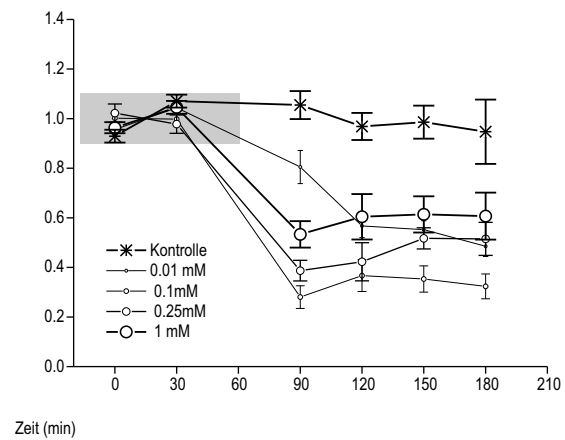
Zeitliche Abhängigkeit der Substanz Wirkungen aller IOS Parameter

Hier ist die zeitliche Abhängigkeit der Substanzwirkung an allen IOS Parametern während der Experimente mit: Nitroprussid-Natrium, Kaliumhexacyanoferrat, Kaliumcyanid und Trinitroglycerin, präsentiert. Das graue Quadrat zeigt die Kontrollmessungen, die für die Normierung der ganzen Messwerte benutzt wurden.

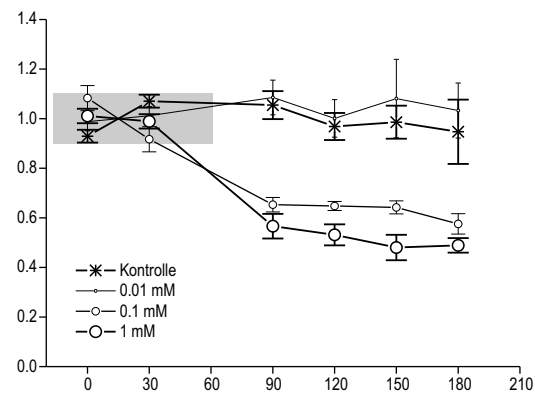
- A_1 - Amplitude der ersten Phase
- A_2 - Amplitude der zweiten Phase
- T_1 - Dauer der ersten Phase
- T_2 - Dauer der zweiten Phase
- F'_1 - maximale Steigung der Front der ersten Phase
- F'_2 - Steigung der Front der zweiten Phase
- R'_1 - maximale Steigung des Abfalls der ersten Phase
- R'_2 - Steigung des Abfalls der zweiten Phase

A₁

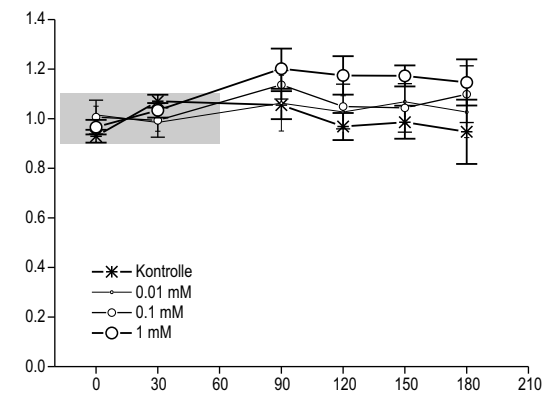
Nitroprussid-Natrium



Kaliumhexacyanoferrat

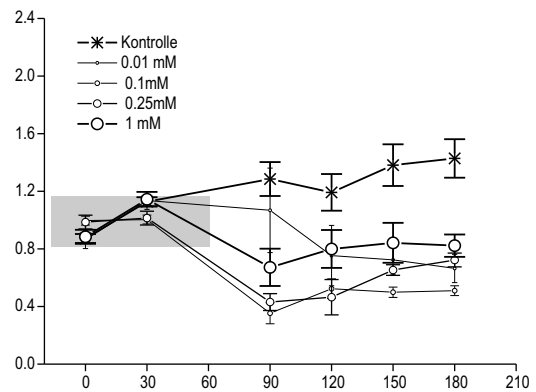


Kaliumcyanid



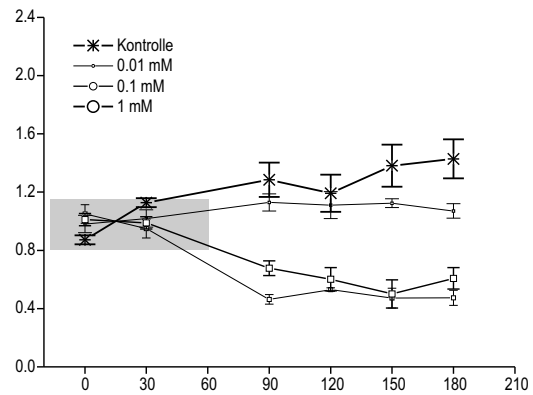
A₂

Nitroprussid-Natrium

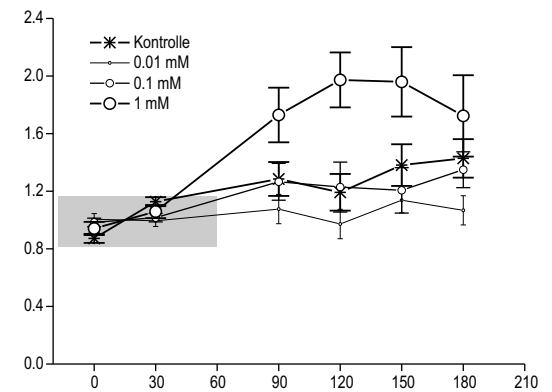


Zeit (min)

Kaliumhexacyanoferrat

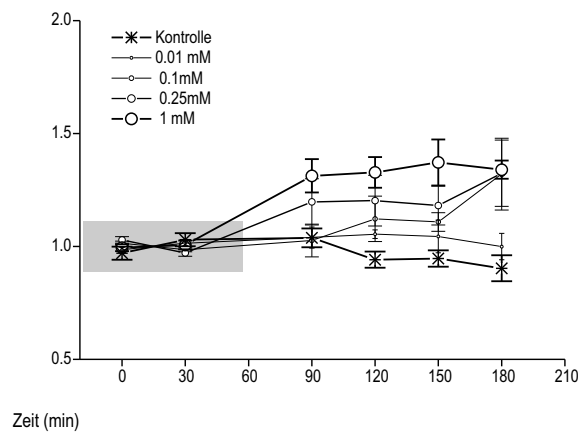


Kaliumcyanid

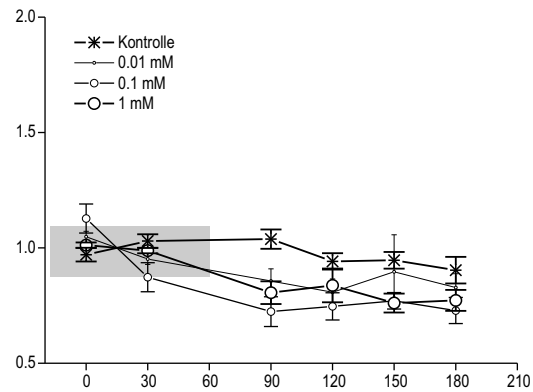


T_1

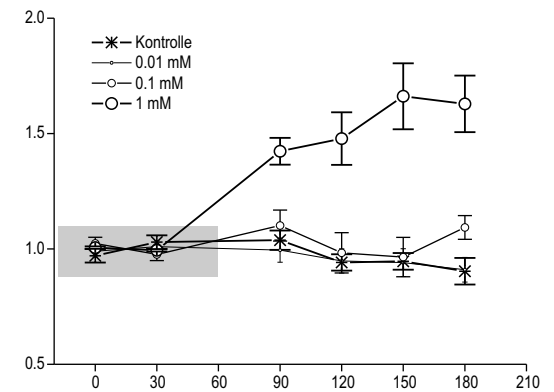
Nitroprussid-Natrium



Kaliumhexacyanoferrat

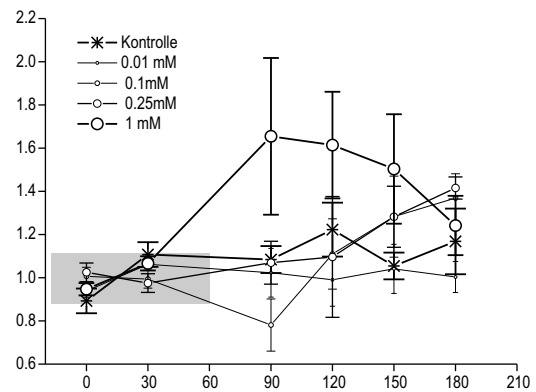


Kaliumcyanid



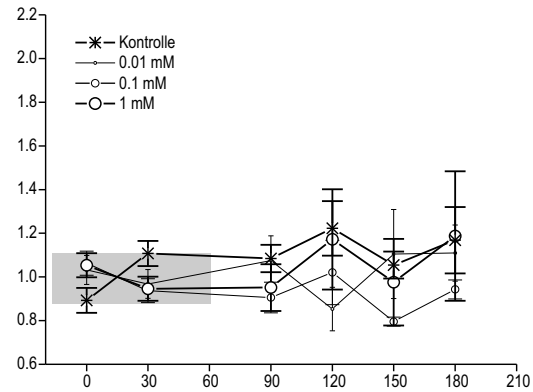
T_2

Nitroprussid-Natrium

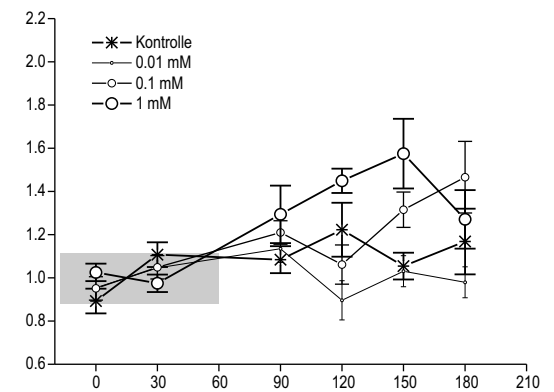


Zeit (min)

Kaliumhexacyanoferrat

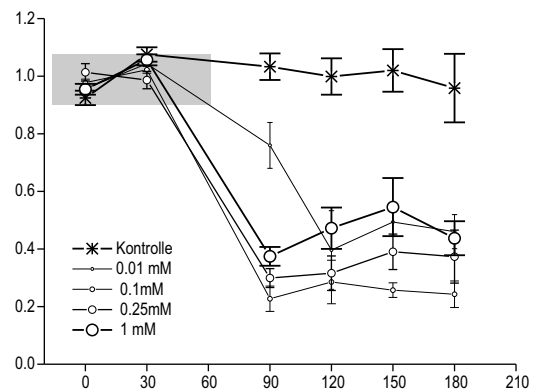


Kaliumcyanid



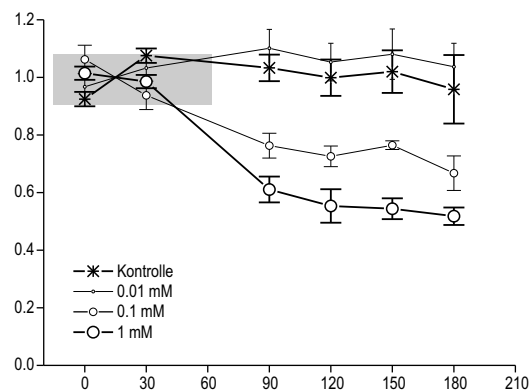
F₁'

Nitroprussid-Natrium

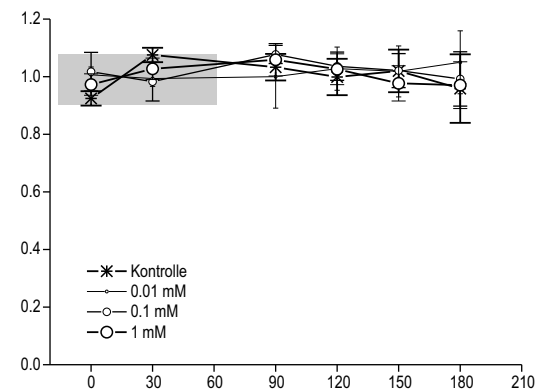


Zeit (min)

Kaliumhexacyanoferrat

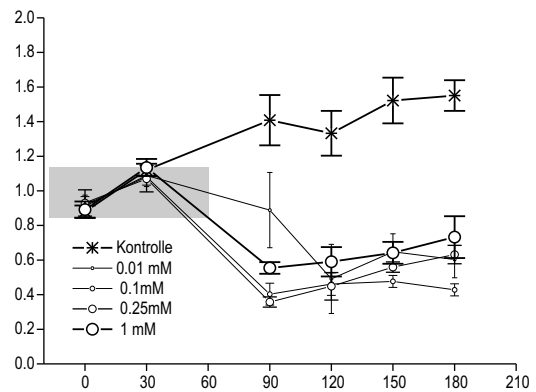


Kaliumcyanid



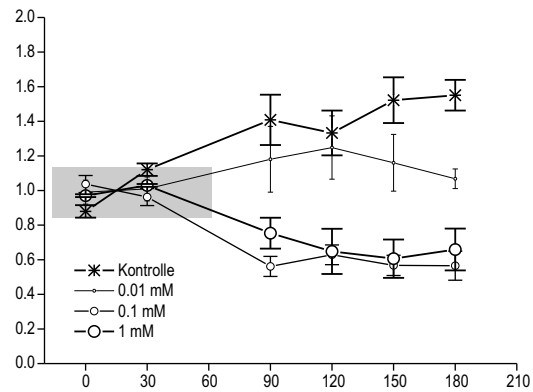
F_2'

Nitroprussid-Natrium

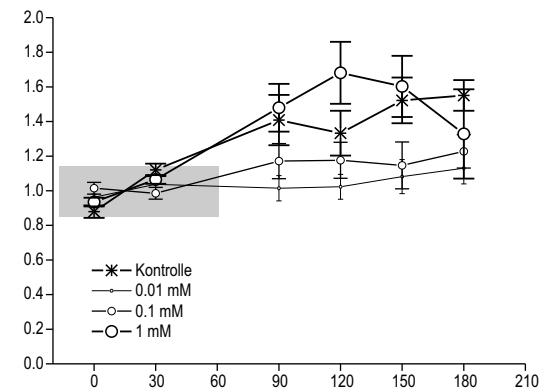


Zeit (min)

Kaliumhexacyanoferrat

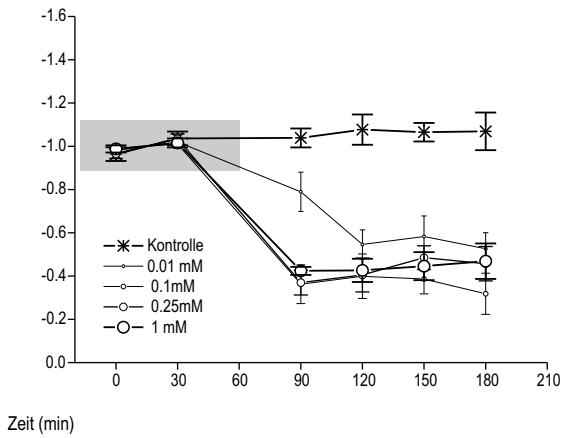


Kaliumcyanid

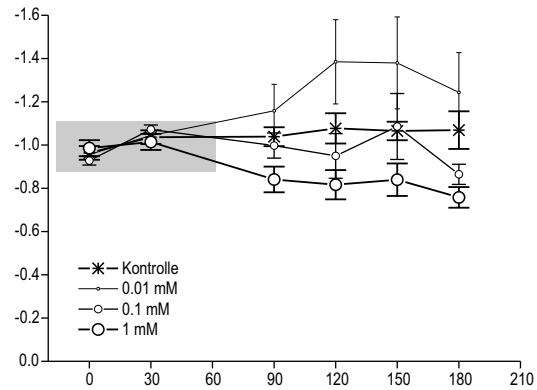


R_1'

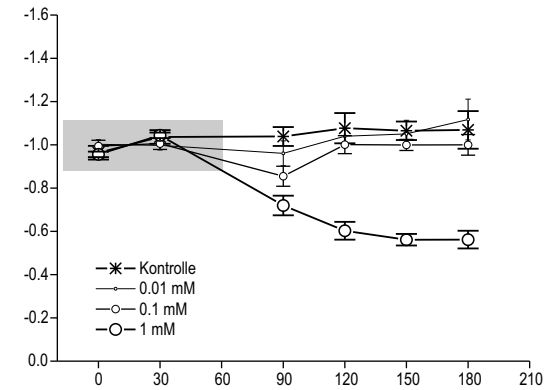
Nitroprussid-Natrium



Kaliumhexacyanoferrat

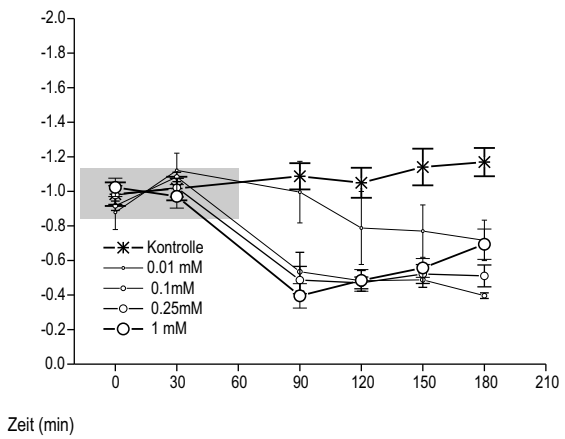


Kaliumcyanid

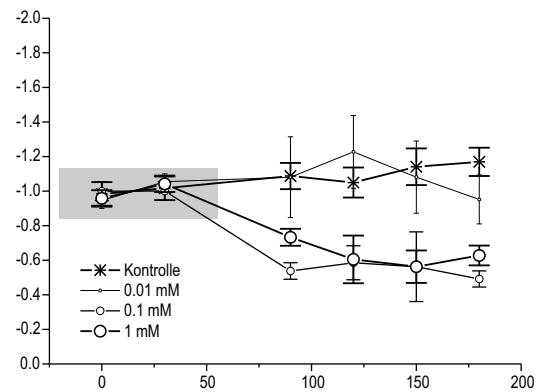


R_2'

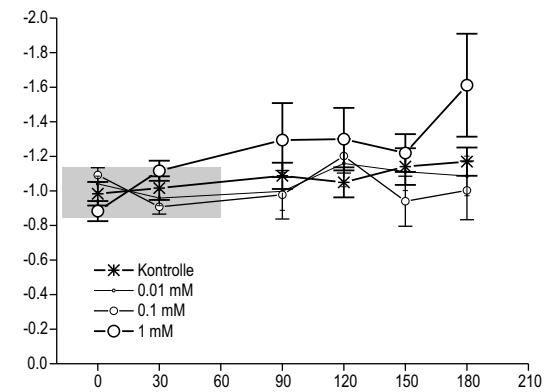
Nitroprussid-Natrium



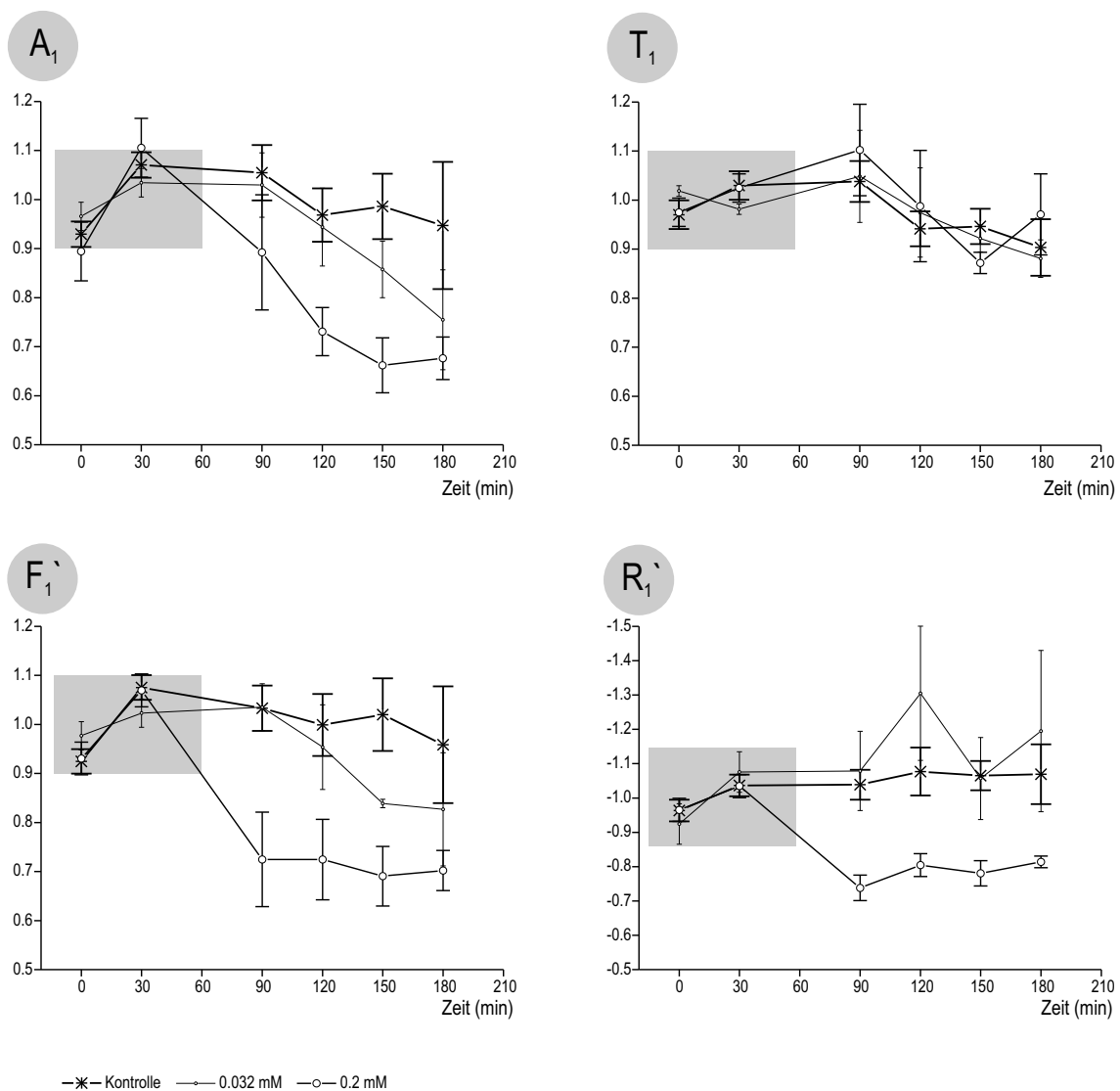
Kaliumhexacyanoferrat



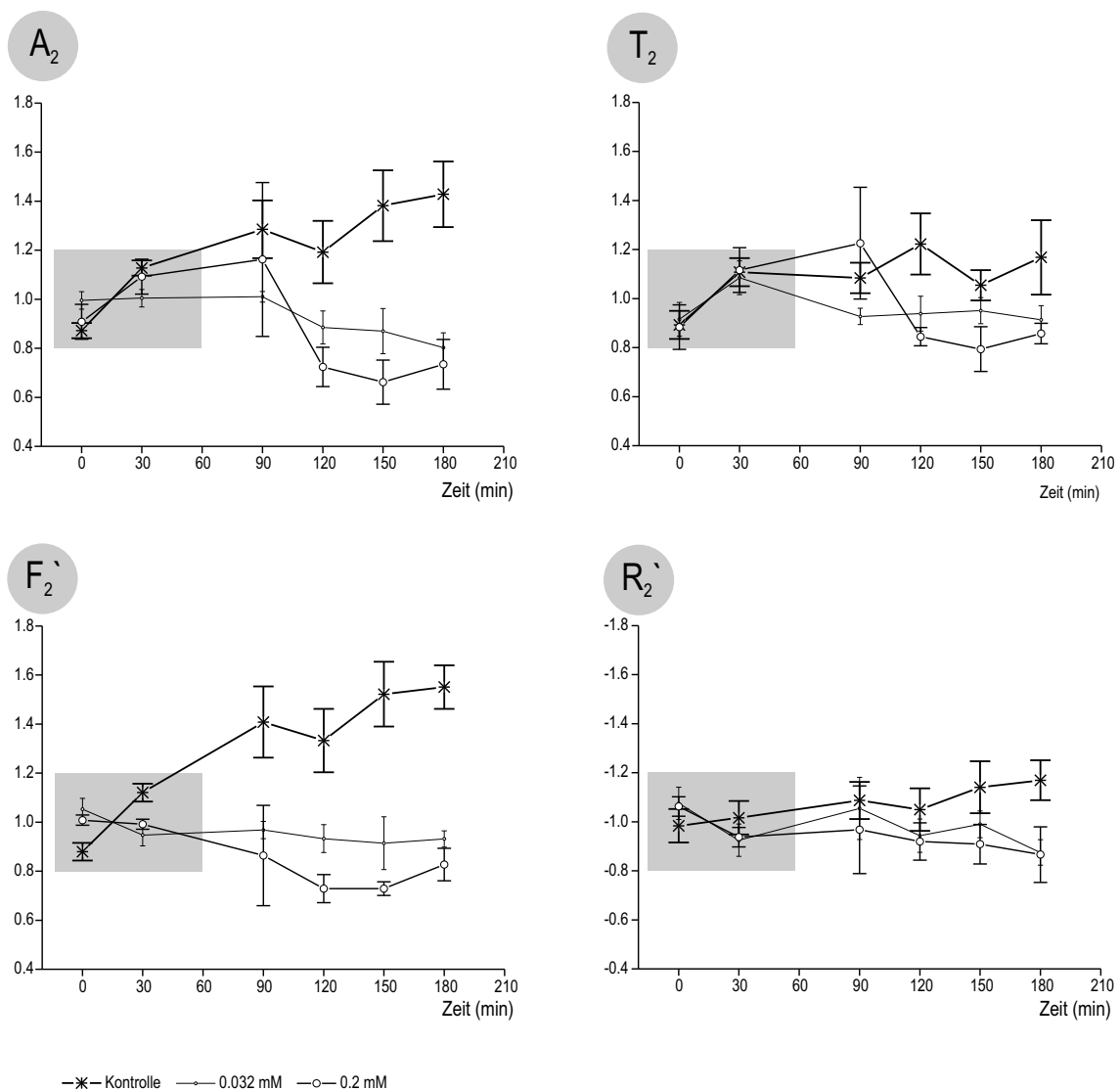
Kaliumcyanid



Trinitrolycerin



Trinitrolycerin



Anhang C

Statistik

Erklärung für die Symbole, die für die Signifikanztests benutzt wurden

<i>Zeichen</i>	<i>P Wert</i>	<i>Erklärung</i>
	>0.05	Nicht signifikant
*	0.01 bis 0.05	Signifikant
**	0.001 bis 0.01	Sehr signifikant
***	<0.001	Extrem signifikant